

ÚZPI

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

3

VOLUME 41 (LXIX)
PRAHA
MARCH 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., Reinfeld, Switzerland

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

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

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

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: Agris, CAB Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

Periodicita: Časopis vychází měsíčně (12x ročně), ročník 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, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/25 75 41–9, fax: 02/25 70 90, e-mail: braun@uzpi.agrec.cz. Den doručení rukopisu do redakce je uváděn jako datum přijetí k publikaci.

Informace o předplatném: Objednávky na předplatné jsou přijímány pouze na celý rok (leden–prosinec) a měly by být zaslány na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací, vydavatelské oddělení, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 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: Agris, CAB Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

Periodicity: The journal is published monthly (12 issues per year), Volume 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, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/25 75 41–9, fax: 02/25 70 90, e-mail: braun@uzpi.agrec.cz. The day the manuscript reaches the editor for the first time is given upon publication as the date of reception.

Subscription information: Subscription orders can be entered only by calendar year (January–December) and should be sent to: Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Subscription price for 1996 is 115 USD (Europe), 120 USD (overseas).

THE EFFECT OF EXPERIMENTAL METABOLIC STRESSES ON OVULATION AND PROGESTERONE LEVELS IN COWS

VLIV EXPERIMENTÁLNĚ VYVOLANÝCH METABOLICKÝCH ZÁTĚŽÍ NA PRŮBĚH OVULACE A HLADINY PROGESTERONU U KRAV

A. Vinkler, R. Dvořák, E. Kudláč

University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: The effect of a long run subclinic metabolic stress of acidotic and alkalotic nature was examined with respect to the course of cloprostenol induced estrus, ovulation and progesterone levels in blood and milk. The stress of acidotic nature was induced by widening the ratio of digestible crude protein to total dietary energy to the value 1 : 8.1 in 11 cows, while the alkalotic stress was due to narrowing the nutrient ratio to 1 : 2.81 in eight cows. Control group with the nutrient ratio 1 : 4.5–5 comprised 11 cows. The stress of acidotic nature was accompanied by ovulation disorders in 4 out of 11 cows (36.4%), in the group with the stress of alkalotic type it was in 2 out of 8 animals (25%). No ovulation disorders were observed in control group. Within 7 days after estrus, the average progesterone levels were 1.26 ± 0.84 ng/ml in the blood of cows with stress of acidotic type, 3.48 ± 2.99 in cows with stress of alkalotic type and 3.12 ± 1.98 ng/ml in control cows. The differences between acidotic stress and control were statistically significant ($P < 0.05$). During the whole pregnancy (18 to 276 days), average progesterone levels were lowest in the group subjected to stress of acidotic nature. They ranged from 1.9 to 3.8 ng/ml with the average value 2.65 ± 1.40 ng/ml. In the group with stress of alkalotic type they ranged from 2.55 to 5.43 ng/ml with the average value 3.67 ± 2.29 ng/ml. In the control group, they ranged from 4.00 to 8.68 ng/ml with the average value 5.62 ± 2.24 ng/ml. Variations in cortisol concentrations indicated a certain stressing effect of feed rations on the internal environment of dairy cow organisms and activation of compensatory mechanisms.

cattle; acidosis; alkalosis; cloprostenol; ovulation; progesterone

ABSTRAKT: Byl sledován vliv dlouhodobé subklinické metabolické zátěže acidózního a alkalózního charakteru na průběh říje indukované cloprostenolem, ovulaci a hladiny progesteronu v krvi a mléce. Zátěž acidózního charakteru byla vyvolána rozšířením poměru mezi stravitelnými N-látkami a celkovou energií krmné dávky na 1 : 8,1 u 11 krav, alkalózní zátěž zúžením poměru živin na 1 : 2,81 u osmi krav. Kontrolní skupinu s poměrem živin 1 : 4,5 až 5 tvořilo 11 krav. Při zátěži acidózního typu byly zjištěny poruchy ovulace u čtyř z 11 (36,4 %), ve skupině se zátěží alkalózního typu u dvou z osmi krav (25 %). V kontrolní skupině poruchy ovulace zjištěny nebyly. Za sedm dní po říji byly průměrné hladiny progesteronu v krvi krav se zátěží acidózního typu $1,26 \pm 0,84$ ng/ml, se zátěží alkalózního typu $3,48 \pm 2,99$ a u kontrol $3,12 \pm 1,98$ ng/ml. Rozdíly mezi acidózou a kontrolou byly statisticky významné ($P < 0,05$). Po celou dobu gravidity (18 až 276 dní) byly nejnižší průměrné hladiny progesteronu ve skupině vystavené zátěži acidózního typu. Pohybovaly se v rozmezí od 1,9 do 3,8 ng/ml s průměrem $2,65 \pm 1,40$ ng/ml. Ve skupině se zátěží alkalózního typu se pohybovaly v rozmezí 2,55 až 5,43 ng/ml s průměrem $3,67 \pm 2,29$ ng/ml. V kontrolní skupině se pohybovaly v rozmezí od 4,00 do 8,68 ng/ml s průměrem $5,62 \pm 2,24$ ng/ml. Změny v hladinách kortizolu naznačily určitý zátěžový vliv krmných dávek na vnitřní prostředí organismu dojníc a aktivaci kompenzačních mechanismů.

skot; acidóza; alkalóza; cloprostenol; ovulace; progesteron

ÚVOD

Nevyvážené krmné dávky v obsahu sušiny, vlákniny a jednotlivých živin a jejich rychlé změny ovlivňují trávení v předžaludcích skotu a často vedou k závažným poruchám, které se promítají do úrovně vnitřního prostředí organismu zvířat a jsou souhrnně označovány jako produkční choroby (Payne, 1973; Jagoš aj., 1975). Vedle změn v pH a složení bacherové mikroflory jsou závažné změny v tvorbě a vzájemných propor-

cích těkavých mastných kyselin a změny v obsahu amoniaku (Prasad aj., 1973; Vrzgula, 1974; Jagoš aj., 1977; Slanina, 1985), které mohou ovlivnit řadu životních funkcí změnami acidobazické rovnováhy krve, hromaděním CO_2 a amoniaku v krvi a tkáních (Chalmers aj., 1971; Bouda aj., 1977; Visek, 1984; Piskač aj., 1985). Snížené zastoupení kyseliny octové a zvýšení podílu kyseliny propionové, valerové a máselné vede k poklesu mléčného tuku (Dvořák a Jagoš, 1985). Kyselina octová je též

prekurzorem pro tvorbu steroidních hormonů (Eik-Nes, 1975) a podle Gamčíka aj. (1980) nedostatek kyseliny octové může mít dopad na sníženou tvorbu steroidních hormonů. Nižší hladiny steroidních hormonů mohou mít též souvislost se zvýšenou aktivitou mikrozomálních enzymů v játrech při zvýšeném příjmu proteinů a vyšších hladinách amoniaku v krvi (Sachan, 1975; Visek, 1984).

MATERIÁL A METODA

K pokusům byly použity krávy českého strakatého plemene ve věku 2 až 3 roky, které byly nejméně 60 dnů po porodu, bez klinických příznaků onemocnění. Metabolická zátěž byla vyvolána úpravou krmné dávky tak, že ve skupině vystavené acidogenní zátěži byl poměr živin rozšířen až na poměr 1 : 8,1 (SNL : celková energie krmné dávky), ve skupině se zátěží alkalózního typu byl snížen na 1 : 2,81 a v kontrole byl poměr živin 1 : 4,5 až 5. Vliv acidogenní zátěže byl sledován u 11 krav, alkalózní zátěže u osmi krav a v kontrole bylo 11 krav. Přechod na experimentální krmné dávky byl proveden v průběhu jednoho měsíce a experimentální krmné dávky byly podávány minimálně dva měsíce před vyvoláním říje. Říje byla vyvolána *i. m.* aplikací cloprostenu (500 µg) krávám nacházejícím se v luteální fázi cyklu (6. až 16. den). Pohlavní orgány byly klinicky vyšetřeny před aplikací cloprostenu i za 72 až 96 h po aplikaci v době říje. Za sedm dní po říji byla rektální palpací provedena kontrola vaječníků zaměřená na zjištění vyvíjejícího se žlutého tělíska, dokazujícího proběhlou ovulaci, případně přítomnost přetrvávajícího folikulu nebo cyst. Před aplikací cloprostenu, za 24 h, 72 až 96 h po aplikaci a za 7 až 8 dní po říji byly odebrány vzorky krve na stanovení progesteronu a kortizolu a mléka na stanovení progesteronu. Není hodnoceno zabřezávání, protože část krav byla použita pouze k sledování průběhu ovulace a hladin progesteronu v průběhu říje a nebyly inseminovány. Pro další sledování vlivu nevyvážených krmných dávek na vývoj hladin progesteronu v krvi byly do každé skupiny vybrány čtyři zabřezlé krávy a u nich sle-

divány hladiny progesteronu v období gravidity. Ve skupině vystavené zátěži acidózního typu došlo v 93. dni gravidity ke zmetání, a proto byla skupina v průběhu pokusu doplněna o další březí plemeni. Steroidní hormony byly stanoveny RIA metodou (Stupnickí aj., 1975) u nás upravenou (Pichová, 1977). Zjištěné hodnoty byly statisticky vyhodnoceny *T*-testem (Matoušková aj., 1992).

VÝSLEDKY

Při postupném navyku na zátěže acidózního a alkalózního typu nedocházelo ke klinickým projevům onemocnění a dojnice prokázaly relativně vysoký stupeň adaptability na dané krmné dávky. Při dlouhodobé acidóze bachoru se zvýšil obsah kyseliny mléčné a celkový obsah těkavých mastných kyselin v bachorové tekutině. Snížila se molární proporce kyseliny octové pod referenční hodnoty, zvýšila se proporce kyseliny propionové a valerové. Byly zjišťovány zvýšené hladiny amoniaku. Hodnoty acidobazické rovnováhy krve byly mírně nižší, ale pohybovaly se v referenčních hodnotách. Koncentrace Ca a P v krevní plazmě byla poněkud snižena, ale nepoklesla pod spodní hladinu referenčních hodnot. Exkrece P močí byla proti kontrole zvýšená.

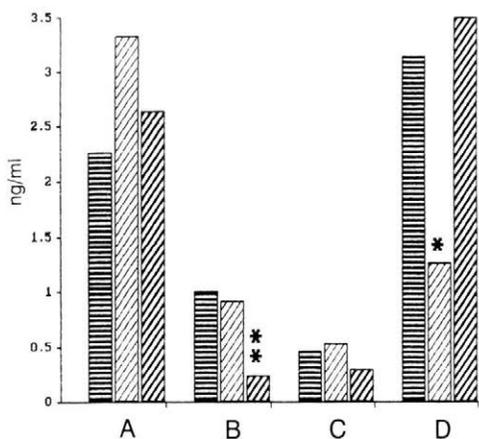
Zátěž nadhytkem dusíkatých látek se projevila mírným nárůstem aktuální acidity v bachorové tekutině. Koncentrace kyseliny mléčné nebyla ovlivněna. Hladiny amoniaku byly zvýšené. Produkce celkových těkavých mastných kyselin byla nižší než v kontrole, molární proporce těkavých mastných kyselin nebyly výrazně ovlivněny. Hladiny cholesterolu v krvi byly u obou pokusných skupin nižší než v kontrole, rozdíl nebyl statisticky významný.

Po aplikaci cloprostenu se u všech krav za 72 až 96 h projevil výrazný příznak říje (100 %) s následnou ovulací ve skupině s acidózní zátěží u sedmi krav (63,6 %), u čtyř krav (36,4 %) byly poruchy ovulace, z toho u tří krav byly zjištěny cysty. Ve skupině se zátěží alkalózního typu ovulovalo šest krav (75 %) a dvě krávy neovulovaly (vznikly cysty). V kontrolní skupině všechny krávy (100 %) ovulovaly (tab. I).

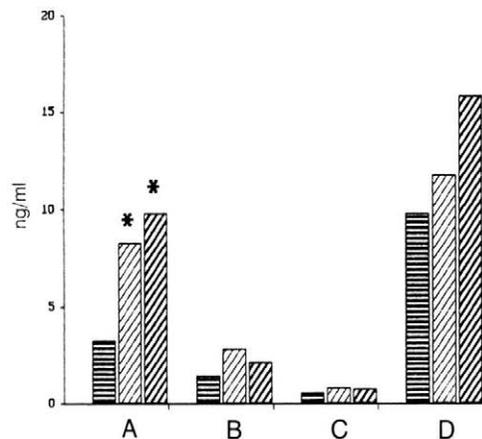
I. Nález na ovarích krav 7. až 8. den po říji indukované cloprostenu při rozdílné metabolické zátěži – Findings on cow ovaries on the 7th to 8th day after cloprostenol induced estrus at different metabolic stress

Typ metabolické zátěže ¹	n	Nález na ovarích krav 7. až 8. den po říji ⁶									
		CL		perzistující folikuly ⁷		cysty ⁸		bez CL, F i cyst ⁹		poruchy ovulace celkem ¹⁰	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Acidóza ³ 1 : 8,1	11	7	63,63	0	0	3	27,27	1	9,09	4	36,36
Alkalóza ⁴ 1 : 2,81	8	6	75,0	0	0	2	25,0	0	0	2	25,0
Kontrola ⁵ 1 : 4,5-5	11	11	100,0	0	0	0	0	0	0	0	0

¹metabolic stress type, ²digestible crude protein to digestible nutrients ratio, ³acidosis, ⁴alkalosis, ⁵control, ⁶finding on cow ovaries on 7th to 8th day after estrus, ⁷persistent follicles, ⁸cysts, ⁹without CL, F and cysts, ¹⁰ovulation disorders in total



1. Progesteron v krvi krav s acidózou a alkalózou při vyvolané říji – Progesterone concentrations in the blood of dairy cows with acidosis and alkalosis at induced estrus



2. Progesteron v mléce krav s acidózou a alkalózou při vyvolané říji – Progesterone concentrations in the milk of dairy cows with acidosis and alkalosis at induced estrus

Vysvětlivky pro obr. 1 až 3 – Explanatory notes to Figs. 1 to 3

■ kontrola – control
 ▨ acidóza – acidosis
 ▩ alkalóza – alkalosis

A = před aplikací – before application

B = po aplikaci 24 h – 24 h after application

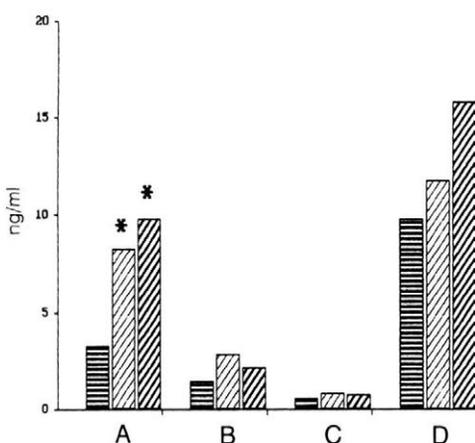
C = 72 až 96 h – 72 to 96 h after application

D = 7 až 8 dní – 7 to 8 days after application

Po indukci říje došlo u všech skupin krav k poklesu koncentrace progesteronu v krvi (obr. 1). Za sedm dnů po říji byla zjištěna statisticky významně nižší koncentrace progesteronu u krav s acidózou ($1,26 \pm 0,84$ ng/ml) proti kontrolní skupině ($3,12 \pm 1,98$ ng/ml). Podobný průběh byl zjištěn i u progesteronu v mléce (obr. 2), statisticky významné rozdíly byly však zjištěny jen před aplikací cloprostenolu.

Kortizol v krvi byl před aplikací cloprostenolu a za 24 h po aplikaci statisticky vysoce významně vyšší u krav s acidózou i alkalózou (obr. 3). Indukce říje vyvolala u kontrolní skupiny zvýšení koncentrace kortizolu v krvi. Rozdíl mezi odběrem před indukci říje a za 72 až 96 h byl vysoce významný, mezi odběrem před indukci říje a za sedm dnů po říji statisticky významný.

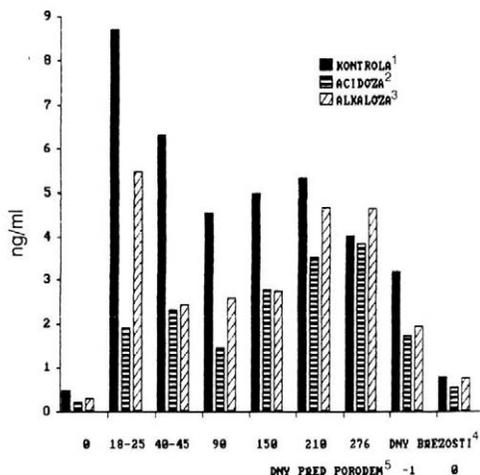
Výsledky sledování koncentrace progesteronu v krvi čtyř březích krav z každé skupiny po celou dobu gravidity shrnuje obr. 4. Koncentrace progesteronu v krvi u skupiny s acidogenní zátěží se pohybovaly v rozmezí od 1,9 do 3,8 ng/ml s průměrem $2,65 \pm 1,40$ ng/ml, ve skupině se zátěží alkalózního typu v rozmezí 2,55 až 5,43 ng/ml s průměrem $3,67 \pm 2,29$ ng/ml, v kontrolní skupině v rozmezí 4,0 až 8,68 ng/ml s průměrem $5,62 \pm 2,24$ ng/ml. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami kontrolních krav a krav s acidózou byly zjištěny při odběru za 18 až 25 dnů, za 40 až 45 dnů a za tři měsíce po úspěšné inseminaci a jeden den před porodem. U krav s alkalózou byla statisticky významně nižší koncentrace progesteronu v krvi za tři měsíce po inseminaci.



3. Kortizol v krvi při acidóze a alkalóze při vyvolané říji – Blood cortisol content at acidosis and alkalosis at induced estrus

DISKUSE

Vizuální kontrola chování zvířat a vyšetření pohlavních orgánů rektální palpací ukázaly, že u všech plemenic došlo za 48 až 96 h po aplikaci cloprostenolu k růstu folikulů a nástupu říje v souladu s údaji, které uvádějí Ku d l á č aj. (1977, 1979), Rowson aj. (1972), Liehr aj. (1972), Lauderdahle (1972) aj. Do určité míry rozdílné klinické nálezy na vaječnicích 7. až 8. den po říji u jednotlivých skupin můžeme dávat do vztahu s typem metabolické zátěže. Jestliže v kontrolní skupině bylo 7. až 8. den po říji zjištěno žluté tělísko u všech 11 plemenic (100 %), pak ve skupině vystavené zátěži alkalózního typu jen u 75 % a ve skupině se zátěží acidózního typu u 63,6 % krav. Tento výskyt poruch ovulace je sice poněkud nižší než jsme



4. Progesteron v krvi březích krav s acidózou a alkalózou – Progesterone concentrations in the blood of pregnant cows with acidosis and alkalosis

zjistili při experimentální acidóze vyvolané kyselinou octovou (Vinkler aj., 1992), nicméně opět potvrzuje, že acidózní stavy mají závažnější negativní vliv na průběh ovulace jak u indukované říje, tak při superovulaci.

