

ÚZPI

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

1

VOLUME 42 (LXIX)
PRAHA
JANUARY 1997
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

Doc. MVDr. ing. Jiří Brož, CSc., Reinfelden, Switzerland

Arnost Cepica, DVM., PhD., Associate Professor (Virology/Immunology), Atlantic Veterinary College, U.P.E.I., Charlottetown, Canada

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

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

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

Prof. MuDr. Drahomír Horák, DrSc., Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. RNDr. Petr Hořín, CSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. František Kovář, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MUDr. M. V. Nermut, PhD., DSc. (h. c.), 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., Jilové u Prahy, Czech Republic

Prof. MVDr. Zdeněk Vězník, 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: Agriis, CAB Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

Periodicita: Časopis vychází měsíčně (12x ročně), ročník 42 vychází v roce 1997.

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.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: braun@uzpi.agrec.cz. Podrobné pokyny pro autory lze vyžádat v redakci.

Informace o předplatném: Objednávky na předplatné jsou přijímány pouze na celý rok (leden–prosinec) a zasílají se na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací, vydavatelské oddělení, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 1996 je 564 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: Agriis, 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 42 appearing in 1997.

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.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: braun@uzpi.agrec.cz. Applications for detailed instructions for authors should be sent to the editorial office.

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 132 USD (Europe), 138 USD (overseas).

ANALYSIS OF HIP JOINT DYSPLASIA DEVELOPMENT IN DOGS

ANALÝZA VÝVOJA DYSPLÁZIE BEDROVÝCH KLBOV U PSOV

V. Ledecký, A. Ševčík, I. Capík, A. Trbolová

University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: Hip joint dysplasia in dogs occurs mainly in large and heavy breeds. It brings about changes on the acetabulum (socket) and the head of thigh bone, thus causing pain, tiredness, refusal to jump and refusal of increased activity. Even though presently the genetic basis of development of this disease, numerous literary sources indicate existence of pre-disposing factors that facilitate development in later stages of life. Diet and unbalanced development of skeleton and support tissues – ligaments, joint capsule and musculature also have the effect on development of dysplasia. We have analyzed acquired results of X-ray examination of dogs – German shepherds. The size of the group was 4 206 and the examination was aimed at incidence of hip-joint dysplasia during the period of 1977–1995 in the Slovak Republic. We have found out that in 1977 there were 70.7% positive cases out of the total number of examined individuals. Gradual exclusion of dogs with heavier grades of dysplasia (D, E) decreased occurrence of dysplasia to current rate of 40.8%. We considered it to be a high incidence rate. Internal structure of the positive group has changed. The number of dogs with the lightest grade of dysplasia (B) has increased, while the number of heavier grade dysplasia (C, D, E) decreased. In other breeds of dogs, of which more than 20 have been examined at the clinic, the following results have been acquired: Slovak chuvash – 32%, Bavarian and Hannover bloodhound – 30.6%, Rotweiler – 28.6%, Newfoundland dog – 26.3%, Bern sheep-dog – 13.6%. At the same time we analyze the incidence of dysplasia in dogs whose parents were negative. Group of descendants of 11 negative males and 28 females consisted of 73 dogs. Through x-ray examination, 42.5% of dogs were found to have dysplasia B, C and D at the age of 1 year.

dog: German shepherd; hip joint; dysplasia

ABSTRAKT: Analyzujeme výskyt dysplázie bedrových kĺbov u psov plemena nemecký ovčiak za obdobie rokov 1977 až 1995 v Slovenskej republike. Röntgenologické vyšetrenia a vyhodnotenia boli urobené na Klinike chirurgie, ortopedie a röntgenológie Univerzity veterinárneho lekárstva v Košiciach. Hodnotili sme všeobecne doteraz používanou päťstupňovú škálou: A – negatívny, B, C, D, E – pozitívny. Celkovo hodnotíme röntgenologické nálezy u 4 206 psov plemena nemecký ovčiak a u 127 psov plemien slovenský čuvač, bavorský a hannoverský farbiar, rotweiler, novofundlánsky pes, bernský salašnícky pes. V sledovanom období sa znížil počet pozitívnych psov s dyspláziou bedrových kĺbov zo 70,7 % v roku 1977 na 40,8 % v roku 1995, čo poukazuje na pozitívny vplyv preventívnej diagnostiky na dyspláziu bedrových kĺbov. Výskyt dysplázie u ďalších plemien je nižší – slovenský čuvač (32 %), bavorský a hannoverský farbiar 30,6%, rotweiler (28,6 %), novofundlánsky (26,3 %), bernský salašnícky pes (13,6 %). Súčasne podávame aj prehľad výskytu dysplázie u potomstva, ktorých rodičia boli negatívni. Celkom sme vyhodnotili potomstvá u 11 negatívnych psov a 28 negatívnych súk. Negatívni rodičia na dyspláziu bedrových kĺbov (pes a suka) nedávali psov prostých na dyspláziu. Z 28 vrhov bolo 31 pozitívnych jedincov (42,5 %) so stupňami 1 až 3 (B, C, D).

pes: nemecký ovčiak; bedrový kĺb; dysplázia

ÚVOD

Dysplázia bedrových kĺbov sa vyskytuje u veľkých a ťažkých plemien psov. Toto ochorenie je všeobecne definované ako vývojové a nie vrodené. Podľa autorov Lust a Parrel (1977), ako aj na základe našich poznatkov, je dysplázia bedrových kĺbov vážny medicínsky a chovateľský problém, pretože spôsobuje obmedzenie pohybu, vznik osteoartrózy bedrového kĺbu, bolesť a krívanie. Vo väčšine prípadov postihuje psov s veľmi dobrými exteriérovými vlastnosťami. Dysplázia je problémom, pretože podľa autorov Fox a i. (1987) je to dedičné ochorenie a do dnešných dní nebol stanovený jej prirodzený pôvod ani úspešný spôsob

prevencie. Riser (1975) uvádza, že nesúlad medzi utváraním kostného podkladu bedrového kĺbu a svalov vytvára podmienky pre rozvoj dysplázie. Dokumentuje to zistením a potvrdením ďalších autorov, že u šteniat sa bedrový kĺb vyvíja normálne a diagnostika sa dá uskutočniť až u dospelých psov. Výskyt dysplázie sa dá podľa Hedhammara (1979) znížiť, ak sa na kríženia používajú psy s röntgenologicky normálnymi kĺbami. Flückiger a i. (1995) hodnotením takmer 3 700 psov rôznych plemien dokazujú, že výskyt dysplázie sa vo Švajčiarsku výrazne nezmenšil za sledované 30-ročné obdobie, kde pozitívni jedinci predstavujú až 42 %. S preventívnym röntgenologickým vyšetrením na dyspláziu bedrových kĺbov sme začali na klinike chirurgie,

ortopédie a röntgenológia v roku 1977 len u nemeckých ovčiakov, ktorí boli chovaní v armáde a u polície. Neskôr sa vykonávala depistáž u všetkých nemeckých ovčiakov, ktorí mali preukaz o pôvode.

MATERIÁL A METÓDA

Podávame analýzu výsledkov röntgenologického vyšetrenia bedrových kĺbov u psov plemena nemecký ovčiak za sledované obdobie 1977 až 1995 v Slovenskej republike. Výsledky sú spracované na základe posúdenia röntgenogramov psov starších ako 12 mesiacov. Röntgenogramy boli zhotovené z bedrových kĺbov psov vo ventro-dorzálnej projekcii, kedy páňové končatiny boli v extenzii.

Doplňame, že od začiatku preventívneho röntgenologického vyšetrenia (1977) chovateľský Klub nemeckého ovčiaka zaraďoval do plemenitby len psov, ktorí mali maximálne 2. stupeň dysplázie (C). Stupnica hodnotenia bola: negatívny – 0. (A), pozitívny – 1. až 4. stupeň (B až E). Pri hodnotení sme vychádzali z hĺbky acetábula, polohy hlavice femuru v acetábule, šírky kĺbového priestoru medzi acetábulom a hlavicou femuru a prítomnosti osteofytov na prednom a zadnom okraji acetábula. Súčasne sme hodnotili tvar hlavice a krka stehnej kosti. Za fyziologickú hĺbku acetábula bola považovaná nameraná hodnota 105°. Podávame prehľad aj o výskyte dysplázie bedrových kĺbov u ďalších plemien psov – slovenský čuvač, rotweiler, bavorský a hanoverský farbiar, novofundlandský pes, bernský salašnícky pes za obdobie 1990 až 1995. U týchto plemien bolo posúdených najmenej 20 psov.

Hodnotili sme výskyt dysplázie bedrových kĺbov u potomstva zdravých psov a zdravých súk bez nálezu na dyspláziu. Celkom bolo hodnotené potomstvo 11 psov a 28 zdravých súk. Vo veku jedného roka bolo röntgenologicky vyšetrených 73 psov.

VÝSLEDKY

Vývoj dysplázie bedrových kĺbov u psov plemena nemecký ovčiak za hodnotené obdobie 1977 až 1995 je uvedený na obr. 1. V roku 1977 sme na klinike začali oficiálne uskutočňovať vyšetrenia na dyspláziu bedrových kĺbov. Röntgenologické vyšetrenia sme robili u psov vo ventrodorzálnej polohe s extenziou panvových končatín smerom dozadu, pričom sa požadovalo, aby osi panvových končatín prebiehali paralelne s osou tela.

Počet pozitívnych psov na rôznych stupňoch dysplázie v roku 1977 je 70,7 %, čo predstavuje hodnotu, akú sme doteraz v literatúre nezaznamenali. Je značne vysoká a poukazuje na rozsiahly výskyt tohto ochorenia u nemeckých ovčiakov. V rokoch 1978 až 1980 bolo pozitívnych psov na dyspláziu bedrových kĺbov približne o 19 % menej. V nasledujúcom päťročnom období (1981 až 1985) ďalej rapídne klesal výskyt dys-

plázie a predstavoval už len 27,7 % z vyšetrených psov, čo je súčasne najmenšie percento výskytu dysplázie u nemeckých ovčiakov za celé hodnotené 19-ročné obdobie. Súčasne bolo najvyššie percento aj negatívnych prípadov (72,3 %). Táto hodnota je vyššia ako hodnota pozitívnych psov na dyspláziu v roku 1977.

Nasledujúce hodnotené obdobia sú charakterizované vzrastajúcou tendenciou pozitívnych prípadov. V rokoch 1986 až 1990 predstavovalo 31,4 % a v rokoch 1991 až 1995 40,8 %. Je výrazný rozdiel pri porovnávaní počiatočného roka (1977), kedy sa začalo s diagnostikou na dyspláziu, s ostatnými hodnotenými obdobiami.

Na obr. 2 analyzujeme výskyt pozitívnych psov plemena nemecký ovčiak podľa jednotlivých stupňov. V roku 1977 bolo najviac psov so stupňom B, teda najľahšou formou dysplázie a predstavovalo 45,6 %. Najnižší výskyt dysplázie bol v skupine E s najrozsiahlejšími zmenami na acetábule a hlavici kosti bedrovej; hodnota dosiahla 7,6 %. Stupeň C sa podieľal na výskyte 23,4 % a stupeň D 22,9 %. Z obr. 2 ďalej vyplýva, že ďalšie sledované obdobia v porovnaní medzi sebou majú minimálne rozdiely a sú takmer zhodné, ale v porovnaní s obdobím 1977 až 1980 výrazne rozdielne.

Od roku 1981 sa zvyšuje počet psov s ľahkým stupňom dysplázie (B). Tento vývoj má stúpajúcu tendenciu až do súčasnosti, pričom sa znižuje počet psov so stupňami C, D a E. Stupeň B dosiahol v rokoch 1991 až 1995 69,3 %. Klesajúci je výskyt všetkých ťažších stupňov (C, D a E). V rokoch 1991 až 1995 stupeň C predstavuje 17,9 %, D 10,7 % a stupeň E len 2,1 %. Pomer medzi výskytom dysplázie stupňa B a ostatnými stupňami (C, D a E) sa zväčšuje v prospech najľahšieho stupňa dysplázie.

Na obr. 3 je výskyt dysplázie bedrových kĺbov u psov rôznych plemien, ktoré sú vyšetované od roku 1991 na našej klinike.

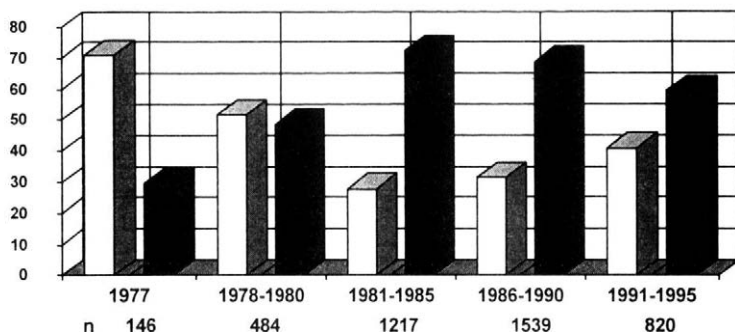
Dyspláziou sú najviac postihnuté, po nemeckom ovčiakovi, plemeno slovenský čuvač (32 %) a hannoverský a bavorský farbiar. Posledné z plemien sú zaradené medzi poľovnícke. Pozitívnych prípadov je 30,6 %. U plemena rotweiler sa dysplázia vyskytuje u 28,6 %, u novofundlandského psa 26,3 % a u bernského salašníckeho psa 13,6 %. Sú to plemená, ktorých počet vyšetrených na dyspláziu bedrových kĺbov prevyšil počet 20.

Zo sledovaných 28 vrhov, kde boli rodičmi negatívni psy a suky na dyspláziu, vyplýva, že vo veku jedného roka bolo röntgenologicky vyšetrených 73 psov, z toho bolo pozitívnych 31 jedincov, čo predstavuje 42,5 %. U týchto pozitívnych jedincov sa vyskytovali stupne v rozsahu B, C a D.

DISKUSIA

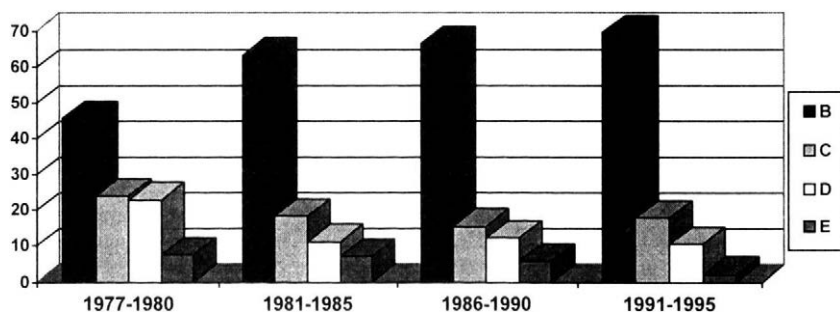
Po dlhobodej röntgenologickej diagnostike dysplázie bedrových kĺbov vyplýva, že touto chorobou sú

%

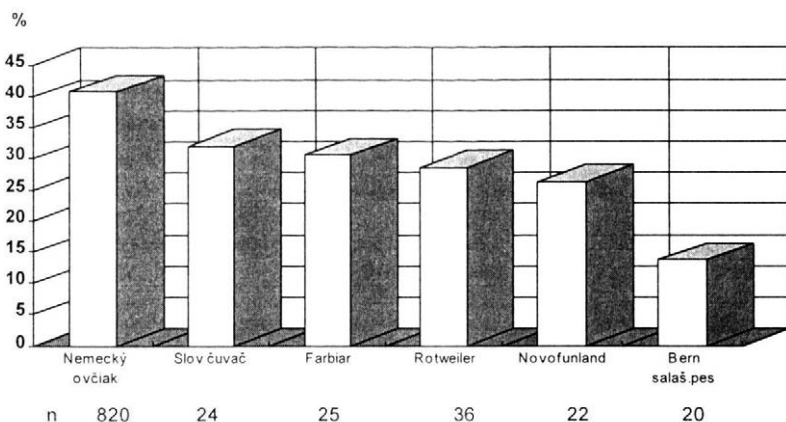


1. Vývoj dysplázie bedrových klbov u psův plemene německý ovčák za období roku 1977 až 1995 – The pattern of hip joint dysplasia in dogs of the German Shepherd breed in 1977–1995

□ pozitivně – positive
■ negativně – negative



2. Analýza pozitivních psův plemene německý ovčák na dyspláziu bedrových klbov podľa stupňov – Analysis of positive dogs of the German Shepherd breed for hip joint dysplasia according to the grades



3. Výskyt dysplázie bedrových klbov podľa plemien v roku 1991 až 1995 – The occurrence of hip joint dysplasia according to the breeds in 1991–1995

Německý ovčák – German Shepherd, Slováček – Slovak Chuvash, Farbiar – Bloodhound, Rotweiler, Novofunland – Newfoundland, Bern salaš pes – Bern Sheep-dog

postihnuté výlučne plemená veľkých a ťažkých psův. Dávame to do súvisu s hmotnosťou zvierat, uhľovaním končatín a zatažovaním klbov. Alexander (1992) podporuje štúdie, kde dysplastickí psy sa rodia s nor-

málnymi bedrovými klbami, ale vývoj dysplázie je potom ako výsledok nesprávneho vývoja bedrového klbu a jeho podporných mäkkých tkanív, ligamentov, klbového púzdra a svalov.

Všeobecne ak porovnávame naše výsledky s výsledkami, ktoré dosiahol Flückiger (1995) vo Švajčiarsku, veľké rozdiely nie sú. Konštatuje, že po 30 rokoch röntgenologického vyšetrenia na dyspláziu bedrových kĺbov sa percento pozitívnych jedincov akoby ustáilo približne na 40. Podobné výsledky sme dosiahli aj u nás. Podobná je aj štruktúra pozitívnych jedincov. Najviac postihnutých psov u plemena nemecký ovčiak je s najmenším stupňom dysplázie bedrových kĺbov (B) a percento klesá so zvyšujúcim sa stupňom dysplázie. Ani v jednom zo sledovaných období nebola u pozitívnych psov táto krivka zmenená.

Od roku 1986 klesá percento negatívnych psov a stúpa percento pozitívnych psov. Na to máme vysvetlenie. Po desaťročnom vyhodnocovaní došlo k zmene vyhodnotenia radiogramov. Sprísnil sme kritériá. Väčší dôraz sa kladol nielen na hĺbku acetábulu, ale aj na tvar hlavice, krčka, prítomnosť osteofytov na prednom a zadnom okraji acetábulu. Detailizovali sme posúdenie radiogramov.

Vek vyšetrených psov bol minimálne 12 mesiacov. V USA vyžadujú pre röntgenologické vyšetrenie na dyspláziu vek 24 mesiacov. Súhlasíme s názorom, že by bolo potrebné presunúť vek na 18 mesiacov pre zhotovenie radiogramu na dyspláziu, ale vyšetrit psov aj vo veku okolo šiestich mesiacov. V tomto období by sa vyradili jedinci s výraznými zmenami a zlepšila by sa ekonomika chovu. Niektorí majitelia psov vyžadujú zhotovenie radiogramov v tomto veku, avšak ak je acetábulum plytké a laxita bedrového kĺbu výraznejšia, nechcú akceptovať toto stanovisko.

Čo sa týka presunu veku na 18 mesiacov, náhodne sme zistili u psov starších ako 1,5 až 2 roky vyšší stupeň dysplázie, u ktorých sa prejavilo krívanie, neochota dlhodobého tréningu, únava a pod. To značí, že u predysplastických psov v neskoršom období sa zistia rozsiahlejšie zmeny na dyspláziu, hlavne artróza bedrového kĺbu.

Z hľadiska ďalšieho zníženia výskytu dysplázie by sa vyžadovalo zaradenie do plemenitby len negatívnych jedincov a ich negatívnych potomkov. Doterajší stav z hľadiska dysplázie, ale zhoršili by sa exterierové vlastnosti. Takéto výsledky podľa Flückigera (1995) sa dosiahli u plemena bernský salašnícky pes, ale pre nespokojnosť členov klubu sa tento postup zrušil.

Ak by sa vyradili z chovu pozitívni psy s výbornými exterierovými vlastnosťami, dosiahol by sa žiaduci stav z hľadiska dysplázie, ale zhoršili by sa exterierové vlastnosti. Takéto výsledky podľa Flückigera (1995) sa dosiahli u plemena bernský salašnícky pes, ale pre nespokojnosť členov klubu sa tento postup zrušil.

Na výskyt dysplázie má podľa Hazeuinkela (1994) vplyv aj výživa. Kelly a i. (1992) zistili na základe sledovania 48 psov plemien Labrador Retrievers, ktorých polovica bola kŕmená suchou potravou *ad libitum* a druhá polovica dostala o 25 % krmiva menej, že vyššia incidencia dysplázie bedrových kĺbov je u psov prvej skupiny, teda psov prekrmovaných.

Podľa Ficusa (1990 – cit. Flückiger, 1995), by sa dysplázia v Nemecku mala ovplyvniť zákonom o zvieratách, kde by sa mala zakázať plemenitba na zvieratách, ak sú postihnuté dedičnými chorobami.

Najperspektívnejšie výsledky pre zníženie výskytu dysplázie u psov sa očakávajú po vypracovaní tzv. genetických kárt. Horizont posudzovania zdravotného stavu psov na základe genetiky nie je ešte jasný.

Konštatujeme, že výskyt dysplázie u psov sa za sledované obdobie znížil, ale ďalšie ozdravenie chovu hlavne u nemeckého ovčiaka od dysplázie sa nedarí. Na to má vplyv aj stav, ak sa do plemenitby zaraďujú aj jedinci, i keď len so stupňom B a C.

LITERATÚRA

- ALEXANDER, J. W. (1992): The pathogenesis of canine hip dysplasia. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 22, 503–511.
- FLÜCKIGER, M. – LANG, J. – BINDER, H. – BUSATO, A. – BOOS, J. (1995): Die Bekämpfung der Hüftgelenk dysplasie in der Schweiz. Ein Rückblick auf die vergangenen 24 Jahre. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 137, 243–250.
- FOX, S. M. – BURNS, J. – BURT, J. (1987): Dysplastic hip: A crippling problem in dogs. *Vet. Med.*, 82, 684–693.
- HAZEWINKELE, H. A. (1994): Hip dysplasia. In: WILLS, J. M. – SIMPSON, K. W.: *The Waltham Book of Clinical Nutrition of the Dog and Cat*. 472 pp.
- HEDHAMMAR, A. (1979): Canine hip dysplasia: Study of heritability in 401 litters of German shepherd dogs. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 174, 1012–1014.
- KELLY, R. D. – OLSSON, S. E. – MONTI, K. T. et al. (1992): Effects of limited food consumption on the incidence of hip dysplasia in growing dogs. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 201, 857–863.
- LUST, G. – PARREL, P. W. (1977): Hip dysplasia in dogs. The interplay of genotype and environment. *Cornell. Vet.*, 67, 447–466.
- RISER, W. H. (1975): The dog as a model for the study of hip dysplasia. *Vet. Pathol.*, 12, 229–231.

Received 96–04–26

Accepted for publication 96–07–22

Kontaktná adresa:

Doc. MVDr. Valent Ledecký, CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská Republika
Tel. 095/633 21 11, fax 095/632 36 66

BRUCELLOSIS IN FISH

BRUCELÓZA RYB

S. F. Salem¹, A. Mohsen²

¹*Serum and Vaccine Research Institute, Abasia-Cairo, Egypt*

²*Animal Reproduction Department, National Research Center, Dokki, Cairo, Egypt*

ABSTRACT: Brucellosis is a zoonotic infectious disease that represents serious economic and health problems. It has been extensively studied in different species of livestock but literary references to fish brucellosis are scarce. Therefore, the purpose of the research hereby presented was to investigate the serologic-bacteriologic response of Nile catfish to experimental infection with brucellosis. Thirty predatory catfishes were used. They were divided into two groups. The first was subjected to *s. c.* infection with *Brucella melitensis* biovar 3, the other to *s. c.* application of physiological solution. Three fishes from each group were killed once a week within 5 weeks to subject them to serologic-bacteriologic examinations. It was found that brucella antibodies were detected in the blood of infected fishes after 7 days post-inoculation. The antibody titre was maintained throughout the period of observation. The organism was also recovered from visceral organs of infected fishes. On the other hand, none of control fishes showed any serologic or bacteriologic response. These results suggest that fish could be considered as a susceptible species to brucellosis. Subsequently, further studies are needed to clarify the possible role of fish in the disease transmission.

Brucella melitensis; catfish; infection; serologic-bacteriologic response

ABSTRAKT: Brucelóza je zoonózní infekční choroba, která přináší vážné hospodářské a zdravotní problémy. Rozsáhlé studie se týkaly různých druhů dobytka, ale literární odkazy na brucelózu ryb jsou vzácné. Cílem této studie bylo prokázat sérologickou a bakteriologickou reakci sumce na experimentální infekci brucelózou. Do sledování bylo zařazeno 30 dravých sumců, rozdělených do dvou skupin. V první, pokusné skupině, jsme provedli infekci ryb *s. c.* biovarem 3 *Brucella melitensis*, ve druhé, kontrolní skupině, byl aplikován *s. c.* fyziologický roztok. Během pěti týdnů byly jednou týdně utráceny tři ryby z každé skupiny a podrobeny sérologickému a bakteriologickému vyšetření. Protilátky proti brucelám byly zjištěny v krvi infikovaných ryb sedm dní po inokulaci. Během pokusného období zůstal titer protilátek zachován. *B. melitensis* byla izolována také z vnitřních orgánů infikovaných ryb. Naproti tomu žádná kontrolní ryba nevykazovala sérologickou ani bakteriologickou reakci. Výsledky naznačují, že by se ryby mohly považovat za druh náchylný k brucelóze. Následovně je třeba uskutečnit další studie pro objasnění možné úlohy ryb při přenosu této choroby.