V souladu s klinicky zjištěnými poruchami ovulace se vyvíjely i hladiny progesteronu v krvi a mléce krav. Před aplikací cloprostrenolu byly u kontrol a ve skupině s alkalózní zátěží srovnatelné ($2,26 \pm 1,35$ a $2,63 \pm 1,57$ ng/ml), ve skupině se zátěží acidózního typu dokonce nejvyšší ($3,32 \pm 3,04$ ng/ml). Směrodatné odchylky pak poukazují na velký rozptyl hladin progesteronu u jednotlivých zvířat, který asi vychází z rozdílné produkce progesteronu resp. metabolismu progesteronu. Nicméně hodnoty jsou v souladu s údaji jiných autorů (Dukes aj., 1974; Laming aj., 1975; Píčová, 1977; Coulson aj., 1979). Výrazný pokles hladin progesteronu pod 1 ng/ml za 24 h po aplikaci cloprostrenolu a dále až pod 0,53 ng/ml za 72 až 96 h je v souladu s lyzí žlutého těliska a nástupem říje u všech plemenic. Průměrné hladiny progesteronu zjišťované za sedm až osm dní po říji byly sice nejvyšší ve skupině se zátěží alkalózního typu $3,48 \pm 2,99$ ng/ml, ale mezi jednotlivými zvířaty byla velká variabilita. Nejnížší hladina byla zjištěna ve skupině vystavené zátěži acidózního typu ($1,26 \pm 0,84$ ng/ml) a rozdíl proti kontrole, průměr $3,12 \pm 1,98$ ng/ml, byl statisticky významný ($P < 0,05$). Nízké hladiny progesteronu při metabolické zátěži acidózního typu jsou obdobné jako při acidóze vyvolané kyselinou octovou $1,49 \pm 1,63$ ng/ml (Vinkler aj., 1992). Hladiny progesteronu stanovené v mléce jsou opět v souladu se změnami při indukci říje cloprostrenolem. Rozdíly v průměrných hladinách progesteronu mezi kontrolní skupinou a pokusnými skupinami, zejména nízké hladiny progesteronu u krav

se zátěží acidózního typu v průběhu gravidity mohou souviset se skutečností, že u krav se zátěží acidózního typu bylo zvýšené množství kyseliny mléčné a těkavých mastných kyselin, ale byl narušen jejich proporcionální poměr, kdy molární proporce kyseliny octové klesly pod referenční hodnoty a zvýšila se proporce kyseliny propionové a valerové. Nižší hladiny kyseliny octové pak mohou souviset se sníženou produkcí steroidních hormonů (Eik-Nes, 1975; Gamčík aj., 1980). U skupiny dojníc se zátěží alkalózního typu by pak mohla být určitá souvislost nižších hladin progesteronu s nižší produkcí celkových těkavých mastných kyselin. U obou pokusných skupin byly též zjištěny nižší hladiny cholesterolu, který je po acetaátu dalším stupněm pro tvorbu steroidních hormonů.

Hladiny kortizolu v krvi krav (obr. 3) jsou na počátku pokusu před vyvoláním říje v kontrolní skupině velmi nízké ($5,56 \pm 4,27$ ng/ml) zatímco v obou pokusných skupinách dvojnásobně ($12,35$ a $14,34$ ng/ml) a rozdíly jsou statisticky vysoce významné ($P < 0,01$). Svědčí o určitém zátěžovém vlivu obou pokusných krmných dávek na vnitřní prostředí organismu dojníc a aktivizační kompenzačních mechanismů. Nástup indukované říje vedl k zvýšení hladin kortizolu u kontrolní skupiny. V podstatě jsou však hladiny kortizolu srovnatelné s údaji Kudláče (1988), který udává pro krávy po říji hladiny kortizolu v krvi dojníc od 10,8 do 23,2 ng/ml.

LITERATURA

- BOUDA, J. – JAGOŠ, P. – DVOŘÁK, R. – ILLEK, J. – HOFÍREK, B.: Dynamika acidobazických změn v průběhu akutní acidózy u skotu. *Vet. Med. (Praha)*, 22, 1977: 273–280.
- COULSON, A. – NOAKES, D. E. – COCKRILL, T. – HAMER, J.: Plasma progesterone and luteinizing hormone levels in cattle after synchronisation of oestrus with dinoprost. *Vet. Rec.*, 105, 1979: 440–442.
- DUKES, M. – RUSSEL, W. – WALPOLE, A. L.: Potent luteolytic agents related to prostaglandin $F_2\alpha$. *Nature*, 250, 1974: 330–331.
- DVOŘÁK, R. – JAGOŠ, P.: Syndrom nízké tučnosti mléka u dojníc. In: Sbor. Ref. Biologické aspekty vysoké produkce mléka. České Budějovice, ČSVTS 1985: 109.
- EIK-NES, K. B.: Biosynthesis and secretion of testicular steroids. In: GREEP, R. O. – ASRWOOD, E. B. (eds.): *Handbook of Physiology*. Baltimore, Williams and Wilkins 1975: 95–115.
- GAMČÍK, P. – SAKALA, J. – LOJDA, L.: Plodnost hovězího dobytka a jej poruchy. Bratislava, Příroda 1980. 497 s.
- CHALMERS, M. E. – JEFFRAY, A. F. – WHITE, F.: Movements of ammonia following intraruminal administration of urea or asen. *Proc. Nutr. Soc.*, 37, 1971: 7.
- JAGOŠ, P. – BENDA, J. – BOUDA, J. – HOJOVEC, J. – KRAJZA, V. – KRÁL, J. – KUBÍN, J. – JAROŠ, M. – KOUBA, V. – MEISSNER, V. – RYŠÁNEK, M. – ZIMA, L.: Skot - zdravotní problematika velkochovů. Praha, SZN 1975. 279 s.

- JAGOŠ, P. – HOFÍREK, B. – HAMŠÍK, V. – PEROUTKOVÁ, Z.: Význam vyšetření bachorové tekutiny v diagnostice subklinické bachorové dysfunkce. *Vet. Med. (Praha)*, 22, 1977: 153–160.
- KUDLÁČ, E.: Fyziologie a patologie puerperia a ovlivňování reprodukčních funkcí v postpartálním období u krav a prasnic. [Doktorská disertace.] Brno 1988. – Vysoká škola veterinární.
- KUDLÁČ, E. – VRTĚL, M. – VINKLER, A.: Synchronizace říje u jalovic a krav cloprostenoem (ICI-80996-syntetický analog PGF₂α). *Vet. Med. (Praha)*, 22, 1977: 655–664.
- KUDLÁČ, E. – VRTĚL, M. – VINKLER, A.: Naše poznatky o terapeutickém použití syntetického analogu prostaglandinu cloprostenoem (Spec. Estrumate) při některých poruchách plodnosti skotu. *Veterinářství*, 29, 1979: 64–72.
- LAMMING, G. E. – HAFS, H. D. – MANN, J. G.: Hormonal control of reproduction in cattle. *Proc. Brit. Soc. Anim. Prod.*, 4, 1975: 71–78.
- LAUDERDAHLE, J. W.: Effects of PGF₂ on pregnancy and oestrous of cattle. *J. Anim. Sci.*, 35, 1972: 24.
- LIEHR, R. A. – MARION, G. B. – OLSEN, H. H.: Effects of prostaglandin – on cattle oestrous cycles. *J. Anim. Sci.*, 35, 1972: 247–251.
- MATOUŠKOVÁ, D. – CHALUPA, J. – CÍGLER, M. – HRUŠKA, K.: Statistický a grafický systém STAT Plus verze 1.01 – uživatelská příručka. Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1992. 168 s.
- PAYNE, J. M.: A statistical appraisal of the results of metabolic profile tests in 75 dairy herds. *Brit. Vet. J.*, 129, 1973: 370–381.
- PÍCHOVÁ, D.: Kontrola estru a fertilitní inseminace pomocí RIA stanovení progesteronu v mléce. [ZZ DVÚ č. ŽV 329-2-01.] Praha-Uhřetíněves, Výzkumný ústav živočišné výroby 1977.
- PISKAČ, A. – KAČMÁR, P. – BARTÍK, M. – PROCHÁZKA, Z. – SVOBODOVÁ, Z. – ŠIKULA, J.: Veterinární toxikologie. Praha, SZN 1985. 256 s.
- PRASAD, J. – AHLUWALIA, S. S. – JOSHI, P.: A note on clinicobiochemical aspects on experimental indigestion in buffaloes. *Indian J. Anim. Sci.*, 43, 1973: 245–248.
- ROWSON, L. E. A. – TERVIT, H. R. – BRAND, A.: Synchronization of oestrus in cattle by means of prostaglandin F₂α. In: *Proc. VIIth Congr. Anim. Reprod., Artif. Ins.*, 1972: 865–867.
- SACHAN, D. S.: Effects of low and high protein diets on the induction of drug metabolizing enzymes in rat liver. *J. Nutr.*, 105, 1975: 1631.
- SLANINA, L.: Klinická diagnostika vnitřních chorob hospodářských zvířat. 3. vyd. Bratislava, Příroda 1985. 493 s.
- STUPNICKI, R. – ZAJAC, H. – MADEJ, A.: Direct radioimmunoassay of progesterone in plasma of farm animals. *Endocrinology*, 66, 1975: 145–151.
- VINKLER, A. – DVOŘÁK, R. – ZENDULKA, I. – KUDLÁČ, E.: Ovariální odpověď a koncepční schopnost krav při acidose vyvolané kyselinou octovou. *Vet. Med. (Praha)*, 37, 1992: 129–139.
- VIŠEK, W. J.: Ammonia: Its effects on biological systems, metabolic hormones and reproduction. *J. Dairy Sci.*, 67, 1984: 481–498.
- VRZGULA, L.: Poruchy látkového metabolismu hovädzieho dobytku v intenzívných a špecializovaných podmienkach chovu. In: *Zbor. Ref. Aktuálne otázky ochrany a kontroly zdravia hospodárskych zvierat v intenzívnej živočišnej veľkovýrobe*. Košice, Vysoká škola veterinárska 1974.

Došlo 7. 12. 1994

Kontaktní adresa:

Doc. MVDr. Antonín V i n k l e r, CSc., Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1–3, 612 42 Brno, Česká republika
Tel. 05/41 32 11 07, fax 05/41 21 11 51

INZERCE

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

Bližší informace získáte na adrese:

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

EFFECT OF VITAMIN E ON CORTISOL, LACTATE, AND ACID BASE BALANCE IN TRANSPORTED CALVES

VPLYV VITAMÍNU E NA HLADINU KORTIZOLU, LAKTÁTU A ACIDOBÁZICKÚ ROVNOVÁHU U TELIAT VYSTAVENÝCH TRANSPORTNEJ ZÁŤAŽI

P. Mudroň¹, G. Kováč¹, P. Bartko¹, J. Choma², I. Žežula³

¹University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

²Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

³Faculty of Science of P. J. Šafárik University, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: The objective of this study was to examine the effect of vitamin E administration on plasma levels of cortisol and lactate, and on acid base balance in transported calves. In the study, eight calves, aged approx. ten days, divided into two groups, were used. 20 mg of tocopherol-acetate per kg body weight were administered orally to each of the four experimental calves 24 hours before loading. The calves were transported by road for 3 hours. Blood samples collected before and after the transportation were examined for acid base balance, lactate, and plasma vitamin E and cortisol levels. The administration of vitamin E led to a decrease of cortisol levels in 24 hours (from 7.6 ± 9.5 to 4.2 ± 0.2 nmol/l) as well as to a significant increase ($p < 0.05$) of plasma vitamin E levels 26 h after administration (from 2.52 ± 1.36 to 12.28 ± 6.14 μ mol/l). There was no difference between the groups in cortisol response due to transportation stress (Tab. III). The transportation caused typical stress changes in lactate levels and acid base balance (lactacidemia and the tendency to acidosis, Tab. III, IV). There was approx. threefold increase in plasma lactate concentrations due to transportation (from 2.49 ± 0.69 to 6.35 ± 3.75 mmol/l). The results of the present study demonstrated metabolic changes which had been reported to be typical of „mild physiological stress reaction“. In the present study, vitamin E had no significant effect on plasma levels of cortisol, and lactate, and acid-base balance.

vitamin E; transportation; stress; calves; cortisol; lactate; acid base balance

ABSTRAKT: Študovali sme účinok perorálne podaného vitamínu E na hladinu kortizolu, laktátu a parametre acidobázickej rovnováhy u teliat vystavených transportnej záťaži. Štyri teľatá boli ošetrované Combinalom E v dávke 20 mg/kg živej hmotnosti. Spolu so štyrmi kontrolnými teľatami boli prevážané tri hodiny priemernou rýchlosťou 40 km/h. Hladina vitamínu E dosiahla v pokusnej skupine maximálnu koncentráciu $12,28 \pm 6,14$ μ mol/l 26 hodín po podaní prípravku. Transport vyvolal v hladinách kortizolu, laktátu a v ukazovateľoch acidobázickej homeostázy zmeny typické pre miernu stresovú reakciu. K významnému vzostupu plazmatického kortizolu došlo počas transportu len v pokusnej skupine (z $4,42 \pm 0,52$ na $8,43 \pm 1,32$ nmol/l; $p < 0,05$), v ktorej bol zaznamenaný jeho nesignifikantný pokles po aplikácii vitamínu E. V priebehu troch hodín po záťaži došlo k významnému vzostupu ($p < 0,05$) koncentrácie laktátu v oboch skupinách teliat. Po transporte bol zaznamenaný posun hodnôt acidobázickej rovnováhy smerom k acidóze (pokles BE a štandardného bikarbonátu). Aplikácia vitamínu E nemala významný vplyv na hladinu kortizolu, laktátu a dynamiku parametrov acidobázickej homeostázy.

vitamin E; transport; stres; teľatá; kortizol; laktát; acidobázická rovnováha

ÚVOD

Je všeobecne známe, že vonkajšie stresory nezávisle od ich pôvodu aktivujú činnosť hypofýzy a nadobličiek (M o b e r g, 1985). Ich hormóny spúšťajú celý rad metabolických a imunitných reakcií, ktorých úlohou je ochrana organizmu ako celku. V prípade, že tieto procesy prebiehajú s príliš vysokou intenzitou, môže dôjsť aj k nepriaznivému účinku na homeostázu (B r e a z i l e, 1988). Krátkodobé alebo intenzitou mierne stresory vyvolávajú dočasný vzostup hladiny glukokortikoidov, sprevádzaný klinickými stresovými symptómami (ta-

chykardia, tachypnoe, mydriasis atď.) a zmenami v krvi (hemokoncentrácia, laktacidémia atď.), čo je charakteristické pre „fyziologickú stresovú reakciu“. Chronické vysoké hladiny glukokortikoidov však okrem výrazných metabolických zmien vedú aj k oslabeniu imunitného systému („patologická stresová reakcia“ – B i c k h a r d t, 1992).

Transport predstavuje jeden z najčastejších fyzikálnych a psychických stresorov, akému sú hospodárske zvieratá vystavované. Výskyt zdravotných porúch u transportovaných zvierat je priamo závislý od podmienok, za akých sa preprava uskutočňuje (F r a n k

a Smith, 1983). Predpokladá sa, že pri sekrécii ACTH v adenohypofýze zohráva určitú, dosiaľ bližšie neurčenú, úlohu enzým fosfolipáza A₂ katalyzujúca štiepenie kyseliny arachidonovej v biologických membránach. Jej aktivita môže byť inhibovaná v prítomnosti látok s antioxidantným účinkom (Abou-Samra a i., 1986). Suplementácia vitamínom E, ako prirodzeným antioxidantom, viedla u teliat (Reddy, 1987) a u myši (Lim, 1981) k poklesu hladín glukokortikoidov v krvi.

Cieľom predkladanej práce bolo posúdiť vplyv aplikácie vitamínu E na stresovú reakciu teliat vystavených krátkodobej transportnej záťaži.

MATERIÁL A METÓDY

Pokusné zvieratá a organizácia experimentu

V pokuse sme použili osem, v priemere 10-dňových teliat, nížinného čierostrakatého plemena, ktoré boli počas doby trvania pokusu ustajnené v boxoch na klinike.

Krmná dávka pozostávala z mliečnej náhražky Laktavit (tab. I), o celkovom objeme 9 l na teľa a deň, a ďalej z lúčneho sena a Doplnkovej zmesi pre odchov teliat – štartérnej (TKŠ; tab. II) podávaných *ad libitum*.

Štyri teľatá dostali 24 hodín pred transportom *per os* Combial E (Tocopherolum aceticum 40 mg in 1 ml) v dávke 20 mg tokoferolacetátu na kg živej hmotnosti. Ostatné štyri teľatá slúžili ako kontrola.

Všetky teľatá boli transportované po dobu troch hodín na nákladnom automobile priemernou rýchlosťou 40 km/h.

Odbery krvi a laboratorné analýzy

Krv pre laboratorné analýzy bola odoberaná z *v. jugularis* pred aplikáciou vitamínu E (I), bezprostredne pred transportom (II), jedna (III) a dve (IV) hodiny po jeho začatí, ďalej ihneď (V), tri (VI), 24 (VII), 48 (VIII)

I. Zloženie a obsah živín mliečnej krmnej zmesi Laktavit – The composition and nutrient content of milk replacer Laktavit

Komponent/živina ¹	%	g/kg
Sušené odstredené mlieka ²	65	
Tuková prísada ³	18	
Sušená srvátka ⁴	7	
Laktamyl	7	
Glukóza ⁵	2	
Vitalakt	1	
Sušina ⁶		860
SNL ⁷		240
Tuk ⁸		120

¹ingredient/nutrient, ²skim milk powder, ³fat additive, ⁴whhey powder, ⁵glucose, ⁶dry matter, ⁷digestible crude protein, ⁸fat

hodín a sedem dní (IX) po jeho ukončení. V krvi získanej zo všetkých deviatich odberov bola meraná hladina kortizolu a ukazovatele acidobázickej homeostázy, z odberov pred a po transporte boli stanovené hladiny vitamínu E. V plazme získanej z rovnakých odberov, s výnimkou I., bola meraná koncentrácia laktátu. Vzorky plazmy a séra boli do doby merania uskladnené pri teplote -24 °C.