Brucella melitensis; sumec; infekce; sérologická a bakteriologická reakce

INTRODUCTION

Brucellosis is one of the important zoonotic problems affecting different species of animals and man. It is prevalent throughout the world including Egypt. It has been studied extensively in various species of livestock but scanty information regarding its occurrence in fish is available. Except the work of Gelev and Gelev (1988), who isolated pathogenic bacterium that of classical *Brucella* (S. form) from fish it causes a bacterial epizootic in trout characterised by haemorrhagic diathesis – whereas, Gelev et al., (1990) described a bacterium responsible for haemorrhagic septicaemic disease in rainbow trout, this bacterium exhibited some antigenic similarity to *B. abortus*. There are no data about experimental brucellosis in fish in the available literature. Thus, the current study was planned to investigate the serologic-bacteriologic response of Nile catfish to experimental infection with brucellosis.

MATERIAL AND METHODS

Thirty catfish were kept in glass aquarium supplied with dechlorinated water and fed a suitable ration, as described by Eurell et al. (1978). They were serologically negative for brucellosis.

Brucella melitensis culture

B. melitensis biovar 3 isolated from cattle was cultured on tryptose agar slant at 37 °C for 48 hr. The bacterial growth was harvested to produce an antigen according to Alton et al. (1988).

Serological tests

Standard agglutination test (SAT) and Rose Bengal plate test (RBPT) were employed following the technique of Alton et al. (1988). Fish were divided into

two groups, the first group was injected subcutaneously at the base of the pelvic fin with 0.2 ml of bacterial suspension adjusted to 10^5 organisms as described by Alton et al. (1988). The second group was considered as control injected with saline. Three fishes were sacrificed 7 days postinoculation from each group and for 5-week weekly interval. Their sera were collected and tested against brucella antibodies by SAT and RBPT. Attempts were made to reisolate *B. melitensis* organisms from visceral organs (spleen and liver) according to Alton et al. (1988).

RESULTS

In the present study all the experimentally infected fish (group 1) showed the presence of brucella antibodies by serological tests SAT and RBPT. The titres were maintained throughout the period of observation. The brucella agglutinins were detected after 7 days of inoculation with a decreasing trend by passing the weeks. The infected fish in this study yielded brucella organisms from 14 days postinoculation from tissues of liver and spleen (Tab. I).

The injected fish with the *B. melitensis* field strain organisms have cleared obvious spots on the head and tail and gargious spreading all over the body. Liver and spleen showed congested spotted and a little bit enlarged. Neither serologic nor bacteriologic response was detected in control fishes.

DISCUSSION

Fish as substitutes of animal protein are considered nowadays most inviting. They represent one of the best

nutritious, relatively cheap foodstuff, if compared with other animal protein sources.

Investigations of fish for detection of risky bacteria appeared therefore of importance, for the sake of protecting such a wealth.

Living of catfish in water channels where farmers used to throw dead carcasses and contaminated animal materials beside the swimming of living animals, all of this unhygienic deal with water leads to its contamination with serious microorganisms and later transmission of these organisms to fish resulting in their infection (Post, 1983).

Thus, it was found worthy to make an inquiry on the subject under the Egyptian environmental conditions. It was hoped to shed a beam of light on the occurrence of brucella infection in fish. It was hardly surprising that when suspension of brucella organisms was injected *s. c.*, agglutinins appeared in the blood after 7 days postinoculation. The organism was also recovered from infected fish.

On the basis of the present study, it may be concluded that fish are susceptible to brucella infection and the organisms, though induce antibody response. These findings are pointed to the need for consideration of all possible host parasite relationships and interaction of species that might be involved as reservoirs of disease. This becomes increasingly important as disease control or disease eradication programmes continue to reduce the incidence of infection. They also open the gate to study the possible role of fish as reservoirs of infection for other animals and man; they need further investigation in Egyptian traditional habits. Moreover, in light of this study, fish could be provided as a model for laboratory bacteriologic diagnosis of brucellosis.

I. Serological and bacteriological screening of brucella experimentally infected fish ($n = 3$)

Weeks post inoculation	No. of positive fish by sero diagnostic	Serological test		No. of positive fish by bacterio diagnosis
		RBPT	SAT	
1	2	+	1/40 1/40	–
2	3	+	1/80 1/320 1/160	2
3	3	+	1/320 1/320 1/640	3
4	3	+	1/160 1/80 1/160	2
5	3	+	1/80 1/80 1/80	2

Acknowledgment

The authors would like to thank Pavlina Mohsenova for typing the manuscript and for editorial assistance.

REFERENCES

- ALTON, G. G. – JONES, I. M. – ANGUS, R. D. – VECTOR, J. M. (1988): Techniques for brucellosis laboratory. Paris, ISBN.
- EURELL, T. E. – LEWIS, D. H. – GRUMBLES, L. C. (1978): Comparison of selected diagnostics tested for detection of motile *Aeromonas septicemia* in fish. Amer. Vet. Res., 39, 1384–1386.
- GELEV, I. – GELEV, E. (1988): A new species of fish pathogenic bacterium antigenically related to classical brucellae. Zbl. Bakt. Hyg., A., 269, 1–6.
- GELEV, I. – GELEV, E. – STEIGERWALT, A. G. – CARTER, G. P. – BRENNER, D. S. (1990): Identification of the bacterium associated with haemorrhagic septicaemia in rainbow trout as *Hafnia alvei*. Res. Microbiol., 141, 573–576.
- POST, G. (1983): Textbook of fish health. West Sylvania, New Jersey, Publication. Inc. Ltd.

Received 96–04–22

Accepted for publication 96–08–14

Contact Address:

Dr. Ahmed Mohsen, Animal Reproduction Department, National Research Centre, Tahrir street, Dokki, Cairo, Egypt
Tel. 202/70 12 11, fax 202/70 16 15

INFORMATION

AT THE BEGINNING OF THE NEW YEAR

The journal Veterinary Medicine enters its 42nd volume. The changes of the format, realized in 1995, have been considered by authors and readers as a positive step forward. In 1996, 203 authors from 40 institutions participated in the publication of the results. During the last year, authors from Denmark, Egypt and the Republic of Croatia published in Veterinary Medicine in addition to those from the Czech Republic and the Slovak Republic. The average period required to publish a manuscript was 7.3 months. 70 per cent of papers were published within 7 months and 83 per cent up to 9 months after receiving the manuscript. The times when the journal was being issued with several months of delay, are gone.

The attempts of the Editorial Board to improve the peer reviewing process have been accepted with an appreciation. New members of the Editorial Board contributed significantly to this editorial policy. The Editorial Board prepared new instructions for the authors, which are available at the Editor's office. Our authors can contribute themselves to the fast assessment by paying attention to their manuscripts and to the recommendations of the referees. The authors can also contribute to the increase of the impact of our journal by sending the reprints to their partners and to the quoted authors.

My warmest thanks are addressed to all our authors, referees, members of the Editorial Board and Editor in Chief Ing. Z. Radošová for their fruitful cooperation. I wish you all the best and a Happy New Year.

*Professor Karel Hruška
Chairman of the Editorial Board*

INFORMACE

NA PRAHU NOVÉHO ROČNÍKU

Veterinární medicína vstupuje do svého 42. ročníku. Změna formátu, uskutečněná od roku 1995 a zahrnující i uvádění názvu článků a abstraktů v angličtině na začátek každé práce, je považována autory i čtenáři za prospěšnou. V roce 1996 se na publikovaných výsledcích podíleli 203 autoři ze 40 pracovišť a 38 % prací bylo uveřejněno v angličtině. Kromě autorů z České republiky a ze Slovenské republiky publikovali v uplynulém roce ve Veterinární medicíně i autoři z Chorvatské republiky, z Dánska a z Egypta. Průměrná doba od obdržení rukopisu do uveřejnění byla 7,3 měsíce, 70 % rukopisů bylo uveřejněno do 7 měsíců. Doba, kdy časopis vycházel se zpožděním několika měsíců, je dávnou minulostí.

Redakční rada se setkává s příznivým ohlasem na zvýšení náročnosti lektorského řízení, k němuž významně přispívají i noví členové redakční rady: Prof. MUDr. M. V. Nermut, PhD., DSc. (h.c.), z Velké Británie; A. Čepica, DVM., PhD., Associate Professor, z Kanady; Doc. MVDr. RNDr. P. Hořín, CSc., Doc. MVDr. F. Kovář, DrSc., a Prof. RNDr. V. Suchý, DrSc., z Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně a Prof. MUDr. D. Horký, DrSc., z Masarykovy univerzity v Brně. Někteří členové redakční rady získali významná ocenění: Prof. MUDr. L. Pospíšil, DrSc., čestný doktorát veterinárního lékařství Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně, Prof. MVDr. Z. Věžík, DrSc., medaili lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně a RNDr. M. Fránková, CSc., udělila Akademie věd České republiky doktorát chemických věd.

Redakční rada připravila podrobné pokyny pro autory, které je možno si vyžádat v redakci a které je třeba důsledně dodržovat. Všichni naši autoři mohou sami nejlépe přispět k rychlému posouzení rukopisů a k jejich zařazení do tisku tím, že budou zpracovávat rukopis i připomínkám lektorů věnovat co nejvyšší pozornost. Autoři také mohou přispět ke zvýšení impact faktoru našeho časopisu tím, že separáty svých prací rozešlou svým partnerům a citovaným autorům i bez vyžádání. Hodnocení časopisů je také založeno na zdrojích citací, které autoři používají. Proto nesmí být opomíjeny práce, uveřejněné v časopisech s vysokým impact faktorem a naopak nemohou být používány citace závěrečných zpráv, přednášek na konferencích a abstraktů, uveřejněných ve sbornících. Práce s těmito zdroji informací budou lektory vyřazovány. Velmi důležitá je také kvalita anglických textů. I za ně ručí autoři, redakce má omezenou možnost provádět jazykové úpravy. Doporučujeme proto úzkou spolupráci s kolegy, kteří mají angličtinu jako svůj mateřský jazyk. V současné době elektronické pošty není vzdálenost téměř žádnou překážkou při zasílání souborů a odborná a jazyková úprava je použitím textových editorů velmi usnadněna. Redakce přivítá informace autorů o tom, s kým byl rukopis konzultován po odborné nebo jazykové stránce. V průvodním dopise uvádějte laskavě plné jméno, správně označení pracoviště a spojení, nejlépe e-mail adresu. Tato informace může přispět k rychlejšímu průběhu lektorského řízení.

Všem našim autorům, lektorům a vedoucí redaktorce paní Ing. Z. Radošové děkujeme za dosavadní spolupráci a do Nového roku jim přejí hodně zdraví a úspěchů.

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

TESTING OF CULTURE MEDIA FOR DETECTION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN BULK MILK SAMPLES

TESTOVÁNÍ KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ PRO STANOVENÍ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* V BAZÉNOVÝCH VZORCÍCH MLÉKA

P. Benda, M. Vyletělová

Research Institute for Cattle Breeding, Rapotín, Czech Republic

ABSTRACT: Three common selective agar culture media were tested with respect to detection of *Staphylococcus aureus*: Baird-Parker agar (BP), Mannitol-Salt-Phenol agar (MAN) and Vogel-Johnson agar (VJ). All media were cultivated at temperatures of 37 °C and 43 °C. Three groups of samples were used for investigations: 1. pure cultures of 52 collection strains of *S. aureus* received from the Czech Microorganism Collection (Tab. I), 2. pure cultures of 75 laboratory strains of *S. aureus* from samples of cow raw milk and 3. 223 bulk samples of cow raw milk. Medium recovery and frequency of medium failure were evaluated, as well as subjective evaluation of medium selectivity and count feasibility was done. The best results of recovery and failure frequency were observed in BP/37 °C for all three groups; except the collection strains, in which a distinction from BP/43 °C was only moderately significant ($P = 0.1$; Tab. II), statistically significantly better results of recovery against the other media were determined for BP/37 °C in all cases (Tabs. III, VI, IX). No other medium with better results was found out for any other group of samples as regards failure frequency (Tabs. IV, VII, X). Recoveries of BP/43 °C ranged from 78 to 95% in comparison with BP/37 °C (Figs. 1–3). A group of three media (VJP/37 °C, MAN/37 °C, MAN/43 °C) showed similar results in all groups of samples, statistically significant differences were rare (Tabs. III, VI, IX); recoveries ranged from 55–85% in comparison with BP/37 °C (Figs. 1–3). The cultivation on VJ/43 °C turned out absolutely inappropriate. Subjective evaluation (Tab. IX) revealed BP/43 °C as the best medium, particularly due to the clearly expressed diagnostic traits and high selectivity for accompanying microflora. Enterococci were the most important accompanying microflora in cases of BP/37 °C, BP/43 °C and VJ/37 °C; while in MAN/37 °C and MAN/43 °C the microflora making the count difficult consisted of representatives of the genera *Staphylococcus*, *Micrococcus* and *Bacillus*. Determinations on different media (except VJ/43 °C) well correlated with each other in general (Tabs. V, VIII, XI), the differences in correlations between the pairs of media were not commonly statistically significant.

milk; bulk samples; detection of *Staphylococcus aureus*; culture media

ABSTRAKT: Byla testována tři běžná agarová kultivační média pro stanovení *Staphylococcus aureus*: Baird-Parker agar (BP), Manitol-Salt-Phenol Red agar (MAN) a Vogel-Johnson agar (VJ). Všechna média byla kultivována při teplotě 37 °C a 43 °C. Ve sledování byly použity tři skupiny vzorků: 1. čisté kultury 52 sbírkových kmenů *S. aureus*, získaných z České sbírky mikroorganismů (CCM), 2. čisté kultury 75 laboratorních kmenů *S. aureus* ze vzorků syrového mléka a 3. 223 bazénové vzorky syrového kravského mléka. Hodnocena byla záchytnost médií, frekvence selhání médií a subjektivně také selektivita média a snadnost odečtu. Nejlepší výsledky v záchytnosti a frekvenci selhání byly ve všech třech skupinách vzorků pozorovány u BP/37 °C, nejhorší pak u VJ/43 °C. Nejlepším médiem z hlediska selektivity a snadnosti odečtu se jevil BP/43 °C.

mléko; bazénové vzorky; stanovení *Staphylococcus aureus*; kultivační média

ÚVOD

Při stanovení *Staphylococcus aureus* v bazénových vzorcích mléka je výběr vhodného selektivního kultivačního média s dostatečnou přesností a dobrou reprodukovatelností výsledků základním problémem. Vzhledem k poměrně vysokému výskytu vzorků mléka s počty nad 50 CFU/ml (Benda a Vyletělová, 1995) a také vzhledem k vyšším tolerovaným hladinám výskytu *S. aureus* v syrovém mléce (EEC 92/46) není nezbytně nutné v diagnostických postupech používat

pomnožovací krok. Problém se pak zužuje na výběr pevného média.