Analýza vitamínu E

Vitamín E bol v plazme meraný spektrofotometrickou metódou, ktorú uvádzajú Kováč a i. (1987).

Stanovenie kortizolu

Pre stanovenie koncentrácie kortizolu v plazme RIA metódou bol použitý kit CIS Bioindustries (Francie).

Meranie koncentrácie laktátu

Koncentrácia laktátu bola v plazme stanovená pomocou testov Bio-Lachema Brno.

Acidobázická homeostáza

Hodnoty pH krvi, prebytku báz (BE), parciálneho tlaku kyslíčnika uhličitého (pCO₂) a štandardného bikarbonátu (ŠB) boli merané na Astrupovom prístroji

II. Zloženie a obsah živín Doplnkovej zmesi pre odchov teliat-štartérnej – The composition and nutrient content of a starter Supplemental Mixture for Calves

Komponent/živina ¹	%	g/kg
Extrahovaný šrot podzemnicový II ²	17,5	
Extrahovaný šrot sójový ³	5,0	
Pšeničná krmná múka ⁴	12,0	
Pšenica ⁵	20,0	
Jačmeň ⁶	30,0	
Ovos ⁷	4,0	
Úsušky bielkovinové ⁸	8,0	
Soľ krmná ⁹	0,5	
MKP 3 ¹⁰	2,0	
Doplnok biofaktorov (T) ¹¹	1,0	
Sušina ¹²		860
SNL ¹³		165
ŠJ ¹⁴		663
Vláknina ¹⁵		73
Ca		8,4
P		5,6

¹ingredient/nutrient, ²groundnut meal II, ³soybean meal, ⁴wheat feed-grade flour, ⁵wheat, ⁶barley, ⁷oats, ⁸protein dried products, ⁹fodder salt, ¹⁰milk feed additive, ¹¹biofactor supplement (T), ¹²dry matter, ¹³digestible crude protein, ¹⁴starch units, ¹⁵fiber

ABL4 za použitia 1 ml sklenených striekačiek vybavených sklenenou guľôčkou a prepláchnutých roztokom heparínu (Chyła, 1987).

Štatistické vyhodnotenie

Pre vyhodnotenie dosiahnutých výsledkov bol použitý štatistický program SPSS, pomocou ktorého bola robená dvojrozmerná analýza rozptylu na testovanie vplyvu podania vitamínu E (1. faktor = skupina) a vplyvu času (2. faktor = čas) na sledované ukazovatele. V prípade, že analýza rozptylu potvrdila významný vplyv 1. faktora ($p < 0,05$), boli ďalej rozdiely medzi aritmetickými priermi jednotlivých skupín v rovnakom čase testované Studentovým *t*-testom. Ak analýza rozptylu ďalej ukázala signifikantný vplyv času na testované parametre, párovým *t*-testom sa porovnávali aritmetické priemery jednotlivých odberov s prvým, prípadne druhým odberom.

VÝSLEDKY

Východzie hladiny vitamínu E v plazme pokusných a kontrolných teliat ($2,25 \pm 1,38$ resp. $3,96 \pm 2,36$ $\mu\text{mol/l}$) sa významne nelíšili (tab. III). Aplikácia Combinalu E mala za následok signifikantnú zmenu koncentrácie vitamínu E v priebehu pokusu ($p < 0,001$). Najvyššia priemerná hladina vitamínu $12,28 \pm 6,14$ $\mu\text{mol/l}$, ktorá sa významne líšila od východzej ($p < 0,05$), bola nameraná pri V. odbere, t. j. približne 26 hodín po aplikácii Combinalu E. Vyššie hladiny ($p < 0,05$) tokoferolu sa v plazme pokusnej skupiny od II. odberu udržali až do ukončenia experimentu ($7,55 \pm 2,12$ $\mu\text{mol/l}$). V kontrolnej skupine sa hladina vitamínu E v priebehu pokusu udržiavala v rozpätí $3,02$ až $5,04$ $\mu\text{mol/l}$.

Transportná záťaž nevedla k významným zmenám v hladinách plazmatického kortizolu (tab. III) teliat oboch skupín ($p = 0,25$). V pokusnej skupine nastal zreteľný pokles kortizolu po ošetroaní Combinalom E (z $7,16 \pm 9,75$ na $4,42 \pm 0,52$ nmol/l). Koncentrácia kortizolu dosiahla počas transportu v pokusnej skupine svoje maximum ($9,85 \pm 5,01$ nmol/l) jednu hodinu po začatí prevozu a v kontrolnej ($10,29 \pm 2,69$ nmol/l) bezprostredne po jeho ukončení. Tri hodiny po transporte klesol kortizol na minimálne hodnoty v oboch skupinách ($4,23 \pm 3,18$ resp. $5,6 \pm 3,43$ nmol/l).

Transportná záťaž vyvolala v oboch skupinách mierne posun acidobázickej rovnováhy smerom k acidóze (tab. IV), čo sa prejavilo najmä poklesom prebytku báz, štandardného bikarbonátu a pCO_2 počas a hlavne po transporte ($p < 0,01$). Tento trend pretrvával aj v ďalšom priebehu.

Hladina laktátu stúpila v pokusnej a kontrolnej skupine (tab. III) z východziech hodnôt nameraných tesne pred transportom ($2,49 \pm 0,69$ resp. $2,18 \pm 0,34$ mmol/l) na maximálne koncentrácie zaznamenané v oboch skupinách tri hodiny po vyození teliat ($8,88 \pm 1,47$ resp.

$7,50 \pm 0,42$ mmol/l). Nasledoval výrazný pokles na hladiny blízke počiatočným. Štatistická významnosť dynamiky laktátu bola potvrdená analýzou rozptylu ($p < 0,001$).

Medzi pokusnou a kontrolnou skupinou neboli zaznamenané významné rozdiely v hladinách laktátu a kortizolu, ako aj v parametroch acidobázickej homeostázy.

DISKUSIA

Na základe porovnania koncentrácií vitamínu E nameraných v plazme teliat na začiatku experimentu s referenčným rozpätím $0,69$ až $4,65$ $\mu\text{mol/l}$ udávaných autormi Vrzgula a Sokol (1987) pre teľatá do troch mesiacov bolo možné konštatovať, že tak pokusné ako aj kontrolné zvieratá boli dostatočne saturované tokoferolom. Na rozdiel od predchádzajúcich zistení (Kováč, 1977; Mudroň a i., 1992) bola v našom pokuse maximálna hladina vitamínu E zaznamenaná až po 24 hodinách po aplikácii Combinalu E. Vzhľadom na časový harmonogram odberov je však možné, že skutočné maximum nebolo zachytené. Opätovne sa potvrdila dobrá využiteľnosť tokoferolacetátu z prípravku Combinalu E u teliat na mliečnej výžive (Kováč, 1978). Výhoda perorálneho podávania prípravkov vitamínu E spočíva aj v rýchlejšej deesterifikácii acetátových zlúčenín (najviac komerčne používané) v stene tenkého čreva a tým aj v rýchlejšej využiteľnosti aktívneho tokoferolu. Pri parenterálnej aplikácii trvá proces deacylácie niekoľkonásobne dlhšie (Hidiroglou a Charmley, 1990).

Zmeny v hladinách cirkulujúceho kortizolu u zvierat vystavených pôsobeniu stresora sú považované za vhodný fyziologický indikátor stupňa zataženia organizmu (Herd, 1989). Murata a i. (1987) zaznamenali u teliat významné zvýšenie plazmatického kortizolu bezprostredne po štvorhodinovom transporte. Zvýšené hladiny 17-OHCS popísali Jedlička a i. (1982) u jatočných býkov privezených na bitúnok zo vzdialenosti 5 km. K podobným výsledkom dospeli aj Tarrant a i. (1988) u býkov vystavených štvorhodinovému transportu. Naproti tomu v experimente zameranom na posúdenie vplyvu dlhodobej prepravy na hormonálnu a metabolickú odozvu býkov nenastal po 12 a 24-hodinovom transporte vzostup kortizolu v krvi. K podobným výsledkom dospeli aj Mormede a i. (1982) u teliat prepravovaných 1–8 hodín. V našom sledovaní došlo k nevýznamnému zvýšeniu hladiny kortizolu počas a tesne po ukončení transportu. Rozdiely v reakcii zvierat na transportnú záťaž vyplývajú tak z experimentálnych podmienok ako aj z individuálnych reakcií. Naše sledovanie potvrdzuje skutočnosť, že zvýšené hladiny glukokortikoidov pretrvávajú len krátku dobu (spravidla len niekoľko hodín) po odznení záťaže. Rýchly pokles je pravdepodobne spôsobený krátkym počasom glukokortikoidov (Locatelli a i., 1989). Zvýšené hladiny kortizolu namerané 24 a 48 hodín po

III. Koncentrácia vitamínu E, kortizolu a laktátu u transportovaných teliat po podaní Combinálu E ($\bar{x} \pm s$) – The concentrations of vitamin E, cortisol and lactate in transported calves after Combial E administration ($\bar{x} \pm s$)

Odber ¹	Skupina ²		Parameter ³		
	E (n = 4)	K (n = 4)	vitamín E ⁴ ($\mu\text{mol/l}$)	kortizol ⁵ (nmol/l)	laktát ⁶ (mmol/l)
I.	E		2,52 \pm 1,36	7,16 \pm 9,75	N
	K		3,97 \pm 2,33	8,70 \pm 2,62	N
Aplikácia ⁷					
II.	E		10,84 \pm 5,62x	4,42 \pm 0,52	2,49 \pm 0,69
	K		3,02 \pm 2,32y	8,42 \pm 7,31	2,18 \pm 0,34
Transport ⁸					
III.	E		N	9,85 \pm 5,01	N
	K		N	8,40 \pm 3,45	N
IV.	E		N	8,43 \pm 1,32y	N
	K		N	10,05 \pm 3,32	N
V.	E		12,28 \pm 6,14x	8,32 \pm 5,44	6,35 \pm 3,75
	K		4,32 \pm 2,62	10,29 \pm 2,69	6,08 \pm 2,44
VI.	E		10,84 \pm 6,22	4,23 \pm 3,18	8,88 \pm 1,47y
	K		5,04 \pm 4,96	5,60 \pm 3,73	7,50 \pm 0,72y
VII.	E		9,88 \pm 4,12x	4,37 \pm 2,58	1,99 \pm 0,38
	K		4,45 \pm 2,46	10,77 \pm 7,62	1,91 \pm 0,56
VIII.	E		8,07 \pm 3,74	10,08 \pm 3,69	3,48 \pm 0,78y
	K		4,06 \pm 2,73	10,48 \pm 6,09	3,06 \pm 0,82
IX.	E		7,55 \pm 2,12x	6,64 \pm 4,18	3,90 \pm 0,39
	K		4,16 \pm 1,52	6,39 \pm 2,81	3,04 \pm 0,76
Skupinový ⁹ (p)			0,09	0,38	0,38
Časový efekt ¹⁰ (p)			<0,001	0,25	<0,001

Vysvetlivky pre tab. III a IV – Explanatory notes to Tabs. III and IV:

* = skupiny se lišia – differences between the groups; $p < 0,05$

x = odbery sa lišia od I. odberu – samplings are different from 1st sampling; $p < 0,05$

y = odbery sa lišia od II. odberu – samplings are different from 2nd sampling; $p < 0,05$

E = podaný Combial E – Combial E administration

K = kontrola – control

N = nemerané – not determined

Odbery – samplings:

I. pred aplikáciou – before administration

II. tesne pred transportom (T) – instantly before transportation (T)

III. 1 h po začatí T – 1 h after T beginning

IV. 2 h po začatí T – 2 h after T beginning

V. ihneď po skončení T – instantly after T termination

VI. 3 h po T – 3 h after T

VII. 24 h po T – 24 h after T

VIII. 48 h po T – 48 h after T

IX. 7 dní po T – 7 days after T

¹sampling, ²group, ³parameter, ⁴vitamin E, ⁵cortisol, ⁶lactate, ⁷administration, ⁸transportation, ⁹group, ¹⁰time effect

ukončení transportu je možné pripísať negatívnej skúsenosti zvierat s manipuláciou pri odbere krvi (CROOKS a i., 1979). Napriek určitému vplyvu podaného Combinálu E na hladinu kortizolu u pokusných teliat, ktorý sa prejavil jeho poklesom 24 hodín po aplikácii, nie je možné vzhľadom na štatistickú nevýznamnosť tejto zmeny vidieť jej príčinu jednoznačne v účinku vitamínu E.

Stresová reakcia sa nevyznačuje len zmenami hematologického a hormonálneho profilu, ale predstavuje

komplexnú metabolickú odpoveď (NOCKELS, 1990). V závislosti na intenzite stresoru sa výrazné zmeny pozorujú najmä v acidobázickej homeostáze a koncentrácii laktátu (BARTKO a KOVÁČ, 1982; BARTKO, 1984). Nízke pH krvi, ktoré sa počas celého sledovania udržiavalo pod referenčným rozpätím (VRZGULA a i., 1990), ako aj pokles prebytku báz zaznamenal počas transportu teliat aj MICHNA (1978), ktorý však na rozdiel od našich výsledkov pozoroval aj zvýšenie pCO₂. SCHAEFER a i. (1988) pozorovali u transpor-

IV. Acidobázická homeostáza (pH, prebytok báz [BE], štandardný bikarbonát [ŠB], parciálny tlak CO₂ [pCO₂]) u transportovaných teliat po podaní Combinálu E ($\bar{x} \pm s$) – Acid-base homeostasis (pH, base exchange [BE], standard bicarbonate [ŠB], partial CO₂ pressure [pCO₂]) in transported calves after Combial E administration ($\bar{x} \pm s$)

Odber ¹	Skupina ²		Parameter ³			
	E (n = 4) K (n = 4)		pH (logmol/c)	BE (mmol/l)	pCO ₂ (kPa)	ŠB (mmol/l)
I.	E		7,34 ± 0,01	-0,50 ± 2,29	6,44 ± 0,44	23,4 ± 1,89
	K		7,32 ± 0,01	-0,70 ± 1,58	6,62 ± 0,29	23,2 ± 1,48
Aplikácia ⁴						
II.	E		7,33 ± 0,02	-0,75 ± 1,81	6,45 ± 0,78	23,1 ± 1,48
	K		7,31 ± 0,03	-1,80 ± 2,66	6,51 ± 0,63	22,2 ± 2,14
Transport ⁵						
III.	E		7,35 ± 0,04	-2,62 ± 1,21	5,44 ± 0,66	21,7 ± 1,13
	K		7,36 ± 0,03	-2,85 ± 0,99	5,55 ± 0,21x	21,6 ± 0,82
IV.	E		7,36 ± 0,01x	-3,18 ± 1,44y	5,16 ± 0,36xy	21,3 ± 1,19y
	K		7,34 ± 0,02	-3,20 ± 1,58x	5,46 ± 0,16xy	21,3 ± 1,26x
V.	E		7,32 ± 0,07	-3,40 ± 3,14	5,91 ± 0,62	20,9 ± 2,56
	K		7,31 ± 0,04	-3,65 ± 2,65y	5,41 ± 0,44xy	19,6 ± 1,99xy
VI.	E		7,35 ± 0,03*	-2,53 ± 1,44	5,73 ± 0,69	21,7 ± 1,14
	K		7,30 ± 0,03	-2,80 ± 1,89x	6,24 ± 1,09	21,4 ± 1,50x
VII.	E		7,34 ± 0,01	-1,85 ± 0,61	5,82 ± 0,23x	21,9 ± 1,18
	K		7,32 ± 0,03	-3,25 ± 1,51	5,82 ± 0,76	21,1 ± 1,13
VIII.	E		7,34 ± 0,01	-2,90 ± 1,46	5,53 ± 0,56	21,5 ± 1,22y
	K		7,32 ± 0,02	-3,65 ± 1,24	5,75 ± 0,74	20,8 ± 0,97
IX.	E		7,33 ± 0,02	-3,55 ± 1,56	5,59 ± 0,23x	21,0 ± 1,19
	K		7,33 ± 0,03	-4,03 ± 1,26x	5,49 ± 0,22x	20,7 ± 0,94
Skupinový ⁶	(p)		0,13	0,49	0,30	0,38
Časový efekt ⁷	(p)		0,78	<0,01	<0,01	0,25

¹sampling, ²group, ³parameter, ⁴administration, ⁵transportation, ⁶group, ⁷time effect

tovaného mladého dobytku okrem nízkeho prebytku báz aj vzostup koncentrácie bikarbonátov a pCO₂. Nižší prebytok báz, pokles koncentrácie štandardného bikarbonátu a pCO₂ v priebehu a počas transportu poukazujú na acidogénny účinok telesnej námahy sprevádzaný spravidla zvýšenou tvorbou laktátu, ketolátok, lipolýzou a pri chronickom strese aj mobilizáciou aminokyselín (Nockels, 1990). Signifikantne vyššie hladiny laktátu namerané ihneď a tri hodiny po ukončení transportu svedčia o zvýšenej svalovej záťaži. Podobnú dynamiku laktátu popísali pri transportnej záťaži Jedlička a i. (1982), Mitchell a i. (1988), Groth a Grämzer (1977) a Schaefer a i. (1992). Na intenzitu tvorby laktátu počas záťaže má vplyv aj dlhšie trvajúce obmedzenie pohybu v predchádzajúcom období spojené s redukciami prekrvenia a mitochondriálnej aktivity, čo zvyšuje riziko nástupu intenzívneho anaeróbného metabolizmu pri náhle zvýšenej námahe (Kob, 1974).

Záverom možno konštatovať, že u teliat perorálne ošetrených Combinálom E a stresovaných transportom došlo bezprostredne po jeho podaní k poklesu ($p > 0,05$) hladiny kortizolu, pričom v ďalšom priebehu už nebol zaznamenaný žiadny účinok vitamínu E na jeho dyna-

miku. Hladina laktátu a parametre acidobázickej rovnováhy sa menili vplyvom transportnej záťaže, avšak neboli ovplyvnené vitamínom E.

LITERATÚRA

- ABOU-SAMRA, A. B. – CATT, K. J. – AGUILERA, G.: Role of arachidonic acid in the regulation of adrenocorticotropin release from rat anterior pituitary cell cultures. *Endocrinology*, 119, 1986: 1427–1431.
- BARTKO, P.: Acidobázická homeostáza u prežívavcov a ošípaných. [Doktorská dizertácia.] Košice 1984. – Univerzita veterinárneho lekárstva.
- BARTKO, P. – KOVÁČ, G.: Effect of physical training on the acidobasis homeostasis in the blood of swine. *Folia Vet.*, 26, 1982: 115–129.
- BICKHARDT, K.: Kompendium der allgemeinen inneren Medizin und Pathophysiologie für Tierärzte. Berlin, Hamburg, Verlag Parey 1992.
- BREAZILE, J. E.: The physiology of stress and its relationship to mechanisms of disease and therapeutics. *Veter. Clin. N. Amer. Fd. Anim. Pract.*, 4, 1988: 441–480.
- CHYLA, M. – BUDJAČOVÁ, D. – ŠTERBÁKOVÁ, A.: Korelácia medzi acidobázickými hodnotami krvi, zistená

- Astrupovým prístrojom ABL4, a možnosti vyšetrenia krvi po uskladnení. *Vet. Med. (Praha)*, 32, 1987: 181–186.
- CROOKSHANK, H. R. – ELISSALDE, M. H. – WHITE, R. G.: Effect of transportation and handling of calves upon blood serum composition. *J. Anim. Sci.*, 48, 1979: 430–435.
- FRANK, G. H. – SMITH, P. C.: Prevalence of *Pasteurella haemolytica* in transported calves. *Amer. J. Vet. Res.*, 44, 1983: 981–985.
- GROTH, W. – GRÄNZER, W.: Transportbedingte Veränderungen von Blutparametern bei Mastkälbern im Vergleich mit frühentwöhnten Kälbern. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 84, 1977: 89–93.
- HERD, R. M.: Serum cortisol and „stress“ in cattle. *Aust. Vet. J.*, 66, 1989: 341.
- HIDIROGLOU, M. – CHARMLEY, E.: Vitamin E concentrations in blood plasma of sheep and in sheep tissues after a single intraruminal or intraperitoneal administration of DL- α -tocopheryl acetate. *Res. Vet. Sci.*, 48, 1990: 158–161.
- JEDLIČKA, J. – MOJTO, J. – VANČIŠIN, J. – KMEŤOVÁ, E. – FOLTYS, V. – PÁLENÍK, Š.: Účinek predjatočných stresov na hladiny noradrenalinu, adrenalinu, glukózy, 17-OHCS, NEMK a laktátu u hovädzieho dobytká. *Živoč. Výr.*, 27, 1982: 287–295.
- KOLB, H.: Biochemische Anpassungsvorgänge bei Belastungen beim Schwein unter besonderer Berücksichtigung der Verhältnisse bei Nahrungsmangel in den ersten Lebensstagen sowie bei Hitze- und Transportbelastung. *Mh. Vet. Med.*, 29, 1974: 910–914.
- KOVÁČ, G.: Hladiny vitamínu E v krvnom sére teliat po rôznych spôsoboch aplikácie jeho prípravkov. *Veter. Med. (Praha)*, 22, 1977: 327–332.
- KOVÁČ, G.: Sérová koncentrácia vitamínu E u hovädzieho dobytká a oviec v závislosti na veku, sezóne, gravidite, plemene a po aplikácii jeho prípravkov. [Kandidátska dizertácia.] Košice 1978. – Univerzita veterinárskeho lekárstva.
- KOVÁČ, G. – MUDROŇ, P. – PROSBOVÁ, M. – PAŠTĚKA, J.: Klinická a biochemická odozva prevencie nutričnej myodystrofie u jalovic. *Veter. Med. (Praha)*, 32, 1987: 81–92.
- LIM, T. S. – PUTT, N. – SAFRANSKI, D. – CHUNG, C. – WATSON, R. R.: Effect of vitamin E on cell-mediated immune responses and serum corticosterone in young and maturing mice. *Immunology*, 44, 1981: 289–295.
- LOCATELLI, A. – SARTORELLI, P. – AGNES, F. – BONDIOLOTTI, G. P. – PICOTTI, G. B.: Adrenal response in the calf to repeated simulated transport. *Brit. Vet. J.*, 145, 1989: 517–522.
- MICHNA, A.: Štúdium mechanizmu dehydratačného syndrómu pri enteritidách teliat. [Habilitačná práca.] Košice 1978.
- MITCHELL, G. – HATTINGH, J. – GANHAO, M.: Stress in cattle assessed after handling, after transport and after slaughter. *Vet. Rec.*, 123, 1988: 201–205.
- MOBERG, G. P. *Animal stress*. American Physiol. Society, Bethesda 1985. 324 s.
- MORMEDE, P. – SOISSONS, J. – BLUTHE, R. M. – RAOULT, J. – LEGARFF, G. – LEVIEUX, D. – DANTZER, R.: Effect of transportation on blood serum composition, disease incidence, and production traits in young calves. Influence of the journey duration. *Ann. Rech. Vét.*, 13, 1982: 369–384.
- MUDROŇ, P. – KOVÁČ, G. – HOJEROVÁ, A. – BARTKO, P. – BÍREŠ, J. – MICHNA, A. – BALDOVIČ, R.: Štúdium vplyvu aplikácie vitamínu E na koncentráciu sérových imunoglobulínov a úroveň fagocytárnej aktivity. *Vet. Med. (Praha)*, 37, 1992: 587–594.
- MURATA, H. – TAKAHASHI, H. – MATSUMOTO, H.: The effects of road transportation on peripheral blood lymphocyte subpopulations, lymphocyte blastogenesis and neutrophil function in calves. *Brit. Vet. J.*, 143, 1987: 166–174.
- NOCKELS, C. F.: Mineral alterations associated with stress, trauma, and infection and the effect on immunity. *Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.*, 12, 1990: 1133–1159.
- REDDY, P. G. – MORRILL, L. – MINOCHA, H. C. – STEVENSON, J. S.: Vitamin E is immunostimulatory in calves. *J. Dairy Sci.*, 70, 1987: 993–999.
- SCHAEFER, A. L. – JONES, S. D. M. – TONG, A. K. W. – VINCENT, B. C.: The effects of fasting and transportation on beef cattle. I. Acid–base–electrolyte balance and infrared heat loss of beef cattle. *Livest. Prod. Sci.*, 20, 1988: 15–24.
- SCHAEFER, A. L. – JONES, S. D. M. – TONG, A. K. W. – YOUNG, B. A. – MURRAY, N. L. – LEPAGE, P.: Effects of post-transport supplementation on tissue electrolytes, hematology, urine osmolality and weight loss in beef bulls. *Livest. Prod. Sci.*, 30, 1992: 333–346.
- TARRANT, P. V. – KENNY, F. J. – HARRINGTON, D.: The effect of stocking density during 4 hour transport to slaughter on behaviour, blood constituents and carcass bruising in Friesian steers. *Meat Sci.*, 24, 1988: 209–222.
- TARRANT, P. V. – KENNY, F. J. – HARRINGTON, D. – MURPHY, M.: Long distance transportation of steers to slaughter: effect of stocking density on physiology, behaviour and carcass quality. *Livest. Prod. Sci.*, 30, 1992: 223–238.
- VRZGULA, L. – SOKOL, J.: Hodnoty metabolických profilových testov u domácich zvierat a ich interpretácia. Košice, IVVVV 1987. 61 s.

Došlo 27. 7. 1995

Kontaktná adresa:

MVDr. Pavol Mudroň, Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 04181 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/633 20 11–15, fax 095/76 76 75

VIBRIOSIS IN RAINBOW TROUT CULTURED IN THE KRKA ESTUARY, CROATIA: OCCURRENCE AND COMMENTS

VIBRIÓZA PSTRUHA DUHOVÉHO CHOVANÉHO V ÚSTÍ ŘEKY KRKA: VÝSKYT A KOMENTÁŘ

†L. Malnar, R. Čož-Rakovac¹, M. Hacmanjek¹, Z. Teskeredžić¹, E. Teskeredžić¹, M. Tomec¹, I. Strunjak-Perović¹, E. McLean², T. Naglič³

¹Ruder Bošković Institute, Center for Marine Research, Zagreb, Croatia

²Aalborg University, Environmental Engineering Laboratory, Aalborg, Denmark

³Veterinary Faculty, University of Zagreb, Croatia

ABSTRACT: The frequency of vibriosis in cultured rainbow trout, maintained under different rearing conditions in the Krka estuary, was examined over a 6 yr period. Annual studies commenced regularly in October and ended in June of the following year. Every month during study periods, 37–75 trouts were randomly taken from each of 4 farm sites for routine examination. Twenty fish from these samples were subsequently employed for bacteriological analyses. Based on morphological and biochemical properties, the bacterial isolates were identified as *Vibrio anguillarum*, (biotype I). The findings demonstrate high occurrence of vibriosis in trout cultivated in the Krka estuary. Furthermore, there was a direct relationship between water quality parameters and the severity of vibriosis epizootics. Moreover, the causative agent has been isolated from free-living species of fish, notably eel and mullet, which are abundant in the Krka aquatorium. The findings from these long-term studies will be considered with reference to the developing salmon farming industry of Croatia.

Adriatic sea; rainbow trout; *Vibrio anguillarum*; biotype I

ABSTRAKT: Během šestiletého období jsme sledovali četnost výskytu vibríózy v chovu pstruha duhového žijícího za různých podmínek odchovu v ústí řeky Krka. Sledování v daném roce obvykle začalo v říjnu a skončilo v červnu následujícího roku. během období sledování jsme každý měsíc náhodně odebrali z každého ze čtyř chovných stanovišť 37–75 pstruhů pro rutinní vyšetření. Dále jsme provedli bakteriologické rozboru u 20 kusů z těchto odebraných vzorků. Na základě morfolo- gických a biochemických vlastností jsme bakteriální izoláty určili jako *Vibrio anguillarum* (biotyp I). Nálezky ukazují na vysoký výskyt vibríózy u pstruha chovaného v ústí řeky Krka. Dále existoval přímý vztah mezi ukazateli kvality vody a intenzitou epizootie vibríózy. Kromě toho jsme původce této choroby izolovali z volně žijících druhů ryb, zejména z úhořů a parmice, které se hojně vyskytují v akváriu řeky Krka. Poznatky získané při těchto dlouhodobých sledováních se budou brát v úvahu pro rozvíjející se chov lososů v Chorvatsku.

Jaderské moře; pstruh duhový; *Vibrio anguillarum*; biotyp I

INTRODUCTION

This contagious bacterial disease is very frequent in seawater and brackishwater fish, while occurring only occasionally in freshwater fish. It occurs in the rearing fish and wild fish. Freshwater fish attacked by vibrio are pikes, trout and ayu fish (Muroga et al., 1986b; Muroga and Egusa, 1988). Migration fish attacked by the disease are salmon (Toranzo et al., 1987) and eel (Tison et al., 1982); seawater fish attacked are sharks (Grimes et al., 1986), cod-fish (Larsen et al., 1978), sea bass (Brisinello et al., 1985), mullet (Rodgers and Burke, 1988); flounder (Grimes et al., 1989) and sole (Baudin-Laurencin, 1986).

Occurrence of the disease is connected with the increase of water temperature. Perishing of salmonids starts with water temperature increasing above 11 °C; eel perishing starts with the temperature above 15 °C. The causative agent of vibriosis is gram-negative, rod-shaped bacteria of the genus *Vibrio*. The most frequent and widespread is *V. anguillarum* measuring 1–2 x 0.5 microns (Roberts, 1989). Its presence has been proved in invertebrate and sea benthos (Hastein, 1975). The disease is of peracute, acute and chronic course. Clonic convulsions and mass perishing of eels are the characteristics of the peracute course of this disease. Acute course of the disease is reflected in anorexia, dark pigmentation of the skin and perishing of the fish. By section performing it is possible to deter-

† In memoriam of Leon Malnar, who passed away in March 1993.

mine petechiation of visceral and parietal peritoneum, anemia, also the liquefaction of spleen and kidney. Skin lesions reaching deep into the muscles forming ulcers and granulomatous formations. Exophthalmia and ulcus characterize the chronic course of the disease (Bullock, 1971). Through the application of general zoosanitary measures, good results in the prevention of the disease were obtained by preventive vaccination (Bogwald et al., 1992). Gjedrem and Aulestad (1974), reported on fish selection as a positive measure enhancing fish immunity to the vibriosis.

By establishing salmonids experimental rearing in floating cages in the Krka river estuary, the need showed up to examine the fish of this area for the presence of the causative agent of vibriosis as one of the very contagious bacterial diseases of salmonids. This disease may occur in the epizootic form with a high rate of mortality. The presence of the causative agent of vibriosis in open waters makes it possible to transfer the disease to the fish in rearing places. Therefore, the fundamental goal of this investigation was to get an insight into the distribution of bacterium *V. anguillarum* infections in this area, in order to try to prevent its spreading from the reared salmonids to the free-living salmonids and opposite.

MATERIALS AND METHODS

For the investigations aiming to examine epizootiological situation of bacterial diseases in rainbow trout, 4 localities in the Krka estuary were chosen. Investigation included 7 rearing cycles (6 year) of rainbow trout. Each cycle started in October and ended at the beginning of June next year. At locality No. 1, 4 cycles were carried out, at localities No. 2 and 3, 2 cycles were performed, and at locality No. 4, 2 cycles. At all 4 localities there were six experimental rearing cages with rainbow trout from which fish were taken to determine their health condition and to monitor epizootiological situation. All fish caught were marked and then put into plastic containers of 150 l volume. There was oxygen circulating in the water from steel bottles under the pressure of 0.5 atm. After transportation, the fish were treated in the Laboratory in Zagreb. During the rearing cycle monthly health control of the fish was performed which also included bacteriological examination. For the ordinary health control, 10 specimens of fish were taken, for extra health examination (when disease was assumed), up to 20 specimens with clearly visible external changes were taken. Health control included examination of external and internal signs and microscopic search of skin, gills and gall. When necessary, blood analysis was made for the quantity of serum proteins by means of refractometer ATAGO Japan with a scale range of 0–55 g/100 g. Routine bacteriological investigations were performed according to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg and Holt, 1984). Simultaneously with taking fish samples, at all

4 localities samples of water were also taken monthly to examine its physico-chemical quality. The following physico-chemical parameters were examined: – water temperature (°C), – pH value, – quantity of oxygen dissolved in water (mg/l), – water salinity values (10^{-3}).

RESULTS AND DISCUSSION

During the investigations, which comprised 7 rearing cycles of rainbow trout, each cycle lasted from October until June next year, health condition of 10,020 specimens of the fish was checked up. In the 6 years of experimental period, total number of bacteriologically treated rainbow trout amounted to 1,320. 83 bacterial strains were isolated and determined as *V. anguillarum* biotype I (Tab. I). At location No. 3 and 4, 28 and 55 bacterial strains respectively, were isolated from the kidney, spleen and liver of rainbow trout. The bacteria at both locations were determined as *V. anguillarum* biotype I. At location No. 3 with determining the cause, the symptoms were also found, however at location No. 4 there was no evidence of illness.

Based on anamnestic evidence, perishing of fish started in the middle of the third rearing cycle, when about 30 rainbow trout per one cage perished, daily within 3 days. Total number of fish in all cages was 75,900, their average weight was 160 g. As the afflux of surface water diminished, the nets in floating cages were raised to the depth of one meter, when the perishing of fish subsided. At the same time, there was no perishing recorded in silver salmon in neighbouring cages.

By external examination of rainbow trout, it was found that they poorly react to food or not at all. Their anus was hyperaemic and slightly protuberated, there were haemorrhages observed of the area 1–5 cm² on the skin usually between the abdomen and the tail fin. Gills were pale. Tops of tail fin were bare, and there were haemorrhages recorded in front of abdominal fins. By microscopic examination of native slides of skin, gills and blood, no pathological changes or the presence of parasites were found. By internal examination of the diseased rainbow trout, haemorrhages were found in the muscles, especially in the anal area, and the congestion of anus was also seen. Swimming bladder was enlarged. The stomach was enlarged and filled with transparent mucous content. The spleen was enlarged and coloured black, frequently very soft. Mucous membrane of the rear part of the intestine was haemorrhagic and filled with the mucous-bloody content.

For a bacteriological test, kidney, spleen and liver tissues of the diseased specimens were planted on trypticase soy agar (TSA) and resulted in the growth of bacterial cultures after incubation of 24 hours. Cultivated bacterial colonies were yellowish, round, with regular rims, translucent, without definite scent, of the

I. Health condition check up of fish and bacteriological treatment of fish samples at all 4 locations during 7 rearing cycles

Location number	Number of specimens checked up for health condition	Number of specimens bacteriologically treated
No. 1	3960	760
No. 2	1980	180
No. 3	2100	200
No. 4	1980	180

II. Selected morphological and biochemical characteristics of the pathogenic *V. anguillarum* isolates in the Krka estuary

Characteristics	Results
Morphology and strain	gram-negative, curved rods, μm in width and 1–3 μm in length 0.5
Growth at:	
20 °C	+
30 °C	+
37 °C	–
Motility	+
Inhibition by 0/129 phosphate (10 μg)	+
Enzymatic activities:	
gelatinase	+
catalase	+
cytochrom oxidase	+
urease	–
Voges-Proskauer test	+
Gas from glucose	–
Fermentation of:	
glucose	+
sucrose	+
mannitol	+
mannose	+
rhannose	–
Growth in % NaCl:	
0	+/- (scanty growth after 4 days)
3	+
6	+/- (growth after 4 days)
8	–

diameter 1–3 mm. 28 bacterial strains (isolates) of equal properties were obtained. The results of bacteriological examination are presented in Tab. II.

The cure of the diseased rainbow trout from vibriosis was very efficient by using oxytetracycline put into the food (dose 7.5 g/100 kg of fish daily) during 7 days. Therapy with trimethoprim in combination with sulphonomides was inefficient despite the claims of many authors stating the opposite (Kimura et al., 1983; Sako et al., 1979).

Most of the bacterial diseases are of a secondary nature, as a result of other primary conditions, including nutritional diseases, extreme stress, and water temperature. Vibriosis is a stress-related disease. Disease

arises from a change in the balance between the host and the bacteria, which normally exist commensally as part of the indigenous microflora, but are able to exploit the lowered fitness of the host. Disease strains are more specifically infectious agents, transmitted from one infected population to another and, although closely related to, are distinct from the commensals. In our case the incidence of the disease is connected with the increase of water temperature. Perishing of salmonid starts with temperature increasing in April at 1, 2, 3 localities, on 0.5 m, 2 m and 4 m were 12.8 °C, 13.2 °C and 13.5 °C (Tab. III).

At the very beginning of experimental salmonids rearing it was evident that the cage culture of salmonids would provide a number of technological and health problems. From the results of morphological and biochemical properties of the isolated bacteria, comparing them to the properties of *V. anguillarum* following Bergey (Krieg and Holt, 1984; Larsen, 1983), also from results of clinical pathology found with the diseased rainbow trout (Tab. IV), it is evident that vibriosis of rainbow trout in the 3rd rearing cycle was caused by bacterium *V. anguillarum* I. According to the date presented in Tab. IV only the finds of stomach and swimming bladder enlargement were not typical of vibriosis. This can be connected with the abrupt increase in sea salinity.