Selektivním agens v půdách, používaných v současné době pro kultivaci *S. aureus*, bývá nejčastěji vyšší koncentrace NaCl (Chapman, 1945), antibiotika či chemoterapeutika (Devriese, 1981), telurititan draselný, chlorid lithný (Baird-Parker, 1962; Giolioti a Cantoni, 1966). Většina kultivačních médií je také diagnostickými médii; k rozlišení bývá využíváno utilizace manitolu (Vogel a Johnson, 1960; Chapman, 1945), lecitinázy (Baird-Parker,

ker 1962), nukleázy (Lachica, 1984) nebo volné koagulázy (Stadhouders aj., 1976; Beckers aj., 1984). Někteří autoři (Van Doorne aj., 1982) také doporučují kultivovat materiál s obsahem *S. aureus* při zvýšené teplotě, a to až při 43 °C.

Normativní doporučení IDF 1992, (ČSN 560089) pro stanovení *S. aureus* v mléce a mléčných výrobcích jsou založena na kultivaci vzorku na Baird-Parker agaru, metodiky IDF a ČSN zahrnují i alternativní kultivaci vzorků s nízkým počtem *S. aureus* v pomnožovacím bujónu (Gioliotti a Cantoni, 1966) MPN (most probably number) technikou. Nevýhodou tohoto postupu je však částečná ztráta kvantifikace stanovení.

V laboratoři VÚCHS Rapotín byl v rámci sledování výskytu *S. aureus* v bazénových vzorcích mléka od roku 1989 používán MAN agar. Kvalitu MAN média jsme však testovali pouze orientačně (Benda a Vyletěl, 1995). Médium doporučeným pro detekci *S. aureus* v mléce a mléčných výrobcích (i potravinách obecně) je BP agar. V současné době tedy vzhledem ke standardizaci metod hodláme i v naší laboratoři přejít na BP médium. Ověření správnosti uvedeného kroku, stanovení korelace mezi kultivačními metodami a také zjištění subjektivních kvalit médií (obecná selektivita, snadnost odečtu) byly důvody k testaci. V neposlední řadě jsme také potřebovali detailně ověřenou metodiku pro plánované stanovení korelace mezi výskytem stafylokoků v bazénových vzorcích a prevalencí stafylokokových mastitid ve stádech.

Kritériem k výběru kultivačních pūd pro sledování byla komerční dostupnost pūd a komponent, snadná příprava a jednoduchá kultivace média, neboť metodiky pro předpokládané koncové uživatele (terénní lékařské a veterinární laboratoře) by měly být pokud možno robustní a jednoduché.

MATERIÁL A METODA

Sbírkové kmeny *Staphylococcus aureus*

Celkem 52 lyofilizátů sbírkových kmenů *S. aureus*, poskytnutých Českou sbírkou mikroorganismů (tab. I), bylo předepsaným způsobem (Páček, 1991) revita-

lizováno. Kmeny byly poté dvakrát přeočkovány na živný agar č. 2 (Imuna, Šarišské Michařany) s kultivací 24 h/37 °C. Po 24 h byla kultura suspendována v 10 ml fyziologického roztoku a naředěna tak, aby se výsledná hustota suspenze pohybovala mezi 500 až 2 000 CFU/ml.

Kalibrace nefelometrického ředění byla provedena decimálními ředěními 24hodinové kultury *S. aureus* ve fyziologickém roztoku; v naředěných suspenzích byl měřen zákal (Spekol 11, Zeiss Jena) a současně byly stanoveny počty CFU/ml (GTK agar, Milcom Tábor) pour-plate metodou.

Terénní izoláty kmenů *Staphylococcus aureus*

75 izolátů *S. aureus* z bazénových vzorků syrového kravského mléka s biochemicky ověřenou identitou bylo dvakrát, podobně jako u sbírkových kmenů, pasážováno na živném agaru č. 2 (Imuna, Šarišské Michařany) s kultivací 24 h/37 °C. Suspenze mikroorganismů ve fyziologickém roztoku byly připraveny shodným způsobem se sbírkovými kmeny.

Bazénové vzorky mléka

K pokusu byly použity bazénové vzorky mléka, analyzované v rámci pravidelného screeningu kvality mléka v oblasti KDV Zábřeh na Moravě. Každý vzorek během měsíčního sledování pocházel z jiného odběrného místa. Celkem bylo analyzováno 223 vzorků syrového kravského mléka. Vzorky mléka nebyly konzervovány, analyzovány byly do dvou hodin po doručení do laboratoře.

Kultivační média

Byla testována tři média pro kultivaci *S. aureus*: MAN agar (příprava vlastní, předpis Merck No. 5404), VJ agar (HiMedia, Bombay, India) a BP agar (báze Imuna, Šarišské Michařany; Egg-Yolk emulze HiMedia). Po inokulaci 0,1 ml suspenze mikroorganismů (sbírkové kmeny a izoláty *S. aureus*) nebo 0,1 ml mléka (bazénové vzorky) na povrch testovaných kultivač-

I. Seznam testovaných sbírkových kmenů *S. aureus* z CCM (České sbírky mikroorganismů Brno) – A list of tested collection strains of *S. aureus* from CCM (Czech Collection of Microorganisms, Brno)

Sbírková čísla CCM ¹							
681	1770	2317	2339	2459	2571	4245	5973
885	1776	2323	2350	2460	2773	4246	5984
1484	2022	2326	2351	2461	2829	5755	6188
1486	2107	2327	2352	2504	3376	5756	
1766	2286	2328	2353	2524	3859	5757	
1767	2287	2330	2457	2551	3953	5971	
1768	2301	2331	2458	2561	4223	5972	

¹CCM collection codes

ních půd, rozetření a dosušení probíhala kultivace za podmínek uvedených v tab. II.

Pro sbírkové kmeny a terénní izoláty byly odečítány všechny vyrostlé kolonie. V bazénových vzorcích mléka pak byly počítány suspektní kolonie *S. aureus*; pro BP antracitově černé, lesklé kolonie, které mohou být obklopené zónou lýzy lecitinu a lesklým halo v okolí kolonií, pro VJ antracitově černé, lesklé kolonie, obklopené žlutou zónou utižace manitolu a pro MAN žlutě až oranžově pigmentované, se zónou utižace manitolu okolo kolonií.

II. Kultivační podmínky pro jednotlivá média – Cultivation conditions for the particular media

	37 °C	43 °C
Baird-Parker agar (BP)	24–48 h	24 h
Mannitol-Salt-Phenol Red agar (MAN)	72 h	48 h
Vogel-Johnson agar (VJ)	24–48 h	24 h

Při kultivaci bazénových vzorků mléka byly jednotlivé kolonie odpíchnuty a subkultury identifikovány. V případě výskytu více suspektních typů kolonií byly subkultury založeny ze všech typů. Jako *S. aureus* byly určeny kmeny manitol pozitivní, s produkcí α či β -hemolysinu (testováno dle autorů Skalka aj., 1979), clumping faktoru, koagulázy a žlutého pigmentu. Kmeny s některými znaky negativními či dubiozními byly dále identifikovány komerčním setem STAPHY-test Lachema a identifikačním programem TNW 4.0. Celkový počet *S. aureus* byl pak roven součtu všech pozitivně identifikovaných typů kolonií.

Hodnocení, statistické metody

Hodnocena byla záchytnost, výskyt chyb (selhání) jednotlivých testovaných kultivačních médií a korelace mezi jednotlivými páry médií. Subjektivně byly také posuzovány selektivita médií a snadnost odečtu. Vzhledem k absenci extrémních odchylek, zvláště pak v oblasti maximálních hodnot (testováno Dixonovým testem extrémních odchylek), bylo možné považovat aritmetické průměry za hodnověrné údaje o záchytnosti médií. Záchytnost pak byla vyjádřena v procentech; za základ bylo vzato médium s nejvyšší záchytností. Za selhání média byl považován případ, kdy při paralelní kultivaci téhož vzorku nebo čisté kultury na dvou médiích byla splněna empirická nerovnost:

$$(Z_1 + k) \cdot 4 \leq Z_2; k = 3$$

kde Z_1 , Z_2 jsou záchytnosti na jednotlivých médiích. Přičtením konstanty byly částečně korigovány nevýznamné chyby v oblasti malých čísel, obzvláště pro vzorky mléka.

Pro statistické hodnocení rozdílů mezi záchytnostmi jednotlivých médií bylo vzhledem k typickému párovému uspořádání pokusu zavrženo použití analýzy rozptylu

a bylo použito párového *t*-testu. Dále byly výsledky vyhodnoceny také neparametrickým Wilcoxonovým párovým testem a znaménkovým testem. Hodnoceny byly vždy dvojice kultivačních médií, celkem pak vždy 15 dvojic pro každý statistický test. Výskyt „selhání“ kultivačních médií byl hodnocen opět pro jednotlivé páry médií. K testování hypotézy nezávislosti výskytu selhání na kultivačním médiu bylo použito χ^2 -testu pro tetrahorickou kontingenční tabulku. Hypotéza rovnosti korelačních koeficientů byla testována pomocí Fisherovy Z-transformace.

Při subjektivním hodnocení médií byla posuzována snadnost odečtu jako stupeň odlišení kolonií *S. aureus* oproti ostatním mikroorganismům; dále byla hodnocena selektivita média a riziko falešně pozitivních a falešně negativních výsledků při kultivaci bazénových vzorků mléka. Byla použita čtyřbodová stupnice hodnocení médií: 1 – velmi dobré, 2 – dobré, 3 – méně vhodné a 4 – nevhodné.

VÝSLEDKY

Sbírkové kmeny *Staphylococcus aureus*

Sbírkové kmeny stafylokoků ze všech tří sledovaných skupin vzorků vykazovaly nejmenší variabilitu při kultivaci na různých kultivačních médiích a při různých teplotách. Nejlepší výsledky jsme získali pro BP agar, kultivovaný při teplotě 37 °C. Poněkud horší záchytnost jsme pozorovali u BP/43 °C, a to ve výši 95 % BP/37 °C. Rozdíly však byly minimální a pouze párovým *t*-testem jsme detekovali statisticky slabě průkazné ($P = 0,10$) rozdíly. Následuje skupina tří médií, VJ/37 °C, MAN/37 °C a MAN/43 °C, které mají ve všech statistických testech vysoce průkazné ($P = 0,01$) horší záchytnosti oproti BP/37 °C a BP/43 °C. Uvnitř této skupiny jsme však nezjistili rozdíly; záchytnost se pohybovala mezi 80 až 84 %. Zcela neuspokojivé výsledky jsme získali kultivací na VJ agaru při teplotě 43 °C. Selhání médií při kultivaci sbírkových kmenů bylo kromě zcela nevyhovujícího VJ/43 °C pozorováno pouze v jednom případě u BP/43 °C a nebylo statisticky významné. U sbírkových kmenů byly také pozorovány nejvyšší korelace mezi jednotlivými páry médií.

Shrnutí výsledků testování se sbírkovými kmeny udává obr. 1 (relativní záchytnost jednotlivých médií) a tab. III, IV a V (statistické hodnocení záchytnosti, selhání a korelací). Tabulky hodnotící interakce mezi médií jsou uspořádány křížově. Jsou-li interakce jednostranné (statistické hodnocení rozdílů v záchytnosti, korelační koeficienty), tabulky jsou čitelné v řádcích i sloupcích; tabulky selhání (tab. IV, resp. dále tab. VII a tab. X) je nutno číst pouze řádkově. Pro tabulky korelačních koeficientů nejsou zvýrazněny významnosti rozdílů, neboť vzájemných vazeb bychom mohli testovat velké množství (uvnitř média, mezi médií, mezi skupinami vzorků). Případné pozoruhodné výsledky jsou komentovány v textu.

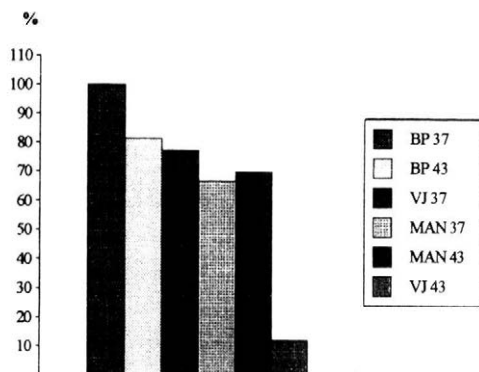
Shrnutí výsledků testování médií s terénními kmeny udává obr. 2 (relativní záchytnost jednotlivých médií) a tab. VI, VII a VIII (hodnocení záchytností, selhání a korelací).

BP/43 °C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
VJ/37 °C	**	**	**	**	**	**	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MAN/37 °C	**	**	**	**	**	**	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MAN/43 °C	**	**	**	**	**	**	—	—	—	—	—	—	—	—	—
VJ/43 °C	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
	zt	wt	pt	zt	wt	pt	zt	wt	pt	zt	wt	pt	zt	wt	pt
	BP/37 °C			BP/43 °C			VJ/37 °C			MAN/37 °C			MAN/43 °C		

zt = znaménkový test – sign test
 wt = Wilcoxonův párový test – Wilcoxon's pair test
 pt = párový *t*-test – pair *t*-test
 * $P = 0.05$; ** $P = 0.01$

BP/37 °C		0	0	0	0	0
BP/43 °C	1		1	1	1	0
VJ/37 °C	0	0		0	0	0
MAN/37 °C	0	0	0		0	0
MAN/43 °C	0	0	0	0		0
VJ/43	** 33	** 31	** 31	** 31	** 31	
	BP/37 °C	BP 43 °C	VJ 37 °C	MAN 37 °C	MAN 43 °C	VJ 43 °C

* $P = 0,05$; ** $P = 0,01$



2. Záchytnost čistých kultur *S. aureus*, izolovaných ze vzorků syrového kravského mléka ve VÚCHS Rapotín, na sledovaných médiích. Na ose y jsou uvedeny záchytnosti médií vzhledem k médiu s nejvyšší záchytností – Recovery of pure cultures of *S. aureus* isolated from samples of cow raw milk in the Research Institute for Cattle Breeding at Rapotín, as observed on the tested media. y-axis shows recoveries of media in relation to medium with highest recovery

jsou shrnuty na obr. 3, statistické vyhodnocení pak uvádí tab. IX. Korelační koeficienty (tab. XI) byly pozorovány nejnižší ze všech sledovaných skupin vzorků.

Sumarizaci výskytu selhání médií uvádí tab. X. Významně vyšší počty selhání jsme pozorovali opět u VJ/43 °C; dále již pouze u VJ/37 °C a MAN/37 °C vůči BP/37 °C.

Subjektivní hodnocení médií

Subjektivní hodnocení médií jako sumarizace předchozích výsledků je uvedeno v tab. XII. Nejvýznamnějšími zástupci doprovodné mikroflóry byly pro BP/37 °C zjištěny *S. xylosus*, *S. chromogenes* a *Enterococcus faecalis*. *E. faecalis* byl také významným kontaminantem pro VJ/37 °C a vzhledem k téměř identickému charakteru kolonií se *S. aureus* a utilizaci manitolu působil značné obtíže při odečtech. Na BP/43 °C byl *Enterococcus faecalis* prakticky jediným významnějším doprovodným mikroorganismem. Naproti tomu u MAN/37 °C a MAN/43 °C působilo největší potíže přerůstání médií ostatními druhy rodu *Staphylococcus*

V. Korelační koeficienty *r* pro jednotlivé páry médií – sbírkové kmeny *S. aureus* z CCM Brno – Correlation coefficients *r* for the particular pairs of media – collection strains of *S. aureus* from CCM Brno

BP/43 °C	0,9379				
VJ/37 °C	0,9382	0,8857			
MAN/37 °C	0,8746	0,8768	0,9271		
MAN/43 °C	0,8867	0,8841	0,9091	0,9477	
VJ/43 °C	0,4543	0,4826	0,4325	0,5106	0,4652
	BP/37 °C	BP/43 °C	VJ/37 °C	MAN/37 °C	MAN/43 °C

VI. Statistické hodnocení rozdílů v záchytnostech sledovaných médií pro terénní izoláty *S. aureus* z VÚCHS Rapotín – Statistical processing of differences in recovery of the tested media for field isolates of *S. aureus* from the Research Institute for Cattle Breeding at Rapotín

BP/43 °C	–	*	*												
VJ/37 °C	**	**	*	–	–	–	–	*	–						
MAN/37 °C	**	**	**	*	**	*	–	*	–	–	–	–	*		
MAN/43 °C	**	**	**	–	*	–	–	–	–	–	–	*			
VJ/43 °C	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
	zt	wt	pt	zt	wt	pt	zt	wt	pt	zt	wt	pt	zt	wt	pt
	BP/37 °C			BP/43 °C			VJ/37 °C			MAN/37 °C			MAN/43 °C		

Legend see Tab. III

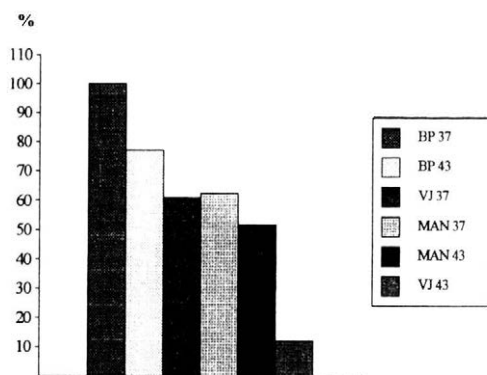
Bazénové vzorky mléka

Výsledky sledování záchytnosti *S. aureus* z bazénových vzorků mléka na testovaných médiích se v zásadě neliší od předchozích modelových skupin. Nejlepší záchytnost jsme opět pozorovali u BP/37 °C, nejhorší výsledky jsme zjistili pro VJ/43 °C. Významně jsou od ostatních médií také odlišeny hodnoty, naměřené pro BP/43 °C. Výsledky ve formě relativních záchytností

a dalšími halotolerantními organismy (rod *Bacillus*, některé plísňe). Podklady subjektivního hodnocení médií jsou komentovány dále v diskusi.

DISKUSE

Současná doba v mikrobiologii je charakterizována masivním nástupem rychlých nekultivačních metod.



3. Záchytnost kmenů *S. aureus* při přímé izolaci ze vzorků syrového kravského mléka na sledovaných médiích. Na ose y jsou uvedeny záchytnosti médií vzhledem k médiu s nejvyšší záchytností – Recovery of *S. aureus* at direct isolation from samples of cow raw milk on the tested media. y-axis shows recoveries of media in relation to medium with highest recovery

Jednou z oblastí, kde však mají doposud kultivační metody pro svou jednoduchost, relativní rychlost a nízkou cenu nezastupitelné místo, zůstává i plošný screening kvality potravin a rutinní poradenská činnost pro zemědělskou prvovýrobu.

V naší laboratoři se věnujeme analýzám *S. aureus* v bazénových vzorcích mléka již delší dobu (Benda a Vyletěllová, 1995). V poslední době, v souvislosti s nezbytnou unifikací vyšetřovacích metod, jsme se rozhodli v rozsáhlejším sledování ověřit vlastnosti námi dosud používaného Mannitol-Salt-Phenol Red média, doporučeného Baird-Parker média a Vogel-Johnson média.

Nejlepší záchytnosti ve všech sledovaných skupinách vzorků byly zjištěny pro BP agar, kultivovaný při teplotě 37 °C. Vysoká záchytnost BP je udávána i dalšími autory (Chopin aj., 1984) a uváděna je dokonce i vyšší recovery BP agaru pro *S. aureus* ve srovnání s neselektivními médii (Van Doorne aj., 1982). Přesto má kultivace vzorků mléka na BP agaru při 37 °C

VII. Výskyt selhání testovaných médií pro terénní izoláty *S. aureus* z VÚCHS Rapotín – The frequency of failures of tested media for field strains of *S. aureus* from the Research Institute for Cattle Breeding at Rapotín

BP/37 °C		0	0	0	0	0
BP/43 °C	** 9		5	5	5	0
VJ/37 °C	* 7	4		5	5	0
MAN/37 °C	** 9	3	3		0	0
MAN/43 °C	** 10	3	3	0		0
VJ/43 °C	** 57	** 54	** 55	** 54	** 54	
	BP 37 °C	BP 43 °C	VJ 37 °C	MAN 37 °C	MAN 43 °C	VJ 43 °C

Note see Tab. IV

VIII. Korelační koeficienty *r* pro jednotlivé páry médií – terénní izoláty *S. aureus* z VÚCHS Rapotín – Correlation coefficients *r* for the particular pairs of media – field isolates of *S. aureus* from the Research Institute for Cattle Breeding at Rapotín

BP/43 °C	0.8302				
VJ/37 °C	0.8294	0.8513			
MAN/37 °C	0.8079	0.7713	0.8681		
MAN/43 °C	0.7833	0.7615	0.8644	0.9874	
VJ/43 °C	0.3235	0.4672	0.4786	0.5109	0.4961
	BP/37 °C	BP/43 °C	VJ/37 °C	MAN/37 °C	MAN/43 °C

IX. Statistické hodnocení rozdílů v záchytnostech sledovaných médií pro *S. aureus* z bazénových vzorků mléka – Statistical processing of differences in recovery of the media for *S. aureus* from bulk milk samples

BP/43 °C	–	*	*												
VJ/37 °C	**	**	**	*	*	*									
MAN/37 °C	**	**	**	**	**	**	–	–	–						
MAN/43 °C	**	**	**	**	**	**	–	–	–	–	–	–			
VJ/43 °C	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
	zt	wt	pt	zt	wt	pt	zt	wt	pt	zt	wt	pt	zt	wt	pt
	BP/37 °C			BP/43 °C			VJ/37 °C			MAN/37 °C			MAN/43 °C		

Legend see Tab. III

některé nevýhody; nižší selektivita je příčinou přerůstání některými jinými stafylokoky (*S. xylosus*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*) a enterokoky. To má za následek jednak vyšší riziko falešně negativních odečtů v důsledku přerůstání, jednak také riziko falešně pozitivních výsledků. Mnohdy je slabě zřetelné také vyjádření diagnostických znaků média.

Podstatně lépe (a z kvalitativního hlediska nejlépe v našem sledování) se jeví kultivace BP při 43 °C. Diagnostické markery (aktivita lecitinázy, lipázy a redukce teluričitany) jsou jasně vyjádřeny, doprovodná mikro-

flóra je redukována na minimum. Jediným závažným nedostatkem je významně nižší záchytnost BP při 43 °C (asi 80 %) a významně vyšší riziko selhání média, pozorované u terénních izolátů *S. aureus*.

Diskutabilní jsou pokusy o modifikace BP média některými autory, např. Lachica (1984) zavádí do média termonukleázový test. Jsou popsány i antibiotické suplementace média či doplnění o test na volnou koagulázu (Beckers aj., 1984; Stadhouders aj., 1976). Žádný ze zaváděných diagnostických markerů se však nevyskytuje v celé populaci *S. aureus* a vždy

X. Výskyt selhání testovaných médií pro izoláty *S. aureus* z bazénových vzorků mléka – The frequency of failures of tested media for isolates of *S. aureus* from bulk milk samples

BP/37 °C		1	* 3	* 2	2	0/26
BP/43 °C	3		1	2	1	0/26
VJ/37 °C	* 24	** 15		11	** 9	0/26
MAN/37 °C	* 10	4	3		1	0/26
MAN/43 °C	3	1	3	0		0/26
VJ/43 °C	** 19/26	** 16/26	** 17/26	** 17/26	** 17/26	
	BP/37 °C	BP/43 °C	VJ/37 °C	MAN/37 °C	MAN/43 °C	VJ/43 °C

Pozn. – Note:

Tabulka je uspořádána v řádcích; např. u VJ/43 °C bylo pozorováno selhání vůči BP/37 °C v 19 případech. Pro VJ/37 °C bylo do pokusu zařazeno pouze 26 vzorků – Table layout is in lines; e.g. in VJ/43 °C failure against BP/37 °C was observed in 19 cases. Only 26 samples were included in the trial for VJ/37 °C

* $P = 0,05$

** $P = 0,01$

XI. Korelační koeficienty r pro jednotlivé páry médií – vzorky mléka – Correlation coefficients r for the particular pairs of media – milk samples

BP/43 °C	0,7476				
VJ/37 °C	0,5467	0,6311			
MAN/37 °C	0,6756	0,7748	0,5701		
MAN/43 °C	0,6069	0,6910	0,5963	0,8218	
VJ/43 °C	0,2736	0,3183 *	0,3298	0,2966 *	0,3207 *
	BP/37 °C	BP/43 °C	VJ/37 °C	MAN/37 °C	MAN/43 °C

XII. Subjektivní posouzení kvality médií – Subjective evaluation of medium quality

	Snadnost odečtu ¹	Selektivita ²	Riziko odečtů primokultur falešně ³	
			pozitivních ⁴	negativních ⁵
BP/37 °C	2–3	2–3	1–2	2–3
BP/43 °C	1	1–2	1	2
MAN/37 °C	2–3	2–3	2–3	2
MAN/43 °C	2	2	2	2
VJ/37 °C	3–4	2–3	3–4	3
VJ/43 °C	2	2	3	3

Legenda – Legend:

1 = velmi dobré – very good

2 = dobré – good

3 = méně vhodné – less appropriate

4 = nevhodné – inappropriate

¹count feasibility, ²selectivity, ³risk of primoculture counts falsely, ⁴positive, ⁵negative

existuje riziko falešně negativních odečtů, ať již je sledovaným znakem lecitináza, nukleáza či koaguláza. Výhrady k efektivitě modifikací BP média uvádějí také Harvey a Gilmour (1985) a Gilmour a Harvey (1990).