Occurrence of vibriosis in salmonids is stimulated by the increase in water temperature above 10 °C (Roberts, 1989). Since eels, abundant at this locality, can serve as reservoirs of infection, it is possible that the disease occurs in salmonids when water temperature is enhanced. Besides eels, mullet can be also found at this locality. They can also be attacked by the same disease (Kakimoto and Howlah, 1980) and can transfer the disease to rainbow trout. Namely, mullet return from the spawning in the open sea at the end of the winter, so it is possible that they transfer vibriosis to rainbow trout from the end of winter till the end of rearing cycle in June. The causative agent has been isolated from free-living species of fish, notably eel and mullet, which are abundant in the Krka aquatorium (from unpublished data of Malnar). The disease is also very widespread since its cause can live as a component of fish digestion tube microflora, in benthos and invertebrates (Hastein, 1975), and also in water and sediments (Larsen, 1983; Muroga et al., 1986a).

Since the cause of the disease is constantly present in the Krka river estuary without the possibility of

III. Results of physico-chemical analyses of the Krka river estuary near Skradin at the moment when the causative agent was isolated from the fish

Sampling	Depth	Temperature	O ₂ (mg/l)	O ₂ (%)	S x 10 ⁻³
3rd rearing cycle	0.5 m	12.8	11.68	116.21	2
Locality No 3	2.0 m	13.2	11.51	114.52	2
April	4.0 m	13.5	11.01	111.11	12
5th rearing cycle	0.5 m	13.2	11.5	113.74	7.8
Locality No 4	2.0 m	13.1	11.7	116.42	8.8
April	4.0 m	13.1	10.9	115.22	19.3
6th rearing cycle	0.5 m	8.0	12.1	106.33	7.0
Locality No 4	2.0 m	10.2	10.9	104.51	13.5
March	4.0 m	11.3	6.9	76.12	31.5

IV. Comparison of the results of clinical pathology of the diseased rainbow trout found in our research with the results found by Hoshina (1956) and Roberts (1989)

Clinical pathology	In our research	Hoshina (1956)	Roberts (1989)
Haemorrhage on skin	+	-	+
Haemorrhage on abdominal fin area	+	-	+
Anorexia	+	-	+
Pale skin	+	-	+
Haemorrhage in muscles	+	+	+
Congestion of anus	+	+	-
Enlarged and black spleen	+	+	-
Liquefaction of spleen	+	-	+
Haemorrhage on intestine	+	+	+
Yellow and anaemic liver	+	+	-
Enlarged stomach	+	-	-
Enlarged swimming bladder	+	-	-

being eradicated, it would be necessary to vaccinate the fish every year before the transport into the sea. Several methods of administering commercial *Vibrio* vaccines are currently employed. These are: injection (Hayashi et al., 1964), oral (Frayer et al., 1978), immersion (Aoki et al., 1984), bath vaccination (Egidius and Andersen, 1979) and spray (Gould, 1978). Results of Gould et al. (1978): very long-lasting and high agglutination titre (1 : 147) for the causative agent of vibriosis is obtained with immunizing the fish by „spray“ method under high vaccine pressure. Investigations of a group of authors (Bogwald et al., 1992) show that *i. p.* vaccination with lipopolysaccharide antigen (LPS) of the bacterium *V. anguillarum* serovars 01 and 02 provides high protection from the disease.

REFERENCES

- AOKI, T. – SAKAI, M. – TAKAHASHI, S.: Protective immunity in ayu, *Plecoglossus altivelis*, vaccinated by immersion with *Vibrio anguillarum*. *Fish Path.*, 19, 1984: 181–185.
- BAUDIN-LAURENCIN, F.: Sensitivity of the sole (*Solea solea*) to vibriosis. *Path. Mar. Aquacult. Pamaq.*, 1, 1986: 345–350.
- BOGWALD, J. – STENSVAAG, K. – HOFFMAN, J. – HOLM, K. O. – JORGENSEN, T. O.: Vaccination of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with particulate lipopolysaccharide antigens from *Vibrio salmonicida* and *Vibrio anguillarum*. *Fish and Shellfish Immunol.*, 2, 1992: 251–261.
- BRISINELLO, W. – DOIMI, M. – GIORGETTI, G. – SARTI, M.: Vaccination trials against vibriosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fry. *Bull. Eur. Ass. Fish Path.*, 5, 1985: 55–56.
- BULLOCK, G. L. – CONROY, D. A. – SNIESZKO, S. F.: Bacterial disease of fishes. In: SNIESZKO, S. F. – AXELROD, H. R. (eds.): Diseases of fishes 2A. Reigate: T.F.H. Publishers, 1971: 74–77.
- EGIDIUS, E. – ANDERSEN, K.: Bath immunization – a practical and non-stressing method of vaccinating farmed sea rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) against vibriosis. *J. Fish Dis.*, 2, 1979: 405–410.
- FRYER, J. L. – ROHOVEC, J. S. – GARRISON, R. L.: Immunization of salmonids for control of vibriosis. *Mar. Fish Rev.*, 40, 1978: 20–23.

- GJEDREM, T. – AULESTAD, D.: Selection experiments with salmon. I. Differences in resistance to vibrio disease in salmon parr *Salmo salar*. *Aquaculture*, 3, 1974: 51–59.
- GOULD, R. W. – O'LEARY, P. J. – GARRISON, R. L. – ROHOVEC, J. S. – FRYER, J. L.: Spray vaccination: a method for the immunization of fish. *Fish Path.*, 13, 1978: 63–68.
- GRIMES, D. J. – BRAYTON, P. – GRUBER, S. H. – COLWEL, R. R.: *Vibrio* disease in captive sharks. *Path. Marine Aquacult.*, 1, 1986: 231–232.
- GRIMES, B. H. – HUIISH, M. T. – KERBY, J. H. – MORAN, D.: Species profiles: Life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Mid-Atlantic). Summer and winter flounder. *Biol. Rep. U. S. Fish Wildl. Serv.*, 1989: 1–27.
- HASTEIN, T.: *Vibriosis in fish*. [Ph. D. Thesis.] University of Stirling 1975.
- HOSHINA, T.: An epidermic disease affecting rainbow trout in Japan. *J. Tokyo Univ. of Fisheries*, 42, 1956: 115–116.
- HAYASHI, K. – KOBAYASHI, S. – JAMATA, T. – OZAKI, H.: Studies on the vibrio disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus*). II Prophylactic vaccination against the vibrio-disease. *J. Fac. Fish Prefect. Univ. Mie*, 6, 1964: 181–191.
- KAKIMOTO, D. – HOWLAH, A. H.: Microflora in the alimentary tract of gray mullet (*Mugil cephalus*). 8. Utilization of amino acids by *Vibrio* and *Enterobacter* isolates. *Mem. Fac. Fish Kagoshima Univ.*, 29, 1980: 349–354.
- KIMURA, T. – YOSHIMAZU, M. – WADA, M.: *In vitro* antibacterial activity of the combination of sulphadiazine and trimethoprim on bacterial fish pathogens. *J. Fish. Dis.*, 6, 1983: 525–532.
- KRIEG, N. R. – HOLT, J. G.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins 1984.
- LARSEN, J. L.: *Vibrio anguillarum*: A comparative study of fish pathogenic environmental and reference strains. *Acta Vet. Scand.*, 24, 1983: 456–476.
- LARSEN, J. L. – CHRISTENSEN, N. D.: Water pollution and the ulcer syndrome in the *Gadus morhua*. *Vet. Sci. Commun.*, 2, 1978: 207–216.
- MUROGA, K. – EGUSA, S.: *Vibriosis of ayu*: A review. *J. Fac. Appl. Biol. Sci.*, 27, 1988: 1–17.
- MUROGA, K. – IIDA, M. – MATSUMOTO, H. – NAKAI, T.: Detection of *Vibrio anguillarum* from Waters. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 52, 1986a: 641–647.
- MUROGA, K. – JO, Y. – MASUMURA, K.: *Vibrio ordalii* isolated from diseased ayu (*Plecoglossus altivelis*) and rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Fish Path.*, 21, 1986b: 239–243.
- ROBERTS, R. J.: *Pathology of fishes*. London, Bailliere Tindall 1989. 318 p.
- RODGERS, L. J. – BURKE J. B.: Aetiology of „red spot“ disease (vibriosis) with special reference to the ectoparasitic *Digenean Prototransverotrema steeri* (Angel) and the sea mullet, *Mugil cephalus* (Linnaeus). *J. Fish Biol.*, 32, 1986: 655–663.
- SAKO, H. – KUSUDA, R. – TABATA, T.: Chemotherapeutical studies on trimethoprim against vibriosis of pond cultured ayu (*Plecoglossus altivelis*). Part 2. Tissue level after administration of trimethoprim sulfadoxine mixture. *Fish Path.*, 14, 1979: 65–70.
- TISON, D. L. – NISHIBUCHI, M. – GREENWOOD, J. D. – SEIDLER, R. J.: *Vibrio vulnificus* biogroup 2: New biogroup pathogenic for eels. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 1982: 640–646.
- TORANZO, A. E. – SANTOS, Y. – LEMOS, M. L. – LEEDO, A. – BOLINCHES, J.: Hemology of *Vibrio anguillarum* strains causing epizootics in turbot, salmon and trout reared on the Atlantic coast of Spain. *Aquaculture*, 67, 1987: 41–52.

Arrived on 12nd July 1995

Contact Address:

Dr. Rozelinda Č o ž - R a k o v a c, Ruder Bošković Institute, CIM, LIRA, Bijenička C. 54, P. O. Box 1016, 41001 Zagreb, Croatia
Tel. (385) (1) 46 11 11, fax (385) (1) 42 54 97

ÚSTŘEDNÍ ZEMĚDĚLSKÁ A LESNICKÁ KNIHOVNA, PRAHA 2, SLEZSKÁ 7

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

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

V oblasti mezinárodní výměny publikací knihovna spolupracuje s 800 partnery ze 45 zemí světa. Knihovna je členem IAALD – mezinárodní asociace zemědělských knihovníků. Od září 1991 je členem mezinárodní sítě zemědělských knihoven AGLINET a od 1. 1. 1994 je depozitní knihovnou materiálů FAO pro Českou republiku.

Knihovna poskytuje svým uživatelům následující služby:

Výpůjční služby

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

Reprografické služby

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

Služby z automatizovaného systému firemní literatury

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

Referenční služby

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

Půjčování videokazet

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

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

Adresa knihovny:

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna
Slezská 7
120 56 Praha 2

Výpůjční doba:

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

Telefonické informace:

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

ANTIBODIES IgG TO *BORRELIA BURGdorFERI* IN DOGS FROM KOŠICE REGION

ANTIBORELIOVÉ PROTILÁTKY IgG U PSOV Z REGIÓNU KOŠÍC*

A. Štefančíková¹, I. Škardová², B. Peťko¹, D. Janovská³, V. Cyprichová³

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

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

³*National Medical Institute, Praha, Czech Republic*

ABSTRACT: An ELISA investigation showed that 26.9% of dogs in Košice region were positive for anti-borrelia IgG antibodies. A significantly higher seroprevalence was detected only in hunting dogs (40.0%) compared with service dogs (11.8%; $p < 0.05$). An analysis of seroprevalence by age showed a significant difference only between dogs in the categories 1–3 years (37.8%) and under 1 year of age (8.3%; $p < 0.05$). In other age groups no significant differences in seroprevalence were observed. No significant difference in seroprevalence was detected between sex either. A high correlation was determined to exist between the seroprevalence and the number of engorged ticks ($R = 0.8$) and the frequency of the exposure of dogs to the tick-infested wooded areas with the focal occurrence of boreliae ($R = 1$). The analysis of results suggests that seroprevalence of Lyme borreliosis in dogs of the Košice region is not negligible. The breed, age and sex do not influence the seroprevalence of the disease. The decisive role is, however, played by the time of the exposure of dogs to the environment infested by *Borrelia*-contaminated ticks.

Borrelia burgdorferi; IgG antibodies; ELISA; dog; *Ixodes ricinus*

ABSTRAKT: Metódou ELISA sme zistili v regióne Košíc 26,9 % psov pozitívnych na antiboreliové protilátky IgG. Signifikantne vyššiu séroprevalenciu sme zistili iba u poľovných (40,0 %) v porovnaní so služobnými psami (11,8 %; $p < 0,05$). Na základe analýzy veku signifikantný rozdiel vykazovali psy v kategórii 1–3 roky (37,8 %) a do jedného roka (8,3 %; $p < 0,05$). V ostatných vekových skupinách rozdiely séroprevalencie neboli signifikantné, rovnako nebol významný rozdiel u psov a súk. Bola zistená vysoká korelácia séroprevalencie v závislosti na počte pricicaných kliešťov ($R = 0,8$), ako aj na frekvencii pobytu psov v lesných oblastiach s ohniskovým výskytom borelií v kliešťoch ($R = 1$). Analýza výsledkov naznačuje, že séroprevalencia psov na lymskú boreliózu v regióne Košíc nie je zanedbateľná a rozhodujúcu úlohu pri nej zohráva doba expozície v prostredí s výskytom kliešťov kontaminovaných pôvodcom tejto zoonózy.

Borrelia burgdorferi; protilátky IgG; ELISA; pes; *Ixodes ricinus*

ÚVOD

Lymská borelióza patrí medzi prírodno-ohniskové nákazy. Jej vektormi sú kliešte, pričom v USA je najvýznamnejší *Ixodes damini*, v Európe a Ázii *I. ricinus* a *I. persulcatus* (Barbour a i., 1986; Anderson, 1991), ale sú známe aj ďalšie druhy kliešťov (Anderson a i., 1985; Burgdorfer a i., 1985). Úlohu vektorov môže zohrávať aj iný krv cicajúci hmyz (Anderson a Magnarelli, 1984; Magnarelli a i., 1897b) a nevylučuje sa možnosť prenosu močom, slinami, mliekom chorých zvierat, kontaminovaným krmivom (Burgess a i., 1986; Burgess a Patricia, 1987; Burgess, 1988; Post a i., 1988). Rezervoármi sú cicavce, plazy a vtáky (Anderson a Magnarelli, 1984).

Literárne údaje dokumentujú expozíciu rôznych druhov voľne žijúcich i domácich zvierat pôvodcom tejto

zoonózy na celom svete, nevynímajúc psy (Käsböhrer a Schönberg, 1993; Tremli a i., 1993). V endemických oblastiach 3/4 psov je séropozitívnych na lymskú boreliózu (Burgess, 1986; Magnarelli a i., 1987a) a séroprevalencia psov je tu podstatne vyššia ako u ľudí. Na základe týchto poznatkov sa usudzuje, že psy môžu byť vhodným indikátorom rozšírenia ľudskej boreliózy (Eng a i., 1988).

Klinicky sa toto ochorenie u psov prejavuje podobne ako u ľudí, ale často je priebeh inaparentný (Magnarelli a i., 1987a; Levy a Duray, 1988; Appel, 1990). Poruchy pohybového aparátu sú najčastejšie (Magnarelli a i., 1987a; May a i., 1990), naproti tomu *Erythema chronicum migrans*, príznačný pre ľudí, u psov je zriedkavý a tiež nervové a srdcové afekcie nie sú časté (Appel, 1990), avšak zlyhanie srdcovej činnosti psa bolo opísané (Levy a Duray, 1988). Sprievodnými prejavmi môžu byť aj ho-

* Výsledky boli dosiahnuté pri riešení vnútorného grantu SAV, č. 2/577/1993–1995.

růčka, nauzea, anorexia, lymfadenopatia, poruchy obličiek (Appel, 1990; May a i., 1990).

Vzhľadom na pestrosť klinických prejavov a obtiažnosť priamych diagnostických metód ako je kultivácia a imunohistochemický dôkaz pôvodcu, v diagnostike lysmskej boreliózy významné postavenie majú sérologické metódy na dôkaz špecifických protilátok. V sérologickej diagnostike lysmskej boreliózy sa najčastejšie používa metóda IFA a ELISA (Burgess, 1986; Magnarelli a i., 1987a; Greene a i., 1988a, b) menej IHA (Sýkora a i., 1988a, b). Väčšina autorov doporučuje v rutínnej praxi vzhľadom k jednoduchšej technickej vybavenosti a interpretácii výsledkov metódu ELISA.

Kliešte *I. ricinus* sú infikované s *Borrelia burgdorferi* takmer na celom území Slovenska s výraznými rozdielmi v prevalencii v jednotlivých lokalitách (Kmetý a i., 1990). Toto zistenie predpokladá expozíciu ľudí a zvierat aj na našom území. V príspevku analyzujeme séroprevalenciu lysmskej boreliózy u psov z regiónu Košíc, kde sme zistili infikovanosť kliešťov boréliami v rozmedzí 9,8 až 41,7 %.

MATERIÁL A METÓDY

Študovaná populácia psov pochádza z košickej mestskej aglomerácie (250 tisíc obyvateľov), ležiacej na rozhraní pohorskej lesnej a nížinnej poľnohospodárskej krajiny (180–350 m n. m.) v juhovýchodnej časti Západných Karpát. Severnú periférnu časť aglomerácie tvorí dubovohrabový lesopark s častým výskytom kliešťov *I. ricinus*. Stromový zeleň v centrálnej časti mesta je sústredená do niekoľkých malých parkov s ojedinělým výskytom kliešťov.

Vyšetrili sme 78 vzoriek sér psov rôzneho plemena, veku a pohlavia. Séra sme získali na základe výzvy majiteľov psov pre vyšetrenie na lysmskú boreliózu v policajnom zbere, poľovníckych organizáciách a na veterinárnej ambulancii. Krvné vzorky od policajných psov boli odobrané v marci 1993, od ostatných psov v júni až júli 1993. Od majiteľov psov bola odobraná epizootologická anamnéza.

Séra sme vyšetrovali metódou ELISA použitím postupu a zloženia roztokov v komerčne vyrábaných súpravách USOL Praha pre diagnostiku v humánnej medicíne. Ako antigén sme použili sonikát kultúry *Borrelia burgdorferi* sensu stricto kmeňa B 31 s koncentráciou bielkovín 0,7 mg/ml. Pracovné riedenie antigénu 1 : 300 sme stanovili titráciou. Ako kontrolné pozitívne sérum sme použili sérum psa s klinickými príznakmi lysmskej boreliózy, ktorého priemerná hodnota absorpcie v ELISA $E^{492} = 1,917$ bola stanovená z priemerov nameraných hodnôt absorpcie v opakovaných titráciách. Ako negatívnu kontrolu sme použili sérum zdravého služobného psa, ktoré bolo v ELISA v opakovaných titráciách negatívne ($E^{492} < 0,600$). Séra s hodnotou absorpcie $E^{492} > 0,600$ sme hodnotili ako pozitívne. Použili sme anti-dog IgG peroxydázový konjugát A 9042 firmy Sigma.