Naše výsledky naznačují, že kultivace na VJ agaru nepřináší do problému sledování *S. aureus* v bazénových vzorcích mléka žádný významný přínos. Selektivní agens je stejně jako v případě BP, odečty jsou podstatně obtížnější. Záchytnost je sice prakticky stejná jako u MAN média, v běžném provozu je však vysoké riziko falešně pozitivních odečtů z důvodu výskytu kmenů *Enterococcus faecalis* využívajících manitol, při odečtu snadno zaměnitelných se *S. aureus*. Dále je nepřijatelná i poměrně vysoká frekvence selhání, i když u vzorků mléka je způsobena spíše chybami odečítajícího. Kultivace VJ při teplotě 43 °C pak dává výsledky zcela nepřijatelné.

Mannitol-Salt-Phenol Red agar je jednoduché médium se snadnou přípravou, ale již horšími vlastnostmi. Záchytnost oproti BP/37 °C klesá až na 60 % u vzorků mléka, vysoce významně je zvýšen i počet selhání média, a to i v objektivní skupině terénních izolátů. Diagnostickými znaky jsou většinou špatně detekovatelná užitizace manitolu a dále tvorba žlutého pigmentu. Vzhledem k růstu doprovodných pigmentujících mikroflóry (*S. chromogenes*, *Micrococcus* spp.) je nutná konfirmace každého typu kolonií. Je jasné, že riziko falešně negativních odečtů, zvláště pak u kmenů nepigmentujících, je značně vysoké. Navíc je nutno předpokládat, že vzhledem k dlouholetým zkušenostem našeho pracoviště s tímto médiem jsou výsledky poněkud lepší než ve zcela objektivním sledování.

V naší předchozí práci (Benda a Vyleťalová, 1995) uvádíme vyšší záchytnosti pro MAN agar. Také Galeslot a Stadhouders (1968) se zmiňují o přibližně stejných výsledcích pro tekuté médium s manitolem a solí a pro médium s teluričitanem (Giolioti a Cantoni, 1966), předložená práce však na podstatně širším souboru sledovaného materiálu zpochybňuje uvedené výsledky.

Stanovení na jednotlivých médiích spolu (s výjimkou VJ/43 °C) velmi dobře koreluje. Korelace jsou obecně poněkud vyšší u skupin médií s podobným selektivním účinkem (hlavně uvnitř skupiny MAN/37 °C a MAN/43 °C) a vyšší i pro sbírkové kmeny a izoláty, nižší pak pro vzorky mléka. Část tohoto efektu je však nutno přičíst efektu chyb z malých čísel při odečtu vzorků mléka. Rozdíly mezi korelacemi párů médií však většinou nejsou statisticky významné.

Kompromisním řešením mezi nákladností, jednoduchostí a přesností stanovení *S. aureus* v mléce se tedy v současné době jeví spojení kultivace na BP agaru, následovaná jednoduchou a přesnou konfirmační metodou. Pro materiály silně kontaminované doprovodnou mikroflórou bychom se přiklínili ke kultivaci při teplotě 43 °C, kdy selektivita, snadnost odečtu a minimální riziko chyb (tab. XII) převládá i poněkud sníženou citlivostí; pro běžné vzorky syrového kravského mléka

pak lze doporučit kultivace při teplotě 37 °C. Nedoporučovali bychom konfirmaci izolátů nyní ještě často používaným testem na volnou koagulázu, zvláště je-li použit jako jediný test. Důvodem je jednak poměrně vysoké procento koaguláza negativních kmenů v syrovém mléce (v našich sledováních 4,8 % kmenů z 1 566 izolátů; data nepublikována), jednak výskyt falešně pozitivních kmenů některých stafylokoků. Jako perspektivní metoda konfirmace, použitelná v mlékařské mikrobiologii, by mohla lépe sloužit některá z komerčních latexaglutinačních metod, využívající jako marker jak clumping faktor, tak protein A a lipopolysacharidové pouzdro *Staphylococcus aureus*.

LITERATURA

- BAIRD-PARKER, A. C. (1962): An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. J. Appl. Bact., 25, 12–19.
- BECKERS, H. J. – VAN LEUSDEN, F. M. – BINDSCHEDLER, O. – GUERRAZ, D. (1984): Evaluation of a pour plate system with a rabbit plasma-bovine fibrinogen agar for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in food. Canad. J. Microbiol., 30, 470–474.
- BENDA, P. – VYLEŤALOVÁ, M. (1995): Výskyt *Staphylococcus aureus* v bazénových vzorcích mléka. Veter. Med. – Czech, 40, 221–226.
- CHAPMAN, G. H. (1945): The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. J. Bact., 50, 201–203.
- CHOPIN, A. et al. (1985): ICMSF Methods studies. XV. Comparison of four media and methods for enumerating *Staphylococcus aureus* in powdered milk. J. Food. Protect., 48, 21–34.
- DEVRIESE, L. A. (1981): Baird-Parker medium supplemented with arciflavine, polymyxins and sulphonamide for the selective isolation of *Staphylococcus aureus* from heavily contaminated materials. J. Appl. Bacteriol., 50, 351–357.
- GALESLOT, T. – STADHOUDERS, J. (1968): The microbiology of spray-dried milk products with special reference to *Staphylococcus aureus* and salmonellae. Netherl. Milk and Dairy J., 22, 158–172.
- GILMOUR, A. – HARVEY, J. (1990): Staphylococci in milk and milk products. Symposium supplement. J. Appl. Bact., 147S–166S.
- GIOLIOTI, G. – CANTONI, C. (1966): A medium for the isolation of staphylococci from foodstuffs. J. Appl. Bact., 29, 395–398.
- HARVEY, J. – GILMOUR, A. (1985): Application of current methods for isolation of staphylococci in raw bovine milk. J. Appl. Bact., 59, 207–221.
- LACHICA, R. V. (1984): Egg-yolk free Baird-Parker medium for the accelerated enumeration of foodborne *Staphylococcus aureus*. Appl. Environ. Microbiol., 48, 870–871.
- PÁČOVÁ, Z. (1991): CCM Catalogue of cultures, bacteria. 5th ed. Brno.
- SKALKA, B. – SMOLA, J. – PILICH, J. (1979): Diagnostic utilization of hemolytically active exo-substances of certain Gram-positive bacteria. I. Detection of staphylococcal hemo-

lysins with prepurified preparations of staphylococcal beta-toxin and CAMP-factor. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol., 23, 407–416.

STADHOUDERS, J. – HASSING, F. – VAN ALST-VAN MAREN, N. O. (1976): A pour-plate method for the detection and enumeration of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* in the Baird-Parker medium without egg-yolk. Netherl. Milk and Dairy J., 30, 222–229.

VAN DOORNE, H. – PAUWELS, H. P. – MOSSEL, D. A. (1982): Selective isolation and enumeration of low numbers of *Staphylococcus aureus* by a procedure that relies on ele-

vated-temperature culturing. Appl. Environ. Microbiol., 44, 1459–1462.

VOGEL, R. A. – JOHNSON, M. (1960): A modification of the tellurite-glycine medium for the use in the identification of *Staphylococcus aureus*. Publ. Hlth. Lab., 18, 131–133.

ČSN 56 0089 (1994): Potravinářské výrobky. Stanovení počtu *Staphylococcus aureus*. ÚNM Praha.

IDF Standard: Milk and milk products. Revision of the IDF Standard 60 – A: 1978; Doc 382 – E, 1992.

Received 96–03–19

Accepted for publication 96–06–26

Kontaktní adresa:

RNDr. Pavel B e n d a, Výzkumný ústav pro chov skotu, 788 13 Rapotín, Česká republika
Tel. 0649/21 41 01, fax 0649/21 57 12, e-mail: benda_pavel@pvtnet.cz

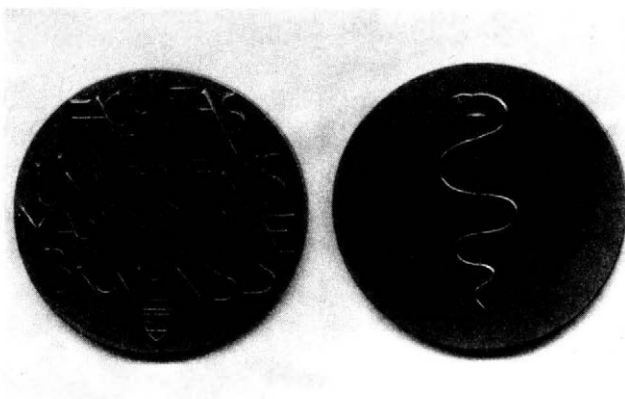
**The Medal of the Faculty of Medicine at Masaryk University at Brno
has been Awarded to Prof. MVDr. Z. Věžník, DrSc.**

Medaile Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně udělena
Prof. MVDr. Z. Věžníkovi, DrSc.

Předseda odboru veterinárního lékařství České akademie zemědělských věd a člen redakční rady časopisu Veterinární medicína Prof. MVDr. Zdeněk Věžník, DrSc., zahájil svoji vědeckou dráhu na porodnické klinice Prof. MUDr. Františka Horálka. Spolupráci s lékaři se věnuje jako vedoucí oddělení reprodukce hospodářských zvířat. Mnoho let vede laboratoř pro spermatologii, která je využívána několika jihomoravskými klinikami, zabývajícími se poradenstvím pro neplodné manželské páry. V posledních letech se ve spolupráci s Prof. MUDr. MVDr. h.c. Leopoldem Pospíšilem, DrSc., zabývá stále aktuálním podílem chlamydií na onemocněních zvířat a lidí. Svoji andrologickou laboratoř rozvíjel Prof. Věžník v neformálním kontaktu s významným představitelem české sexuologie a andrologie Prof. MUDr. Josefem Hyniem. Zkušenosti Prof. Věžníka jsou využívány i při rozvoji asistované reprodukce, která patří mezi významné úspěchy brněnské gynekologické školy. Prof. Věžník převzal pamětní medaili Lékařské fakulty Masarykovy univerzity z rukou děkana Prof. Josefa Bindera 9. října 1996 jako první veterinární lékař v historii fakulty.

Karel Hruška

Nová pamětní medaile Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně je dílem Jana Rajlichy st.



SELECTION CRITERIA OF LACTOBACILLI FOR PROBIOTIC USE

KRITÉRIÁ VÝBERU LAKTOBACILOV PRE PROBIOTICKÉ ÚČELY

R. Nemcová

Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: The present knowledge of research makes it possible to use a whole range of stabilized micro-organisms and their metabolites for the production of preparations known as probiotics. The mechanism of the effect of probiotics, although it is not fully elucidated, is closely connected with the properties of the production strains. When selecting them, it is necessary to respect the origin of the strain used, its ability to adhere to the epithelial cells of the gut and to produce the inhibitory substances, the ability to survive and grow in the respective ecological units. The strain should be genetically stable, it should have good growth properties *in vitro* and *in vivo*, to maintain its high viability at processing, lyophilization and storage. Lactobacilli belong to the micro-organisms most frequently used to prepare the probiotics. The statement that lactobacilli inhibit the colonization of pathogenic bacteria upon the intestinal epithelium has been confirmed by many experiments on experimental germ-free and/or gnotobiotic animals. This inhibitory process known as „competitive exclusion“ can be explained by the competition for the adherence sites on the intestinal mucosa between pathogens and lactobacilli and by the production of inhibitory substances. The host specificity as well as different degree of the expression of adherent phenotype, which is conditioned, in addition to the effect of the external environment also by the presence of plasmids of adherence, present the important property of the adherence of lactobacilli. The host specificity of the lactobacilli is closely connected with the presence of the specific molecules of receptors on the host cells which can be distinguished by means of specific molecules of the bacterial cells. The competition for the nutrients to be found on the intestinal epithelium, which present the growth substrates for both the probiotic strains and the pathogens, may present an important factor influencing the colonization of lactobacilli. The inhibitory components of the lactobacilli comprise the production of bacteriocins, toxic metabolites of the oxygen and organic acids. The inhibitory spectrum of the bacteriocins is different; the overwhelming majority of them inhibits G^+ bacteria within the genus or taxonomically close to the genus of *Lactobacillus*, others such as bulgaricin, acidolin, laktocidin, acidophilin and non-protein substance reuterin are active against a wide spectrum of G^+ , G^- bacteria, yeasts and fungi. Of toxic oxygen metabolites, the production of hydrogen peroxide is of importance. The hydrogen peroxide along with lactoperoxidase-thiocyanate milk system exerts bacteriocidal effects on most pathogens. The production of organic acids (lactic, acetic) by lactobacilli is considered to be the primary regulator of the gut microbial activity in animals. The lactic acid as a product of the intestinal fermentation is further metabolized by lactate utilizing bacteria to VFA, thus the environment of the digestive tract is acidified and the acid-sensitive pathogens cannot exert their effect. When pH of the environment falls, the concentration of molecular (non-dissociated) form of weak organic acids (acetic acid, VFA) elevates. The above acids diffuse through the cell membrane into a cell, thereby exhibiting higher inhibitory capacity. In case the mechanism of the effect of probiotics is fully elucidated, the criteria of the selection could be more precisely defined and thereby also the efficiency of probiotics would be improved.

lactobacilli; adherence; antibacterial substances; gastrointestinal tract; probiotics

ABSTRAKT: Laktobacily patria medzi najčastejšie používané produkčné mikroorganizmy pre prípravu preparátov známych ako probiotiká. V článku boli sumarizované literárne údaje o vlastnostiach laktobacilov (adherencia, kompetícia o živiny, produkcia inhibičných látok), ktoré úzko súvisia s doteraz popísaným mechanizmom účinku probiotík. Uvedené vlastnosti sú súčasťou všeobecných kritérií výberu baktérií pre probiotické účely.

laktobacily; adherencia; antibakteriálne substancie; gastrointestinálny trakt; probiotiká

V súčasnej dobe sú vo vyspelých krajinách pri produkcii hygienicky nezávadných a biologicky plnohodnotných potravín živočíšneho pôvodu preferované biotechnologické programy využívajúce rôzne druhy probiotík. Tieto mikrobiálne inokulanty našli široké uplatnenie ako aditíva v krmných zmesiach, kde nahrádzajú antibiotiká, chemoterapeutiká a rastové stimulanty.