Pre štatistické hodnotenie sme použili test rozdielu dvoch relatívnych hodnôt a Spearmanov koeficient korelácie (R) – Reisenauer, 1970.

VÝSLEDKY

Zo 78 sér vyšetrených na prítomnosť antiboreliových protilátok bolo pozitívnych 21, t. j. 26,9 % psov (tab. I). Signifikantne vyššiu séroprevalenciu sme zistili iba u poľovných (40,0 %) v porovnaní so služobnými psami (11,8 %; $p < 0,05$).

Z hľadiska distribúcie séropozitivity podľa veku (tab. II) signifikantne sa odlišovali iba psy v kategórii 1–3 roky (37,8 %) a do jedného roka (8,3 %; $p < 0,05$). V ostatných vekových skupinách rozdiely séroprevallencie neboli signifikantné. Štatisticky významný rozdiel séroprevallencie u psov a súk sme nezistili (tab. II). Bola zistená vysoká korelácia séroprevallencie v závislosti na počte pricicaných kliešťov udávaných v anamnéze majiteľmi ($R = 0,8$) – tab. III, ako aj na frekvencii pobytu psov v lesných oblastiach s ohniskovým výskytom borélií v kliešťoch ($R = 1$) – tab. IV.

DISKUSIA

Naše výsledky vyšetrenia séroprevallencie poukazujú, že psy v Košiciach a okolí sú premorené antiboreliovými protilátkami v 26,9 %. V Čechách Sýkora a i. (1988a, b) metódou IHA zistili podstatne vyššiu prevallenciu 49 až 53 %. Podobne vo Wiskonsine (USA) a v Nemecku (Burgess, 1986; Käsbohrer a Schönberg, 1993) zistili metódami IFA a ELISA 30 až 50 %, v USA v oblasti Californie a Westchester County Magnarelli a i. (1987a) detegovali protilátky v sére 66 až 76 % psov (IFA a ELISA). Naproti tomu v Oklahome Rodgers a i. (1989) v IFA a v Japonsku Isogai a i. (1991) v ELISA zistili 8 až 18 %, v severnej Caroline Greene a i. (1988a, b) len 2,7 až 3,6 % séropozitívnych psov.

Uvedené rozdiely séroprevallencie môžu byť ovplyvnené použitím rozdielnych vyšetrovacích metód a tým rozdielnej interpretácie výsledkov z hľadiska stanovenia positivity reakcie. V rozhodujúcej miere však svedčia o rozdielnej infikovanosti kliešťov na tom ktorom území.

V našom súbore vyššia séroprevallencia poľovných psov oproti služobným je ovplyvnená ich frekvenciou pobytu v oblastiach s výskytom kliešťov a intenzitou zaklieštenia. Poukazuje na to skutočnosť, že z vyšetrených psov, s frekvenciou pobytu najmenej jeden raz v týždni, bolo 62,5 % poľovných a 63,1 % malo do 50 až nad 50 pricicaných kliešťov. K podobným záverom dospeli aj Cohen a i. (1990), ktorí zistili vyššiu prevallenciu u poľovných a túlavých psov v závislosti na dĺžke ich expozície v prostredí s výskytom kliešťov. Naproti tomu služobné psy sa pohybujú prevažne v mestskej aglomerácii. Pokorný a Záhradková (1990), Hubálek a i. (1993) uvádzajú, že v mestách je možná nákaza aj v parkoch. Ďalším faktorom je

I. Séroprevencia psov na *B. burgdorferi* podľa jednotlivých skupín – Seroprevalence in dogs for *B. burgdorferi* by particular groups

Skupiny psov ¹	Počet psov ⁷		Séroprevencia ¹⁰ (%)
	vyšetrených ⁸	pozitívnych ⁹	
Poľovné ²	30	12	40,00*
Strážne – súkromné ³	17	5	29,40
Služobné ⁴	17	2	11,80*
Spoločenské ⁵	14	2	14,30
Celkom ⁶	78	21	26,90

* = $P < 0,05$

¹groups of dogs, ²hunting, ³private watch dogs, ⁴service, ⁵pet, ⁶total, ⁷number of dogs, ⁸examined, ⁹positive, ¹⁰seroprevalence

II. Séroprevencia psov na *B. burgdorferi* podľa veku a pohlavia – Seroprevalence in dogs for *B. burgdorferi* by age and sex

Vek (roky) ¹	Počet psov ⁶		Séroprevencia ⁹ (%)
	vyšetrených ⁷	pozitívnych ⁸	
do 1 roku ²	12	1	8,3*
1–3	37	14	37,8*
4–8	29	6	20,70
Pohlavie ³			
Suky ⁴	35	12	34,30
Psy ⁵	43	9	20,90

* = $P < 0,05$

¹age (year), ²up to 1 year, ³sex, ⁴bitches, ⁵dogs, ⁶number of dogs, ⁷examined, ⁸positive, ⁹seroprevalence

III. Séroprevencia psov na *B. burgdorferi* v závislosti na počte pricicaných kliešťov – Seroprevalence in dogs for *B. burgdorferi* depending on the number of engorged ticks

Počet pricicaných kliešťov ¹	Počet psov ⁴		Séroprevencia ⁷ (%)
	vyšetrených ⁵	pozitívnych ⁶	
1–10	30	7	23,30
11–50	9	3	33,30
Viac ako 50 ²	10	6	60,00
Neudané ³	29	5	17,20

¹number of engorged ticks, ²more than 50, ³not given, ⁴number of dogs, ⁵examined, ⁶positive, ⁷seroprevalence

IV. Séroprevencia psov na *B. burgdorferi* podľa frekvencie pobytu v lesných oblastiach s výskytom kliešťov – Seroprevalence in dogs for *B. burgdorferi* by the exposure frequency in the tick-infested wooded areas

Frekvencia pobytu ¹	Počet psov ⁶		Séroprevencia ⁹ (%)
	vyšetrených ⁷	pozitívnych ⁸	
1x týždenne ²	40	14	35,50
1x mesačne ³	15	4	26,66
1x v lete ⁴	14	2	14,28
Nechodí ⁵	9	1	11,10

¹exposure frequency, ²once a week, ³once a month, ⁴once in summer, ⁵none, ⁶number of dogs, ⁷examined, ⁸positive, ⁹seroprevalence

skutočnosť, že služobné psy sme vyšetrovali v marci a poľovné psy v júni až júli, čo je spojené s rozdielnou aktivitou kliešťov v priebehu roka. Aj pokiaľ ide o rozdiely séroprevencie z hľadiska distribúcie veku naše výsledky dokumentujú, že tieto nie sú odrazom veku, ale sú tiež v priamej súvislosti s dobou expozície

v prostredí s výskytom kliešťov. Svedčí o tom zistenie, že z vyšetrených psov, s pobytom najmenej jeden raz v týždni, bolo 65 % 1 až 3-ročných, kdežto 67 % psov do jedného roka bolo mimo lesa. Podobne Cohen a i. (1990) vyššiu séroprevenciu u 1 až 3-ročných psov pripisujú väčšej aktivite a tiež expozícii v prostredí

s výskytom kliešťov. Zistenie podobnej séroprevaleencie u psov rozdielneho pohlavia je v zhode so zisteniami autorov Magnarelli a i. (1987a). Naopak Cohen a i. (1988) zistili vyššiu premorenosť u samcov a pripisujú ju častejšej expozícii psov v prostredí s výskytom kliešťov infikovaných boreliami.

Z analýzy výsledkov vyplýva, že séroprevaleencia psov na lymfskú boreliózu v regióne Košice nie je zanedbateľná a rozhodujúcu úlohu pri nej zohráva doba expozície v prostredí s výskytom hlavných vektorov – kliešťov kontaminovaných pôvodcom tejto zoonózy.

LITERATÚRA

ANDERSON, J. F.: Epizootiology of Lyme Borreliosis. Scand. J. Infect. Dis. (Suppl.), 77, 1991: 23–34.

ANDERSON, J. F. – MAGNARELLI, L. A.: Avian and mammalian hosts for spirochete-infected ticks and insects in a Lyme disease focus in Connecticut. Yale J. Biol. Med., 57, 1984: 627–641.

APPEL, M. J. G.: Lyme disease in dogs and cats. Compend. Cont. Educ. Pract. Vet., 12, 1990: 617–626.

BARBOUR, A. G. – HAYES, S. F.: Biology of *Borrelia* species. Microb. Rev., 50, 1986: 381–401.

BURGDORFER, W. – LANE, R. S. – BARBOUR, A. G. – GESBRINK, R. A. – ANDERSON, J. F.: The Western black-legged tick, *Ixodes pacificus*: a vector of *Borrelia burgdorferi*. Amer. J. Trop. Hyg., 34, 1985: 925–930.

BURGESS, C. E.: Natural exposure of Wisconsin dogs to the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*). Lab. Anim. Sci., 36, 1986: 288–290.

BURGESS, E. C.: *Borrelia burgdorferi* infection in Wisconsin horses and cows. Ann. N. Y. Acad. Sci., 539, 1988: 235–243.

BURGESS, E. C. – PATRICAN, L. A.: Oral infection of *Peromyscus maniculatus* with *Borrelia burgdorferi* and subsequent transmission by *Ixodes damini*. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 36, 1987: 402–407.

BURGESS, C. E. – AMUNDSON, T. E. – DAVIS, J. P. – KASLOW, R. A. – EDELMAN, E.: Experimental inoculation of *Peromyscus* sp. with *Borrelia burgdorferi*: Evidence of contact transmission. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 35, 1986: 359–363.

COHEN, N. D. – CARTER, C. N. – THOMAS, M. A. – ANGULO, A. B. – BUGSTER, A. K.: Clinical and epidemiologic characteristics of dogs seropositive for *Borrelia burgdorferi* in Texas: 110 cases (1988). JAVMA, 197, 1990: 893–898.

ENG, T. R. – WILSON, M. L. – SPIELMAN, A. – LASTOVICA, C. C.: Greater risk of *Borrelia burgdorferi* infection in dogs than in people. J. Infect. Dis., 158, 1988: 1410–1411.

GREENE, R. T. – LEVINE, J. F. – BREITSCHWERDT, E. B. – BERKHOFF, H. A.: Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs in North Carolina. Amer. J. Vet. Res., 49, 1988: 473–476.

GREENE, R. T. – LEVINE, J. – BREITSCHWERDT, E. B. – WALKER, R. L. – BERKHOFF, H. A. – CULEN, J. – NICHOLSON, W. L.: Clinical and serological evaluations of induced *Borrelia burgdorferi* infection in dogs. Amer. J. Vet. Res., 49, 1988: 752–757.

HUBÁLEK, Z. – HALOUZKA, J. – JUŘICOVÁ, Z.: Prevalence of *Borreliae* in *Ixodes ricinus* ticks from urban parks. Folia Parasit., 40, 1993: 236.

ISOGAI, E. – ISOGAI, H. – SATO, N. – YUZAWA, M. – KAWAKAMI, M.: Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs in Hokkaido. Microbiol. Immunol., 34, 1990: 1005–1012.

KASBOHRER, A. – SCHÖNBERG, A.: Epidemiological investigations on Lyme borreliosis in dogs in the district Brandenburg. In: Abstr. Int. Congr. on Zoonoses, 5–7 October 1993, Piešťany, Slovak Republic, 1993: 23.

KMETY, E. – KMETY, E. – ŘEHÁČEK, J. – VYROSTKOVÁ, V. – KOČIANOVÁ, E. – GURÍČOVÁ, D.: Studium premorenosti kliešťov *Borrelia burgdorferi* a *Francisella tularensis* na Slovensku. Bratisl. Lek. Listy, 91, 1990: 251–266.

LEVY, S. A. – DURAY, P. H.: Complete heart block in a dog seropositive for *Borrelia burgdorferi*: similarity to human Lyme carditis. J. Vet. Int. Med., 2, 1988: 138–144.

MAGNARELLI, L. A. – ANDERSON, J. F. – SCHREIER, A. B. – FICKE, C. M.: Clinical and serological studies of canine borreliosis. JAVMA, 191, 1987a: 1089–1094.

MAGNARELLI, L. A. – FREIER, J. E. – ANDERSON, J. F.: Experimental infection of mosquitoes with *Borrelia burgdorferi*, the etiologic agent of Lyme disease. J. Infect. Dis., 156, 1987b: 694–695.

MAY, C. – BENNETT, D. – CARTER, S. D.: Lyme disease in the dog. Vet. Rec., 126, 1990: 293.

POKORNÝ, P. – ZAHŘADKOVÁ, S.: Výskyt borrelií v kľišťi obecném (*Ixodes ricinus*) na území města Brna. Čs. Epidemiol., 39, 1990: 166–169.

POST, J. E. – SHAW, E. E. – WRIHT, S.: Suspected borreliosis in cattle. Ann. N. Y. Acad. Sci., 539, 1988: 488.

REISENAUER, R.: Metody matematické statistiky a jejich aplikace v technice. Praha, SNTL 1970.

RODGERS, S. J. – MORTON, R. J. – BALDWIN, C. A.: A serological survey of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, *Rickettsia rickettsii* and *Borrelia burgdorferi* in dogs in Oklahoma. J. Vet. Diagn. Invest., 1, 1989: 154–159.

SÝKORA, J. – POKORNÝ, P. – ZÁSTĚRA, M. – BUKOVIAN-MALÝ, J. – PITHART, J. – VOSÁDKA, J.: Detection of *Borrelia* antibody in animals. In: Abstr. Int. Congress on Zoonoses, 29th August–1st September 1988, Brno, Czechoslovakia. 1988: code 6.11.

SÝKORA, J. – MINÁŘ, J. – ZÁSTĚRA, M. – PETŘÍKOVÁ, O. – VOKOUN, P.: Lyme Borreliosis in dogs. In: Abstr. Int. Congr. Zoonoses, 29th August–1st September 1988, Brno, Czechoslovakia. 1988: code 6.13.

TREML, F. – POSPÍŠIL, L. – OBUŘKOVÁ, P.: 1993. Serological survey of Lyme Borreliosis in animals and human. In: Abstr. Int. Congr. Zoonoses, 5–7 October 1993, Piešťany, Slovak Republic. 1993: 26.

Došlo 2. 6. 1995

Kontaktná adresa:

MVDr. Astéria Štefaničiková, CSC., Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovenská Republika
Tel. 095/633 44 55, fax 095/633 14 14

THE USE OF BIOMASS OF CHLOROCOCCAL ALGAE (*CHLORELLA VULGARIS*) FOR THE NURSING OF PHEASANTS

VYUŽITÍ BIOMASY CHLOROKOKÁLNÍCH ŘAS (*CHLORELLA VULGARIS*) PŘI ODCHOVU BAŽANTA OBECNÉHO

V. Kotrbáček, J. Filka, R. Halouzka, L. Hanák

University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: The effect of alga biomass (*Chlorella vulgaris*) on somatic growth, mortality rate and development of some indicators of defense was investigated in the first month after incubation in trials on 1,069 pheasants kept in the nursing facility of feathered game. The experimental group ($n = 568$) received 2.5% *Ch. vulgaris* in the feed mixture BŽ I in the first week and 0.5% in the second week of life; the alga was not added any more later. The control group ($n = 501$) received only the feed mixture BŽ I. A hundred one-day pheasants were randomly included in a parallel experiment carried out in laboratory conditions. The experimental group ($n = 50$) received 0.5% *Ch. vulgaris* in the feed mixture BŽ I from the 1st to the 28th day of life, the control group ($n = 50$) was given the mixture BŽ I only. At the age of 7, 14, 21 and 28 days, nine birds out of each group were killed by decapitation and blood samples were drawn to determine hematological values. Phagocytic activity of leucocytes was also determined, and at the end of the first month of life the pheasants were subject to cold stress tests, when body temperature, O_2 consumption and CO_2 output were measured. In comparison with the control, the addition of *Ch. vulgaris* increased the live weight of the experimental pheasants by 6.8% at the end of the second week and by 8.4% at the end of the first month of life ($p < 0.01$). The mortality rate over this period amounted to 46 birds in control, i. e. to 9.2%, and to 24 birds in the experimental individuals, i. e. to 4.2% (Tab. II). The experimental pheasants kept under laboratory conditions showed an earlier increase in the counts of monocytes ($0.02 < p < 0.05$) and the phagocytic activity at the end of the first month of life also had significantly higher values in these birds ($0.02 < p < 0.05$) – Fig. 1. A strong cold stress induced approximately the same decrease in body temperature, O_2 consumption in both groups, but the experimental individuals significantly exceeded the values in the control ($p < 0.01$) – Fig. 2.

Chlorella vulgaris; defense; phagocytic activity; oxygen consumption; pheasant

ABSTRAKT: Sladkovodní řasa *Ch. vulgaris* byla přidávána do krmiva pokusným bažantům ($n = 568$) v dávce 2,5 % v prvním a 0,5 % ve druhém týdnu po inkubaci. Ve srovnání s kontrolní skupinou ($n = 501$) přidavek zvyšoval živou hmotnost o 6,8 % na konci druhého týdne života ($p < 0,01$). V dalších dvou týdnech se tyto rozdíly zvýšily na 8,4 % ($p < 0,01$), přestože řasa již přidávána nebyla. Úhyny na konci prvního měsíce činily 46 ks, tj. 9,2 % u kontrol a u pokusných jedinců 24 ks, což představuje 4,2 %. V souběžném experimentu provedeném v laboratorních podmínkách, byla řasa přidávána do krmné směsi od prvního do 30. dne života v dávce 0,5 %. U pokusných bažantů ($n = 50$) byl ve srovnání s kontrolní skupinou ($n = 50$) zaznamenán dřívější vzestup počtu monocytů ($0,02 < p < 0,05$) na konci pokusného období i vyšší fagocytární aktivita leukocytů ($0,02 < p < 0,05$). Silný chladový stres vyvolával u obou skupin pokles teploty těla ($p < 0,01$), spotřebou O_2 však pokusní jedinci převyšovali kontroly ($p < 0,01$).

Chlorella vulgaris; obranyschopnost; fagocytární aktivita; spotřeba kyslíku

ÚVOD

O použití biologických krmných doplňků, jako jsou pivovarské kvasnice, mlezivo a jednobuněčná zelená řasa *Ch. vulgaris* ve výživě brojlerů jsme psali v minulém roce (Kotrbáček aj., 1994). Doložili jsme, že přidávání těchto aditiv do diety zvyšuje zejména v prvních čtyřech týdnech postinkubačního života nespecifickou obranyschopnost pokusných zvířat a v určitých věkových kategoriích i hladiny specifických protilátek. Z výsledků bylo patrné, že prokazatelný efekt byl zaznamenán i při použití

samotné biomasy řas. Tyto výsledky jen potvrdily dříve zaznamenané údaje o účinku vodného výluhu *Ch. vulgaris* na zdravotní stav mladých prasat (Smrček a Štěpek, 1981) a telat (Bouška, 1988).

U brojlerů jsme kromě již zmíněného vlivu na obranyschopnost zjistili také akceleraci vývoje lymfatických orgánů. Tyto výsledky nás přivedly k myšlence ověřit imunostimulační efekt řas u bažantích kuřat kde, jak je obecně známo, existuje vysoká postinkubační mortalita i zaostávání v somatickém vývoji u značné části uměle vylhnuté a odchovávané populace.

MATERIÁL A METODY

Pokusy probíhaly v odchovně lovné zvěře ŠZP Nový Jičín, farma Jinačovice. Do experimentu bylo zařazeno 1 069 jednodenních bažantů obecných. Polovina z nich byla krmena krmnou směsí BŽ I, druhé polovině byla k této směsi přidána suchá, desintegrovaná biomasa sladkovodních řas *Ch. vulgaris*, jejíž živinové složení udává tab. I. Přídavek řasy činil 2,5 % v prvním týdnu a 0,5 % ve druhém týdnu života. Do konce druhého týdne byli bažanti chováni v kruhových kójích na hluboké podestýlce z hoblin. Tepelný komfort byl zajišťován elektrickými infrazářiči typu Bios Sedlčany. Voda i krmivo byly podávány *ad libitum*. Na konci druhého týdne života byli po 70 kusech přemístěni do odchovných klecí, kde obě skupiny dostávaly pouze krmnou směs BŽ II. U bažantů byla dvakrát sledována individuální živá hmotnost, a to na konci druhého týdne života – před jejich přemístěním do klecí a na konci prvního měsíce věku. Dále byly denně sledovány úhyny zvířat.

Souběžně s experimentem v odchovně probíhal pokus na Ústavu fyziologie VFU Brno, kam bylo převe-

zeno 50 ks náhodně vybraných jednodenních bažantů z pokusné a 50 ks bažantů z kontrolní skupiny. Jejich odchov byl obdobný, tzn. v kruhových kójích na podestýlce z hoblin. Tepelný komfort byl zajišťován elektrickými infrazářiči. Krmení byli stejnou krmnou směsí BŽ I. Kontrolní skupina dostávala pouze tuto směs, pokusným jedincům byla od 1. do 28. dne života přidávána *Ch. vulgaris* v dávce 0,5 %. Ve věku 7, 14, 21 a 28 dnů bylo z každé skupiny devět kusů zabito dekapitací a odebrány vzorky krve. V krvi byly stanoveny běžné hematologické parametry a fagocytární aktivita leukocytů pomocí mikrosférických hydrofilních partiкул (souprava MSHP, kód RK 031, dodavatel ARTIM, s. r. o., Praha). Dále byly odebrány lymfatické orgány – slezina, thymus, Fabriciova burza a slepá střeva, ve kterých byl sledován vývoj zárodečných center, a to semikvantitativním vyhodnocováním histologických preparátů.

Na konci prvního měsíce života jsme zbylé jedince podrobili zátěžovým testům. Testy probíhaly následovně: experimentální bažant byl po změnění teploty těla umístěn na dobu 30 minut do metabolické respirační komory s teplotou vzduchu pohybující se mezi 13 a 14 °C.

I. Průměrné složení nativní biomasy řasy *Chlorella vulgaris* – Average composition of native biomass of the alga *Chlorella vulgaris*

Komponenta – Component	Obsah – Content	Jednotka – Unit
Dusikaté látky (N x 6,25) – Crude protein (N x 6,25)	55	% sušiny ¹
Lipidy – Lipids	13	% sušiny
Sacharidy – Saccharides	16	% sušiny
Popeloviny – Ash	10	% sušiny
Karotenoidy – Carotenoids	350	mg/100 g sušiny
Chlorofyly – Chlorophylls	2 000	mg/100 sušiny
Xantofyly – Xanthophylls	100	mg/100 g sušiny
Thiamin – Thiamine	1,5	mg/100 g sušiny
Riboflavin – Riboflavin	4,5	mg/100 g sušiny
Kyselina pantotenová – Pantothenic acid	2,3	mg/100 g sušiny
Kyselina nikotinová – Nicotinic acid	11,0	mg/100 g sušiny
Pyridoxin – Pyridoxine	6,0	mg/100 g sušiny
Kyselina listová – Folic acid	40,0	mg/100 g sušiny
Kobalamin – Cobalamin	0,08	mg/100 g sušiny
Kyselina askorbová – Ascorbic acid	1 500	mg/100 g sušiny
Biotin – Biotin	1,6	mg/100 g sušiny
Tokoferol – Tocopherol	100,0	mg/100 g sušiny
Vitamin K – Vitamin K	0,6	mg/100 g sušiny
Vitamin A – Vitamin A	2 400	mj/100 g sušiny
Hořčík – Magnesium	250	mg/100 g sušiny
Fosfor – Phosphorus	1 035	mg/100 g sušiny
Vápník – Calcium	330	mg/100 g sušiny
Železo – Iron	35	mg/100 g sušiny
Mangan – Manganese	10	mg/100 g sušiny
Zinek – Zinc	7	mg/100 g sušiny
Kobalt – Cobalt	0,7	mg/100 g sušiny
Měď – Copper	4	mg/100 g sušiny

¹dry matter

Ochlazovací vlastnosti prostředí komory byly regulovány pomocí čidla elektrického dynamického kateterometru (Česnek a Novák, 1971). Během pobytu v metabolické respirační komoře byla pomocí Spirolytu II zjišťována spotřeba kyslíku a výdej oxidu uhličitého. Po uplynutí 30 minut byl bažant z komory vyjmut, byla mu změřena teplota těla a byl po křídla namočen na 15 sekund do vody o teplotě 14 °C. Poté byl opět umístěn do metabolické komory a dalších 30 minut u něj byla sledována výměna plynů. Na konci 30. minuty mu byla změřena tělesná teplota a bažant byl přemístěn do boxu zahřívávaného elektrickým infračerveným zářičem na 35 °C. Po 30 minutách zahřívání a závěrečném zjištění tělesné teploty byl test ukončen. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny Studentovým *t*-testem.

VÝSLEDKY

Živou hmotnost bažantů v odchovně shrnuje tab. II. Rozdíl ve prospěch pokusných jedinců, nalezený ve 14 dnech života, byl vysoce významný ($p < 0,01$) a dále vzrostl na 8,4 % na konci prvního měsíce života ($p < 0,01$). Úhyny u pokusné skupiny byly přibližně poloviční, jak v první, tak ve druhé polovině sledovaného období.

Vývojem histologické struktury sledovaných lymfatických tkání se obě skupiny nelišily.

Změny sledovaných hematologických parametrů jsou uvedeny v tab. III. Průkazné rozdíly mezi oběma skupinami nalezeny nebyly. Za zmínku však stojí dřívější postinkubační vzestup počtu monocytů a fagocytární aktivity leukocytů, nalezený u jedinců krmených přísadkou biomasy řas (obr. 1).

Krátkodobé působení chladného vzduchu neovlivnilo úroveň teploty těla ani u pokusných jedinců, ani u kontrol (obr. 2). Kombinace vlhka a chladného vzduchu však průkazně snižovala tělesnou teplotu v obou skupinách. Půlhodinový pobyt podchlazených bažantů ve 35 °C vedl k rychlému vzestupu jejich tělesné teploty téměř na výchozí úroveň.

Spotřebou kyslíku a výdejem CO₂ se však obě skupiny odlišovaly významně. Bažanti, krmení směsí obsahující řasovou biomasu udržovali vyšší úroveň spotřeby O₂, jak v suchém chladu, tak po namočení do chladné vody ($p < 0,01$) – obr. 2.

DISKUSE

Přídavek řas do krmné směsi průkazně akceleroval růst živé hmotnosti bažantů v odchovně. V této souvislosti je nutné uvést, že 2,5% doplněk řas použitý v prvním týdnu života krmnou směs v hlavních živinách podstatněji neovlivnil. Prakticky došlo pouze k mírnému vzestupu N-látek, a to z 285 g na 298 g/kg krmné

II. Růst živé hmotnosti bažantů (g) – The growth of pheasant live weight (g)

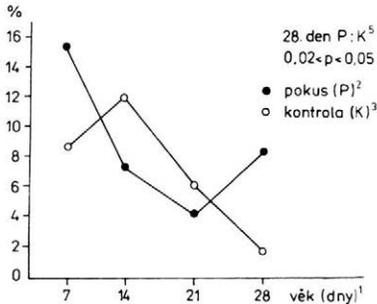
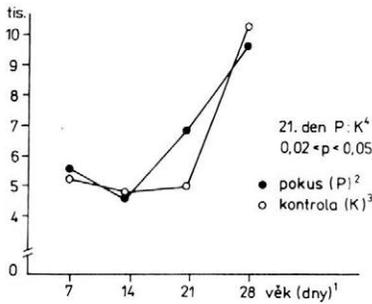
Věk ¹	Pokus ² (n = 568)	Kontrola ³ (n = 501)	Statistická významnost ⁴
Jednodenní ⁵	23,6 ± 1,78	23,7 ± 1,70	
Konec 2. týdne ⁶	59,9 ± 8,08	56,09 ± 8,60	$p < 0,01$
Konec 4. týdne ⁷	179,1 ± 26,1	165,3 ± 27,2	$p < 0,01$
Úhyny bažantů ⁸ (ks)			
Věk	Pokus	Kontrola	
Konec 2. týdne	12	22	
Konec 4. týdne	12	24	
Úhyny celkem ⁹	24	46	

¹age, ²trial, ³control, ⁴statistical significance, ⁵one-day, ⁶end of 2nd week, ⁷end of 4th week, ⁸pheasant mortality, ⁹total mortality

III. Postinkubační vývoj základních hematologických hodnot bažantů – Post-incubation development of the basic hematological values of pheasants

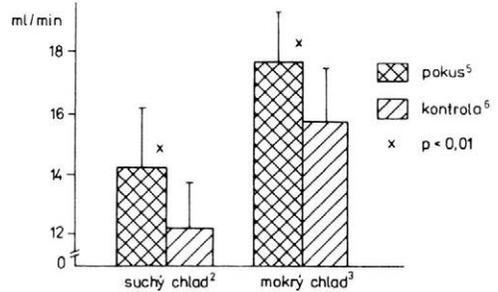
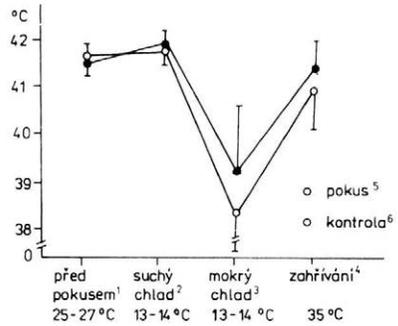
Den ¹	n = 9	Ht	Er (T/1)	Le (G/l)	Hb (g/l)
7.	Pokus ²	29,8 ± 4,104	2,01 ± 0,423	17,6 ± 3,560	207,3 ± 80,38
	Kontrola ³	31,6 ± 3,893	2,15 ± 0,237	17,4 ± 5,060	195,0 ± 67,37
14.	Pokus	30,7 ± 3,742	2,16 ± 0,359	25,7 ± 2,999	92,2 ± 9,797
	Kontrola	30,7 ± 3,202	1,97 ± 0,354	25,7 ± 2,942	89,7 ± 10,594
21.	Pokus	32,7 ± 2,784	2,17 ± 0,238	31,6 ± 5,313	100,1 ± 6,059
	Kontrola	32,9 ± 3,018	2,22 ± 0,245	30,8 ± 6,858	96,9 ± 9,777
28.	Pokus	31,8 ± 1,814	2,25 ± 0,227	31,7 ± 4,370	107,6 ± 7,883
	Kontrola	30,9 ± 3,143	2,12 ± 0,173	35,6 ± 8,098	106,5 ± 13,930

¹day, ²trial, ³control



1. Počet monocytů (tis.) a fagocytární aktivita leukocytů (%) – The counts of monocytes (thous.) and the phagocytic activity of leukocytes (%)

¹age (days), ²trial (P), ³control (K), ⁴day 21 P: K, ⁵day 28 P: K



2. Sledování teploty těla bažantů (°C) a spotřeby kyslíku (ml/min) – The graph of body temperature (°C) and oxygen consumption (ml/min) in pheasants

¹before trial, ²dry cold, ³wet cold, ⁴warming, ⁵trial, ⁶control

směsi. Toto zvýšení nepovažujeme za rozhodující také proto, že příjem krmiva v prvních dnech života bažantů kuřat je na nízké úrovni. Pohybuje se od 1,5 g v prvním dnu do 7,5 g na konci prvního týdne po inkubaci (Kotrbaček aj., 1992). Další vývoj potvrdil, že nalezené diference v hmotnosti nelze vztahovat k živinovému obohacení směsi řasami. Na konci čtvrtého týdne života se rozdíl v průměrné hmotnosti mezi oběma skupinami dále zvýšily ve prospěch pokusné skupiny, přestože řasa ve třetím a čtvrtém týdnu již podávána nebyla. Ve srovnání s pokusy provedenými např. na brojlerech (Chrappa, 1989; Kotrbaček aj., 1994) šlo o daleko výraznější efekt. Je známo, že u mladých bažantů existují značné individuální diference v postinkubačním vývoji. Ty často přetrvávají i v pozdějším věku. Zaostávání v somatickém vývoji v důsledku působení nejrůznějších stresorů, popř. úhynů slabších jedinců jsou pak běžným jevem. Z toho také vyplývá, že každá pozitivní stimulace časného vývoje se u tohoto druhu může daleko výrazněji projevit. O řasách víme, že vedle celé škály vitaminů a minerálních látek (tab. I) obsahují prekurzory k biosyntéze, např. prostacyklinů a prostaglandinů (Doucha, 1988). Vodný výluh aplikovaný jednorázově a parenterálně ovlivňoval např. krvetvorbu, ale i odolnost vůči radiačnímu stresu (Vacek aj., 1990, 1993).

U brojlerů jsme již na konci třetího týdne života zaznamenali stimulaci vývoje lymfatických orgánů a prudký vzestup fagocytární schopnosti leukocytů (Kotrbaček aj., 1994). Z předložených výsledků vyplývá, že u bažantů k obdobným změnám dochází zvolna, prakticky až ke konci prvního měsíce života, kdy u jedinců krměných řasou vzrostla významně fagocytární aktivita monocytů po předchozím zvýšení jejich počtu. Za mimořádně významný lze považovat vyšší příjem O₂ pokusných jedinců během chladového stresu. Ten svědčí o stimulaci oxidativního metabolismu, jako základního předpokladu pro rozvoj efektivní chemické termoregulace. Pro přežívání bažantů ve volné přírodě je právě vývoj této funkce rozhodující.

Naše výsledky opravňují k závěru, že přídavek biomasy řas do diety bažantů efektivně přispěl ke stimulaci sledovaných fyziologických ukazatelů na konci prvního měsíce života. Je tedy zřejmé, že sledování účinku tohoto biologického aditiva bude nutné rozšířit na starší věkové skupiny, kde lze očekávat jejich výraznější účinek. Na druhé straně však získané údaje zatím nevysvětlují nižší úhyn pokusných jedinců v odchovu zamerané již na konci druhého týdne života. Je pravděpodobné, že řasa ovlivnila vývoj dalších fyziologických funkcí. Jejich sledování bude předmětem našeho dalšího šetření.

LITERATURA

BOUŠKA, J.: První výsledky klinicko-biochemických sledování preparátu Ivastimul v provozních podmínkách odchovu telat. *Veterinářství*, 1, 1988: 19–29.

ČESNEK, J. – NOVÁK, L.: Electrical katatermometer, its construction and some examples of its use in physiological experiment. *Physiol. Bohemoslov.*, 20, 1971: 57.

DOUCHA, J.: Mikroskopické řasy – kulturní rostliny blízké budoucnosti? *Vesmír*, 67, 1988: 558–565.

CHRAPPA, V.: Produkční účinek skrmování sušených rias (*Chlorella*) u brojlerových kuřat. *Živoč. Výr.*, 34, 1989: 271–278.

KOTRBÁČEK, V. – FILKA, J. – JAMBOR, V. – JURAJDA, V. – KNOTKOVÁ, Z. – KRÍŽ, H. – ONDRÁČEK, J. – PAŽOUT, V. – RYŠAVÝ, M.: Zpráva o ověřování účinku sušené biomasy řas, šetrně sušených pivovarských kvasnic

a kravského mleziva na vybrané ukazatele užítkovosti a zdraví. Brno, VŠVaF 1992: 35.

KOTRBÁČEK, V. – HALOUZKA, R. – JURAJDA, V. – KNOTKOVÁ, Z. – FILKA, J.: Zvýšení obranyschopnosti brojlerů po podávání biologických krmných doplňků. *Vet. Med. – Czech*, 39, 1994: 321–328.

SMRČEK, Č. – ŠTĚPEK, M.: Uplatnění sladkovodních řas ve výkrmu jatečných prasat. *Náš chov*, 5, 1981: 164–166.

VACEK, A. – ROTKOVSKÁ, D. – BARTONÍČKOVÁ, A.: Radioprotection of hemopoiesis conferred by aqueous extract from chlorococcal algae (Ivastimul) administered to mice before irradiation. *Exp. Hematol.*, 18, 1990: 234–237.

VACEK, A. – DOUCHA, J. – LOJEK, A.: Increase of haemopoietic activity in mice by Ivastimul. In: *Abstr. of 6th. Int. Conf. on Applied Algology, České Budějovice 1993*: 130.

Došlo 18. 5. 1995

Kontaktní adresa:

Doc. ing. Václav K o t r b á č e k, CSc., Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1–3, 612 42 Brno, Česká republika
Tel. 05/41 32 11 07, fax 05/41 21 11 51

**Nejčerstvější informace o časopiseckých člancích
poskytuje automatizovaný systém**

Current Contents

na disketách

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna odebírá časopis „**Current Contents**“ řadu „**Agriculture, Biology and Environmental Sciences**“ a řadu „**Life Sciences**“ na disketách. Řada „Agriculture, Biology and Environmental Sciences“ je od roku 1994 k dispozici i s abstrakty. Obě tyto řady vycházejí 52krát ročně a zahrnují všechny významné časopisy a pokračovací sborníky z uvedených oborů.