Probiotiká sú definované ako biopreparáty obsahujúce živé bunky alebo metabolity stabilizovaných autochtónnych mikroorganizmov, ktoré ovplyvňujú optimálne osídlenie a zloženie črevnej mikroflóry zvierat a ľudí s účinkom stimulácie tráviacich procesov a obranyschopnosti makroorganizmu. Tieto užitočné mikroorganizmy produkujú rad biologicky aktívnych látok, ktoré ovplyvňujú životne dôležité funkcie hostiteľov, ako sú ochranná bariéra slizníc črevného traktu, morfogénna jeho epitelu a resorpcia živín, fyziológia trávenia a metabolizmus, ontogénna imunity a pod. (Fuller, 1992).

Laktobacily sú najčastejšie používanými produkčnými mikroorganizmami pre prípravu probiotík. Tvoria početnú typickú súčasť mikroflóry črevného traktu cicavcov a vtákov, kde plnia významnú úlohu pri zaisťovaní prirodzeného obranného systému a pozitívne ovplyvňujú proces celkového metabolizmu (Gilliland, 1990).

Mechanizmus účinku probiotík, aj keď nie je plne objasnený, predovšetkým úzko súvisí s vlastnosťami produkčných kmeňov. Chesson (1993) udáva, že produkčný kmeň by mal pochádzať z črevného traktu (alebo tolerovať podmienky tráviaceho traktu), mal by adherovať vo vysokých počtoch, zachovávať si vysokú životnosť pri spracovaní, lyofilizácii a skladovaní a byť schopný rýchlejšie revitalizácie v čreve po lyofilizácii, produkovať inhibičné látky voči patogénom a stimulovať imunitnú odpoveď. Len niektoré z týchto vlastností (rezistencia na nízke pH, zľč, antibiotiká, črevné sekréty, životnosť pri výrobe a skladovaní) je možné stanoviť v *in vitro* podmienkach (Alm a i., 1989; Rada a i., 1993). Väčšinu je nutné overovať v *in vivo* experimentoch. Podľa Chateau a i. (1993) antimikrobiálna aktivita laktobacilov meraná *in vitro* (napr. produkcia bakteriocínov) nezodpovedá ich aktivite *in vivo*. Podobne Pedersen a Tannock (1989) zistili, že adherencia laktobacilov *in vitro* na črevné bunky prasiat nekorelovala s ich schopnosťou kolonizovať črevný trakt *in vivo*.

Dôležitou vlastnosťou produkčného kmeňa je aj jeho genetická stabilita. Niektoré vlastnosti laktobacilov (adherencia, produkcia bakteriocínov) sa môžu spájať s plazmidovou determináciou a pri selektívnom procese môže dôjsť k ich eliminácii (Lin a Savage, 1985; Conway, 1989).

Adherencia *E. coli* na epiteliálne bunky a väzba toxínov na receptory sú kľúčom k procesu patogenézy. Je dokázané, že jednou z významných vlastností probiotík je inhibícia kolonizácie patogénnych baktérií na črevný epitel. Tento inhibičný proces je známy ako „kompetitívna exklúzia“ (Pivnick a Nurmi, 1982). Najčastejšie citovaným mechanizmom kompetitívnej exklúzie je súťaž medzi patogénnou a indigénnou flórou o adherenčné miesta na črevnej mukóze a produkcia inhibičných látok. Nepriamymi dôkazmi toho sú pokusy, kde vzorky čeka pokusných kurčiat, ktorým bola aplikovaná cekálna flóra dospelej zdravej hydiny, mali významne nižšie počty *Salmonella* sp. a *E. coli* ako kontrolné kurčatá a protektívna flóra bola asociovaná na cekálnu stenu (Stavric a i., 1987). Podobne homogenáty črevného tkaniva získané od prasiat krmných *Lc. lactis* obsahovali vyššie počty laktobacilov a nízke počty *E. coli* v porovnaní s kontrolou (Murahara a i., 1977). V literatúre sa často stretávame s kompetitívnou exklúziou patogénov z uropiteálnych buniek (Chan a i., 1985).

Významnou vlastnosťou adherencie laktobacilov na epiteliálne bunky je jej hostiteľská špecifita a rôzny stupeň expresie aderenčného fenotypu podmienený okrem už spomínanej prítomnosti plazmidov adherencie aj vplyvom vonkajšieho prostredia. Podľa Brilisa a i. (1985) laktobacily vykazovali vyššiu adherenciu v kyslom prostredí. Efekt antibiotík na adherenciu závisel na aktivite mechanizmu antibiotík a na aderenčnom stupni kmeňa. Laktoglobulín blokoval tvorbu stabilnej asociácie baktérií s bunkami makroorganizmu. Brockett a Tannock (1981) zistili významný efekt masných kyselín v diéte na počty laktobacilov adherovaných na epitel žalúdka myši. Na vplyv diéty na adherenciu laktobacilov gastrointestinálneho traktu prasiat poukazujú aj Krause a i. (1995). U prasiat, ktoré prijímali materské mlieko boli počty adherentných laktobacilov významne nižšie ako u prasiat krmných suchým krmivom.

Hostiteľská špecifita a mechanizmus adherencie u laktobacilov

Schopnosť adherencie a prežívania bakteriálneho kmeňa v danej ekologickej jednotke úzko súvisí s jeho pôvodom. Autochtónne (hostiteľovi vlastné) kultúry lepšie kolonizujú epitel, zatiaľ čo kmene allochtónnych (hostiteľovi nevlastných) mikroorganizmov sú za bežných podmienok z ekosystému ľahko vyplavované, nie sú do danej ekologickej jednotky začlenené, sú potláčané interakciami mikrobiálneho spoločenstva alebo sú eliminované imunitnými obrannými mechanizmami hostiteľského organizmu. Táto hostiteľská špecifita bola dokázaná v prácach viacerých autorov na gnotobiotických zvieratách (tab. I) a ako sa zistilo v ďalších pokusoch úzko súvisí s prítomnosťou špecifických mo-

Lactobacillus č. kmeňa ¹	Pôvod kmeňa ²	Referencia ³	Prítomnosť baktérií na skvamóznom epitelí ⁴			
			myš (žalúdok) ⁵	potkan (žalúdok) ⁶	kurča (hrvof) ⁷	ošípaná (pažerák) ⁸
100–5	myš (žalúdok) ⁵	Roach a i., 1977	+(9)	+(1)	–(5)	ND
100–23	potkan (žalúdok) ⁶	Wesney a i., 1979	+(4)	+(2)	–(5)	–(1)
100–33	potkan (žalúdok) ⁶	Wesney a i., 1979	–(4)	–(1)	ND	ND
313	potkan (črevo) ⁷	Hemme a i., 1980	–(4)	–(2)	ND	ND
207	hydina (hrvof) ⁸	Champ a i., 1981	–(8)	–(4)	+(7)	–(1)
220	hydina (hrvof) ⁸	Champ a i., 1981	–(5)	–(1)	–(7)	ND
100–63	hydina (hrvof) ⁸	Wesney a i., 1979	–(4)	–(1)	–(5)	ND
100–47	ošípaná (žalúdok) ⁹	Wesney a i., 1979	–(5)	–(1)	–(5)	–(1)

Legenda – Legend:

+ = prítomné – yes

– = neprítomné – no

ND = nestanovené – not determined

Počty zvierat sú uvedené v zátvorkách – Animal number is shown in brackets

¹ strain no., ² strain origin, ³ reference, ⁴ presence of bacteria on squamous epithelium, ⁵ mouse (stomach), ⁶ sewer-rat (stomach), ⁷ sewer rat (intestine), ⁸ poultry (crop), ⁹ pig (stomach), ¹⁰ pig (mouth)

lekúľ receptorov na hostiteľských bunkách, ktoré sú rozoznávané pomocou špecifických molekúl bakteriálnych buniek. Tak boli identifikované nasledovné komponenty bunkovej steny laktobacilov: kyslé mukopolysacharidy pre adhérenciu na epitel hrvoľa kurčiat (Fuller, 1975), zmiešané makromolekulárne komplexy proteínov a kyseliny teichoikovej u *Lb. fermentum* RI (Sherman a Savage, 1986) a sekrečný proteín u *Lb. fermentum* 737 (Conway a Kjelleberg, 1989), ktoré kolonizujú epitel žalúdka myši, povrchový proteín u *Lb. fermentum* 104-S nesúci adhérenciu na skvamózný epitel žalúdka ošípaných (Henriksson a i., 1991). Sekrečný proteínový komponent, ktorý redukoval, resp. zabráňoval adhérencii *E. coli* K 88 na mukózu ilea prasiat bol popísaný u *Lb. fermentum* 104-R (Blomberg a i., 1993). Predpokladá sa, že tento aktívny komponent buď mení K 88 receptory mukózy chemicky, takže nie sú rozoznávané K 88 fimbriami, alebo sa naviaže na K 88 receptory a priestorovo bráni naviazaniu sa K 88 fimbrií. U humánných laktobacilov (Coconnier a i., 1992) bola zistená prítomnosť dvoch komponentov zodpovedných za adhérenciu na enterocyty. Prvý faktor bol určený bunkovou stenou (polysacharid) a druhý – extracelulárny faktor proteínovej povahy (adherence promoting factor). Tento sekrečný faktor tvoril most medzi baktériou a eukaryotickými bunkovými receptormi a bol zodpovedný až za 90% adhérenčnú schopnosť *Lb. acidophilus* BG2 FO4. Vyznačoval sa silnou špecifitou – zvyšoval adhérenciu iného humánneho kmeňa, ale neovplyvňoval adhérenciu potravinárskych kmeňov. Mukai a i. (1992) a Mukai a Arihara (1994) sledovali úlohu lektínov v mechanizme adhérencie laktobacilov na enterocyty hydiny. Na základe výsledkov pokusov predpokladajú, že adhéncia laktobacilov môže byť sprostredkovaná lektínmi, ktoré syntetizujú

buď laktobacily alebo črevný epitel. Lektíny môžu byť viazané na špecifické karbohydráty na povrchu epitelu alebo bakteriálnej bunky. Iné práce identifikovali prítomnosť S-vrstvy (povrchové proteíny), (Schneitz a i., 1993; Vidgren a i., 1992) zodpovednej za adhérenciu *Lb. acidophilus* na črevný epitel hydiny.

V pokusoch *in vivo* bolo zistené, že laktobacily vytvárajú s G[–] baktériami koagregáty na povrchu neinfikovaného vaginálneho epitelu (Reid, 1988), pričom tento fenomén zabraňuje vzniku infekčných ochorení urogenitálneho traktu. Podobný protektívny mechanizmus medzi laktobacilmi a ETEC môže fungovať aj v gastrointestinálnom trakte. Spencer a Chesson (1994) zistili, že prítomnosť K 88 antigénu je aktívnym faktorom v koagregácii medzi *E. coli* a laktobacilmi.

KOMPETÍCIA O ŽIVINY

Je všeobecne známe, že rôzne bakteriálne druhy v gastrointestinálnom trakte zvierat súťažajú o živiny (Freter a i., 1983). V hornej časti tenkého čreva sú rozpustné cukry pravdepodobne prístupné pre mikrobiálny rast, kým v hrubom čreve sú to len polyméry rezistentné voči tráveniu hostiteľom spolu s endogénnymi polymermi v mucíne, napr. rod *Bacteroides* využíva mukopolysacharidy v hrubom čreve (Salysers, 1984).