Uložení informací z Current Contents na disketách umožňuje nejrozmanitější referenční služby z prakticky nejčerstvějších literárních pramenů, neboť báze dat je **doplňována každý týden** a neprodleně expedována odběratelům. V systému si lze nejen prohlížet jednotlivá čísla Current Contents, ale po přesném nadefinování sledovaného profilu je možné adresně vyhledávat informace, tisknout je nebo kopírovat na disketu s možností dalšího zpracování na vlastním počítači. Systém umožňuje i tisk žádanek o separát apod. Kumulované vyhledávání v šesti číslech Current Contents najednou velice urychluje rešeršní práci.

Přístup k informacím Current Contents je umožněn dvojím způsobem:

- 1) Zakázkový přístup** – po vyplnění příslušného zakázkového listu (objednávky) je vhodný především pro mimopražské zájemce.

Finanční podmínky: – použití PC – 15 Kč za každou započatou půlhodinu
– odborná obsluha – 10 Kč za 10 minut práce
– vytištění rešerše – 1 Kč za 1 stranu A4
– žádanky o separát – 1 Kč za 1 kus
– poštovné + režijní poplatek 15 %

- 2) „Self-service“** – samoobslužná práce na osobním počítači v ÚZLK.

Finanční podmínky jsou obdobné. Vzhledem k tomu, že si uživatel zpracovává rešerši sám, je to maximálně úsporné. (Do kalkulace cen nezapočítáváme cenu programu a databáze Current Contents.)

V případě Vašeho zájmu o tyto služby se obraťte na adresu:

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna
Dr. Bartošová
Slezská 7
120 56 Praha 2
Tel.: 02/25 75 41, l. 520, fax: 02/25 70 90

Na této adrese obdržíte bližší informace a získáte formuláře pro objednávku zakázkové služby. V případě „self-servisu“ je vhodné se předem telefonicky objednat. V případě zájmu je možné si objednat i průběžné sledování profilu (cena se podle složitosti zadání pohybuje čtvrtletně kolem 100 až 150 Kč).

HIGH-VOLTAGE ELECTROPHORETIC IDENTIFICATION OF RESIDUAL ANTIBIOTICS IN MILK

IDENTIFIKACE REZIDUÍ ANTIBIOTIK V MLÉKU VYSOKONAPĚŤOVOU ELEKTROFORÉZOU

P. Krčmář, V. Růžicková

Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: Residual antibiotics in milk were identified by high-voltage electrophoresis in 1% agarose gel and bioautographic detection. The test strain *Bacillus subtilis* BGA was used for the detection, pH of the culture medium was 8.0. An electrophoretic identification map of 13 selected antibiotics has been set up and the following minimal inhibition concentrations (MIC), expressed in µg per 1 g, have been established: benzylpenicillin 0.06; ampicillin 0.25; streptomycin 0.5; dihydrostreptomycin 0.2; spectinomycin 40; gentamycin 0.06; neomycin 0.15; oxytetracycline 5; tetracycline 2.5; chlortetracycline 1; erythromycin 0.01; tylosin 1; chloramphenicol 20. The established values of MIC were compared with the Maximum Residue Limits (MRL) as defined currently in the legislation of the European Union. The condensation of samples by freeze-drying increased the sensitivity of the method which was used for the identification of residual antibiotics detected by microbiological screening techniques in milk.

antibiotics; residues; minimal inhibition concentration; electrophoresis; bioautography; milk

ABSTRAKT: Vysokonapěťovou elektroforézou s bioautografickou detekcí byla identifikována rezidua antibiotik. Metoda používá pufr (pH 8,0) Tris a kyselinu jantarovou a agarózový gel (1%). Elektroforéza probíhala 17 min za konstantního výkonu 120 W a chlazení tekoucí vodou. K detekci byl použit bakteriální testační kmen *Bacillus subtilis* BGA, pH kultivačního média 8,0. Sestavili jsme elektroforetickou identifikační mapu 13 druhů vybraných antibiotik (obr. 1), pro která jsme stanovili minimální inhibiční koncentrace (MIC). Získané hodnoty MIC byly srovnány s maximálními limity reziduí EEC (tab. I). Současně za stejných kultivačních podmínek jsme testovali MIC na Petriho misce. Hodnoty MIC určené na Petriho misce byly ve všech případech vyšší než hodnoty stanovené na elektroforetické desce. Citlivost metody byla zvýšena zakoncentrováním vzorků lyofilizací. Pro ověření této techniky byl vybrán penicilin, u kterého bylo dosaženo desetinásobného zakoncentrování. Metoda vysokonapěťové elektroforézy byla použita k identifikaci reziduí antibiotik prokázaných screeningovými mikrobiologickými metodami v mléce. Bylo vyšetřeno 22 vzorků, ve kterých byl zjištěn penicilin samostatně 20x a penicilin v kombinaci s neomycinem dvakrát. Vysokonapěťová elektroforéza představuje alternativní multidetekční metodu pro identifikaci reziduí antibiotik prokázaných screeningovými mikrobiologickými metodami. Ve srovnání s nízkonapěťovou elektroforézou, která je v současné praxi běžně používána, je rychlejší a lépe od sebe odlišuje antibiotika ve směsi. Přestože pro svoji mikrobiologickou detekci nevyhovuje předpisům Food and Drug Administration a Council Regulation EEC, získané výsledky potvrzují vhodnost použití vysokonapěťové elektroforézy pro stanovení reziduí antibiotik v potravinách.

rezidua antibiotik; minimální inhibiční koncentrace; elektroforéza; bioautografie; mléko

INTRODUCTION

Antibiotics are administered to farm animals for therapeutic and prophylactic purposes and as growth stimulants. The resulting antibiotic residues cause considerable technological problems and economic losses, can increase health risks and have ecological impacts. It is therefore necessary to continue the development of more accurate methods of determination and identification of antibiotics. In addition to microbiological screening methods, physico-chemical procedures are used.

Smither and Vaughan (1978) reported on the electrophoretic identification of several dozens of antibiotics by high-voltage electrophoresis, describing the

effects of using agar or agarose and of pH of the migration buffer on the separation and using the strains ATCC 11778 and ATCC 9341 of *Bacillus cereus* and *Micrococcus luteus*, respectively, for the detection. Tao and Poumeyrol (1985) identified 13 antibiotics by low-voltage electrophoresis using the bacterial strains *Micrococcus luteus* ATCC 9431, *Bacillus subtilis*, *B. cereus* ATCC 6452, *St. aureus* SS.7625, and *Bacillus stearothermophilus* v. *calidolactis*. Recently, methods of identification of antibiotics in milk by electrophoresis in agar or agarose gel have been described by Hrdlička (1991) and Cutting et al. (1995).

Hrdlička (1991) has set up an electrophoretic identification map for 7 antibiotics using the strains

Bacillus subtilis BGA, *B. stearothermophilus* v. *calidolactis* C 953, and *Micrococcus luteus* ATCC 9431 for the detection. C u t t i n g et al. (1995) identified six β -lactam antibiotics detecting them with the strain *Bacillus stearothermophilus* v. *calidolactis* ATCC 10149.

The aims of our experiments were to test the identification of residual antibiotics by high-voltage electrophoresis with bioautographic detection and to improve the test by a suitable pretreatment of samples.

MATERIALS AND METHODS

Electrophoresis

The electrolyte buffer (pH 8.0) contained 3.0 g tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) and 0.9 g succinic acid per 1 l distilled water. The agarose gel (1% in the buffer) was poured onto a glass plate (30 x 18 cm) to obtain a 1-mm layer. The agarose plate was placed into a laboratory-made cooling bath and connected with the buffer with paper strips. Thirty μ l of standards or samples were pipetted into wells with diameters of 6 mm. The distance between the starting line and the end of the anode was 12 cm. The electrophoresis was run for 17 min at the constant output of 120 W using the Power Pack 3000 source (Bio Rad). The agar plate was cooled with running water.

Identification of standards and determination of minimal inhibition concentrations (MIC)

Fresh standards of antibiotics (Sigma) were prepared before each testing. The basic solutions, containing 1 mg per 1 ml, were prepared with water [dihydrostreptomycin (DHS), gentamycin (GEN), neomycin (NEO), tetracycline (TC), chlortetracycline (CTC), chloramphenicol (CHL)], phosphate buffer, pH 6.0 [benzylpenicillin (PEN)], phosphate buffer, pH 8.0 [streptomycin (STR)], or methanol [ampicillin (AMP), spectinomycin (SPC), oxytetracycline (OTC), erythromycin (ERY), tylosin (TYL)]. The basic solutions were diluted with 10% aqueous solution of low-fat dried milk. Five concentrations were prepared from each basic solution so that the presumed MIC was in the middle of the dilution series. MIC were calculated from ten measurements of the given concentration and determined at the same time, under identical culture conditions, in Petri dishes. A separate electrophoregram was prepared for each antibiotic. Moreover, the standards were identified in mixtures of 2 to 3 antibiotics at the respective MIC. The obtained values were compared with the Maximum Residue Limits (MRL) as defined currently in the European Union legislation.

Bioautographic detection

The test strain *Bacillus subtilis* BGA, grown in a medium containing 3.45 g peptone, 3.45 g enzymatic casein hydrolysate, 5.1 g sodium chloride, 6.5 g agar,

and 1.0 g potassium dihydrophosphate in 1 l distilled water (pH adjusted to 8.0 with sodium hydroxide), was used for the detection of the separated antibiotics. The density of the spore suspension was adjusted to 10^6 per 1 ml. 0.8 ml of the suspension were mixed into 75 ml of the culture medium and poured onto the electrophoretic plate. After 18 hours of incubation in a laboratory-made chamber at 30 °C, the distances between the inhibition zones and the starting lines were measured in positive samples.

Identification of residual antibiotics in milk

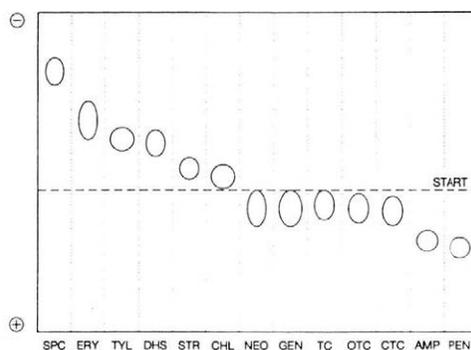
Milk samples positive for antibiotic residues by microbiological screening tests were pipetted onto the electrophoretic plates and identified along with the standards of the presumed antibiotics.

Freeze-drying

Selected antibiotic standards at concentrations 10 times lower than the respective MIC were freeze-dried (Lyovac GT 2, FINN-AQUA), and subsequently reconstituted with water to 10% of the original volume and identified electrophoretically.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the identification of the selected antibiotic standards are shown in Fig. 1. The highest mobilities towards the anode were observed in benzylpenicillin and ampicillin, followed by tetracyclines, gentamycin and neomycin. The migration speed towards the cathode increased in the following order of antibiotics: chloramphenicol - streptomycin - dihydrostreptomycin - tylosin - erythromycin - spectinomycin. It is evident from Fig. 1 that no resolution was possible within the group of tetracycline antibiotics and between gentamycin and neomycin. Identical values of MRL have been laid down [(EEC) Regulations No. 2701/94] for all substances belonging to the tetracycline group and therefore group-specific identification



1. Identification map of antibiotics

I. Minimal inhibition concentrations and maximal residue limits of antibiotics

Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/g}$)	MRL ($\mu\text{g/g}$)
Benzylpenicillin	0.06	0.004
Ampicillin	0.25	0.004
Streptomycin	0.5	N.E.
Dihydrostreptomycin	0.2	0.2*
Spectinomycin	40	0.2
Gentamycin	0.06	N.E.
Neomycin	0.15	N.E.
Oxytetracycline	5	0.1
Chlortetracycline	1	0.1
Tetracycline	2.5	0.1
Erythromycin	0.01	0.04
Tylosin	1	0.05
Chloramphenicol	20	no MRL

N.E. = No. MRL has been set so far

* = WHO/FAO Joint Expert Committee on Feed Additives

is satisfactory. Separation of mixtures of two (PEN + STR) or three (DHS + NEO + PEN) antibiotic standards yielded identical results as far as the direction and speed of migration of individual antibiotics were concerned. The differences in motility of individual antibiotics facilitated their separation and identification. Under the given conditions, the electrophoretic separation of individual antibiotics (excepting GEN and NEO) can be regarded as satisfactory. The decision in the case of gentamycin and neomycin will depend on the respective limits which have not yet been laid down in the (EEC) Regulations. It is evident from Tab. I that the obtained values of MIC comply with the (EEC) Regulations only in the case of erythromycin (MIC 0.01 $\mu\text{g/g}$, MRL 0.04 $\mu\text{g/g}$) and dihydrostreptomycin (MIC 0.2 $\mu\text{g/g}$, MRL 0.2 $\mu\text{g/g}$). Bacterial test strains that are more sensitive to the individual antibiotics, such as *Bacillus stearothermophilus* v. *calidolactis* for benzylpenicillin (Cutting et al., 1995), or a modification of the detection conditions, such as the adjustment of pH to 6.0 for the identification of chlortetracycline with *Bacillus subtilis* BGA (Hrdlička, 1991) are possible ways how to reach the required values of MIC. It is also possible to increase the concentration of the antibiotics in the samples by freeze-drying or extraction (Cutting et al., 1995). The detection limit for chloramphenicol cannot apparently be reached under the given conditions. Normally, chloramphenicol residues are not detectable with microbiological methods, because 90% of the antibiotics are excreted in urine as an inactive glucuronide (Koenen-Dierick et al.,

1995). The results of determination of MIC with the plate method were invariably higher than those of the electrophoretic separation. Benzylpenicillin alone was detected in twenty and benzylpenicillin + neomycin in two of the twenty two milk samples tested by high-voltage electrophoresis. A tenfold increase was reached in the concentration of benzylpenicillin selected to test the technique of concentration by freeze-drying.

High-voltage electrophoresis is an effective alternative method of identification of antibiotic residues demonstrated with microbiological screening methods. Compared with the currently used low-voltage electrophoresis, the described variant is less time-consuming and yields a better resolution of antibiotic mixtures. The high-voltage electrophoresis is a suitable method for the determination of antibiotic residues in spite of certain limitations resulting from the use of microbiological detection which does not comply with the current Food and Drug Administration and EU regulations. Indisputable merits of electrophoretic techniques are easy processing of samples and effective separation. According to the current EU legislative, our continuing studies will concentrate on further electrophoretic techniques, such as capillary electrophoresis/mass spectrometry or capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection.

REFERENCES

- CUTTING, J. H. – KIESSLING, W. M. – BOND, F. L. – McCARRON, J. E. – KREUZER, K. S. – HURLBUT, J. A. – SOFOS J. N.: Agarose gel electrophoretic detection of six β -lactam antibiotic residues in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, 78, 1995: 663–667.
- HRDLIČKA, J.: Identifikace reziduí antibiotik ve tkáních jatečných zvířat elektroforézou s bioautografickou detekcí. *Vet. Med. – Czech, (Praha)*, 36, 1991: 695–701.
- KOENEN-DIERICK, K. – OKERMAN, L. – DE ZUTTER, L. – DEGROODT, J. M. – VAN HOOF, J. – SREBRNIK, S.: A one-plate microbiological screening test for antibiotic residue testing in kidney tissue and meat: An alternative to the EEC four-plate method? *Food Addit. Contam.*, 12, 1995: 77–82.
- SMITHER, R. – VAUGHAN, D. R.: An improved electrophoretic method for identifying antibiotics with special reference to animal tissues and animal feeding stuffs. *J. Appl. Bact.*, 44, 1978: 421–429.
- TAO, S. H. – POUMEYROL, M.: Méthodes de détection des antibiotiques dans les viandes par électrophorèse. *Recu. Méd. Vét.*, 161, 1985: 457–463.
- Commission Regulation (EC) No. 2701/94, 3059/94, 1442/95.
- Council Regulation (EEC) No. 2377/90.

Arrived on 7th September 1995

Contact Address:

Pavel Krčmář, 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*)

Dvuměsíčník, 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.

Autori 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 zřetel 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 přesáhnout 10 stran psaných na stroji včetně tabulek, obrázků a grafů. V práci je nutné používat jednotky odpovídající soustavě měřových 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 zkratky nepoužívat.

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

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

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

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

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

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

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

Literatura musí odpovídat státní normě ČSN 01 0197. Citace se řadí abecedně podle jména prvních autorů. Odkazy na literaturu v textu uvádějí jméno autora a rok vydání. Do seznamu se zařadí jen práce citované v textu. Na práci 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. 3, March 1996

CONTENTS

Vinkler A., Dvořák R., Kudláč E.: The effect of experimental metabolic stresses on ovulation and progesterone levels in cows.....	65
Mudroň P., Kováč G., Bartko P., Choma J., Žežula I.: Effect of vitamin E on cortisol, lactate, and acid base balance in transported calves	71
Malnar L., Čož-Rakovac O., Hacmanjek M., Teskeredžić Z., Teskeredžić E., Tomec M., Strunjak-Perović I., McLean E., Naglič T.: Vibriosis in rainbow trout cultured in the Krka estuary, Croatia: occurrence and comments	77
Štefančíková A., Škardová I., Peško B., Janovská D., Cyprichová V.: Antibodies IgG to <i>Borrelia burgdorferi</i> in dogs from Košice region.....	83
Kotrbaček V., Filka J., Halouzka R., Hanák L.: The use of biomass of chlorococcal algae (<i>Chlorella Vulgaris</i>) for the nursing of pheasants	87
Krčmář P., Růžičková V.: High-voltage electrophoretic identification of residual antibiotics in milk ..	93

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 41, č. 3, Březen 1996

OBSAH

Vinkler A., Dvořák R., Kudláč E.: Vliv experimentálně vyvolaných metabolických zátěží na průběh ovulace a hladiny progesteronu u krav	65
Mudroň P., Kováč G., Bartko P., Choma J., Žežula I.: Vplyv vitamínu E na hladinu kortizolu, laktátu a acidobazickou rovnováhu u teliat vystavených transportnej záťaži	71
Malnar L., Čož-Rakovac O., Hacmanjek M., Teskeredžić Z., Teskeredžić E., Tomec M., Strunjak-Perović I., McLean E., Naglič T.: Vibrióza pstruha duhového chovaného v ústí řeky Krka: výskyt a komentář	77
Štefančíková A., Škardová I., Peško B., Janovská D., Cyprichová V.: Antiboreliové protilátky IgG u psův z regionu Košic.....	83
Kotrbaček V., Filka J., Halouzka R., Hanák L.: Využití biomasy chlorokokálních řas (<i>Chlorella Vulgaris</i>) při odchovu bažanta obecného	87
Krčmář P., Růžičková V.: Identifikace reziduí antibiotik v mléku vysokonapětovou elektroforézou	93

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