Podľa Jonssona a Conwaya (1992) na *in vivo* kolonizáciu baktérií na epitel čreva vplyva viacero faktorov než len samotná ich adhérenčná schopnosť. Jedným z nich môže byť aj súťaženie o živiny na epitely čreva, ktoré môžu byť rastovými substrátmi tak pre probiotické kmene ako aj pre patogény. Pri tejto súťaži je možné ich podporiť rôznymi rastovými substrátmi,

ako laktóza (Pollman a i., 1980), inuloooligosacharidy (Hidaka a i., 1986), fruktózo-oligosacharidy (Rowland, 1992), xylooligosacharidy (Suwa a i., 1987), železo (Bezkorovainy, 1989) a horčík (Vandevoorde a i., 1992).

PRODUKCIA INHIBIČNÝCH LÁTKO

Inhibičné komponenty produkované laktobacilmi zahŕňujú toxické metabolity kyselika, laktoperoxidázo-tiokyanátový systém, organické kyseliny, efekt pH a bakteriocíny.

Metabolity kyselika

Aeróbný rast laktobacilov vedie k tvorbe troch derivátov kyselika: peroxidu vodíka, aktívnych molekúl O_2^- a voľných radikálov – OH, ktoré sú nositeľmi tzv. toxicity kyselika. Tieto metabolity vedú k bakteriostatickému alebo bakteriocídne účinku poškodzujú jadro baktérií čo vedie k reverzibilným alebo ireverzibilným zmenám. Kyslík a jeho metabolity majú za následok aj oxidáciu sulfhydroxylových skupín metabolických enzýmov (G 3P dehydrogenázy, LDH, alkoholdehydrogenázy) a ich denaturáciu.

G^- baktérie sú prostredníctvom vonkajšej lipopolysacharidovej vrstvy čiastočne chránené od toxického účinku metabolitov kyselika. Táto vrstva zachytáva aktívny molekulárny kyslík. Naproti tomu u G^+ baktérií difunduje molekulárny kyslík cez peptidoglykan rýchlejšie a reaguje so senzitivnými miestami na membráne (Dahl a i., 1989).

Bolo zistené, že peroxidáciou lipidovej membrány G^- baktérií sa zvýšila jej permeabilita. Dôkazom toho bol fakt, že stupeň peroxidácie súvisel so stratou životaschopnosti *E. coli* (Kong a Davison, 1980; Harley a i., 1978). Je zaujímavý údaj, že katalázopozitívny charakter *E. coli* a *Pseudomonas* sp. prítomných v mlieku neposkytol týmto baktériám ochranu voči metabolitom kyselika. Price a Lee (1970) udávajú, že H_2O_2 produkovaný *Lb. plantarum* inhiboval rast nežiadúcej mikroflóry.

Laktoperoxidázo-tiokyanátový systém (LPS) mlieka

Inhibičná aktivita tohto systému je založená na interakcii medzi jeho tromi komponentmi: laktoperoxidázou, tiokyanátom a peroxidom vodíka.

Kravsé mlieko obsahuje 10–30 $\mu\text{g/ml}$ laktoperoxidázy (Reiter, 1985). Podľa Pruitt a Reitera (1985) LPS môže byť katalyzovaný pri koncentrácii laktoperoxidázy tak nízkej ako 0,5 ng/ml. Laktoperoxidáza je odolná voči pH 3 *in vitro*, rezistentná na žiadučné šťavy a pomerne stabilná na vysoké teploty.

Tiokyanát (SCN^-) sa bežne vyskytuje v sekrétoch a tkanivách zvierat. Jeho koncentrácia v mlieku sa pohybuje od 1 do 10 ppm. SCN^- je priamo zahrnutý v mechanizme inhibície LPS a tiež stabilizuje laktoperoxi-

dázu pri vysokých riedeniach (Steele a Morrison, 1969).

Podľa Thomasa (1985) H_2O_2 prítomný v koncentrácii 10 nmol/l je dostačujúci na aktiváciu LPS. V prítomnosti H_2O_2 (produkovaného laktobacilmi) laktoperoxidáza katalyzuje oxidáciu tiokyanátu na neinhibičné konečné produkty (SO_4^{2-} , CO_2 a NH_3). V priebehu oxidácie vznikajú inhibičné medziprodukty – hypotiokyanát a vyššie oxykyseliny (Pruitt a i., 1982). Efekt týchto medziproduktov sa prejavuje pri oxidácii SH skupín metabolických enzýmov. Dochádza k inhibícii hexokináz, aldoláz, LDH, fosfoglukonát dehydrogenáz (Law a John, 1981).

LPS zapríčiňuje lézie v cytoplazmatickej membráne, únik K^+ iónov, AMK a polypeptidov. Inhibovaný je transportný systém cukrov, AMK, syntéza RNA, DNA a proteínov (Reiter a Härnqvist, 1984). Marshall a Reiter (1980) udávajú, že LPS je bakteriostatický pre *L. lactis* a bakteriocídny pre *E. coli*, čo súvisí s rozdielnou štruktúrou bunkovej steny. LPS rezistentné kmene mliečnych baktérií obsahujú enzýmy, ktoré katalyzujú oxidáciu $NADH_2$ v prítomnosti medziproduktov, ktoré vznikajú pri oxidácii tiokyanátu. Je možné, že mliečne baktérie môžu neutralizovať oxidačné produkty tiokyanátu alebo iným spôsobom reparujú poškodené miesta.

LPS má široké spektrum aktivít voči patogénnym G^- a G^+ baktériám (Purdy a i., 1983; Siragusa a Johnson, 1989). H_2O_2 produkovaný laktobacilmi v abomase teliat aktivoval prirodzený LPS prítomný v mlieku. Keď abomasálna tekutina mliekom kŕmených teliat bola inkubovaná *in vitro* s *E. coli*, laktobacily v tekutine produkovali H_2O_2 čo viedlo k 1 000-násobnej redukcii počtu živých *E. coli* počas šesťhodinovej inkubácie (Reiter a i., 1980). Existujú údaje, že LPS môže inhibovať motilitu a adhérenciu $K 88^+$ *E. coli*. Aktivácia LPS súvisí s prítomnosťou kyselika. Keďže v črevnom trakte prasiat bola zistená prítomnosť kyselika (Hillman a i., 1993), LPS môže byť účinný voči črevnej infekcii prasiat kŕmených mliekom.

Organické kyseliny, efekt pH

Produkcia organických kyselín je považovaná za primárny regulátor mikrobiálnej aktivity čreva zvierat. Homofermentatívne laktobacily produkujú kyselinu mliečnu z glukózy v skoro vyrovnaných množstvách, heterofermentatívne laktobacily degradujú glukózu na kyselinu mliečnu, octovú, etanol a CO_2 .

Kyselina mliečna, charakteristický fermentačný produkt laktobacilov, môže redukovať pH na hladinu, pri ktorej sa inhibuje alebo ničí rast nežiadúcej (patogénnej) mikroflóry. Nízke pH (pH média, intracelulárne pH) vedie k zníženiu aktivity metabolických enzýmov a k ich denaturácii. Je málo baktérií, ktoré sú schopné rásť pri pH nižšom ako je prahová hodnota pH pre laktobacily (tab. II). Meranie pH prostredia však nie je spoľahlivým indikátorom rastu či inhibície rastu baktérií, pH je len čiastočná ilustrácia koncentrácie slabých

II. Hranica pH umožňujúca začiatok rastu baktérii (Asperger, 1986) – Limit pH value for the beginning of bacteria growth (Asperger, 1986)

Gram negatívne baktérie ¹	Hranica pH ³
<i>Escherichia coli</i>	4,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4,4
<i>Proteus vulgaris</i>	4,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,6
<i>Salmonella paratyphi</i>	4,5
<i>Salmonella typhi</i>	4,0–4,5
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4,8
Gram pozitívne baktérie ²	Hranica pH ³
<i>Bacillus cereus</i>	4,9
<i>Clostridium botulinum</i>	4,7
<i>Enterococcus</i> sp.	4,8
<i>Lactobacillus</i> sp.	3,8–4,4
<i>Micrococcus</i> sp.	5,6
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,0
<i>Lactococcus lactis</i>	4,3–4,8
<i>Brevibacterium lineus</i>	5,6
<i>Listeria monocytogenes</i>	5,5

¹Gram-negative bacteria, ²Gram-positive bacteria, ³pH limit value

kyselín v médiu, pretože veľká časť týchto kyselín sa vyskytuje ako nedisociovaná. Bunečná membrána baktérii je nepermeabilná pre disociované frakcie kyseliny, zatiaľčo nedisociované frakcie difundujú pasívne cez membránu a tu sa ionizujú v závislosti na intracelulárnom pH. Toto zapríčiňuje okysľovanie cytoplazmy a tiež tvorbu inhibítorov.

Bola pozorovaná inhibícia *Salmonella* sp. pri pH 4,4 pre kyselinu mliečnu a pri pH 5,4 pre kyselinu octovú. Vo vzťahu k jednotlivým hodnotám pKa 3,86 a 4,75 pre uvedené kyseliny a ich disociačné konštanty inhibícia sa vyskytovala, keď nedisociovaná frakcia dosiahla 20 % (Chung a Goepfert, 1970). Adams a Hall (1988) popisujú synergický efekt kyseliny mliečnej a octovej voči *E. coli* a *S. enteritis*. Kyselina mliečna znižovala pH média a tým sa zvyšovala toxicita kyseliny octovej (nedisociovaná forma). Podobný kumulatívny efekt bol zistený medzi laktátom, sukcinátom a UMK (Hinton a Hume, 1995a, b). Laktát a sukcinát produkovaný črevnými baktériami inhiboval rast patogénov jednak tým, že obe kyseliny slúžili ako substrát pre baktérie produkujúce UMK a zároveň znížením pH zvyšovali koncentráciu ich nedisociovaných foriem.

Positívna úloha nedisociovaných foriem UMK v redukcii patogénov vyplýva aj z pokusov, kde laktobacily podávané kurčatám znižovali pH čreva a zabráňovali kolonizácii *E. coli* (Fuller, 1977). Podobný efekt bol zaznamenaný pri obohatení diéty kurčiat laktózou. Zníženie počtu *Salmonella* sp. bolo zapríčinené zvýšením produkcie UMK a znížením pH čeka (Morishita a i., 1982; Carrier a i., 1990, 1993).

Senzitivita baktérii na kyseliny závisí aj od iných faktorov, ako sú: hladina solí, redox potenciál, aktivita vody, teplota atď. Kleter a i. (1984) zistili synergizmus medzi aciditou a koncentráciou NaCl pri inhibícii *C. tyrobutyricum*.

Bakteriocíny a iné antibakteriálne substancie

Bakteriocíny sú definované ako bielkovinové substancie s bakteriocídnym alebo bakteriostatickým účinkom voči širokému spektru baktérii. Klaenhammer (1988) definoval dve triedy bakteriocínov s ohľadom na ich spektrum aktivity. Jedna trieda zahŕňa bakteriocíny aktívne voči baktériám taxonomicky blízky producentom a druhá trieda bakteriocínov aktívne voči patogénnej flóre.

Väčšina bakteriocínov produkovaných laktobacilmi má obmedzené spektrum inhibície len v rámci rodu alebo na taxonomicky blízke rody (tab. III). Pôvod laktobacilov produkujúcich tieto antibakteriálne látky je prevažne z potravín (mäso, mliečne výrobky, zelenina). Sú však aj údaje o produkcii širokospektrálnych antibiotických látok s rozšíreným spektrom na G⁺ patogénne baktérie. Reddy a i. (1984) popisuje produkciu bakteriocínu bulgarican (*Lb. bulgaricus*) aktívneho voči rodom *Bacillus*, *Proteus*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Sarcina*, *Serratia*, *Lactobacillus* a *E. coli*. Podobné antibakteriálne spektrum bolo zistené u acidophilinu (Shahani a i., 1976), acidolinu (Hamdan a Mikolajcik, 1974) a lactocidinu (Vincent a i., 1959) produkovaných kmeňmi *Lb. acidophilus* izolovaných z fekálií ľudí a hlodavcov. Z dentálnych plakov ľudí bol izolovaný *Lb. salivarius* produkujúci salivarin B, ktorý inhiboval rast *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Enterococcus faecalis* a laktobacilov a *Lb. acidophilus* produkujúci atypický bakteriocín acidocin B s inhibičným účinkom voči *Clostridium sporogenes* a *Lactobacillus* sp. (Ten Brink a i., 1994). Kmeť a i. (1986) referuje o produkcii bakteriocínov voči indikátorovému kmeňu *Lb. acidophilus* u 2 % bacherových laktobacilov.

Okrem bakteriocínov laktobacily produkujú aj iné antibakteriálne substancie neproteínové s malou molekulovou hmotnosťou. Abdel-Bar a Harris (1984) zistili produkciu inhibičného faktora u *Lb. bulgaricus* voči *S. aureus* a *Pseudomonas* sp. Táto substancia obsahovala aromatický podiel a jej molekulová hmotnosť bola okolo 700 daltonov. Podobne Daeschel (1989) pozoroval pri anaeróbnom raste *Lb. reuteri* v prítomnosti glycerolu produkciu širokospektrálnej inhibičnej látky (reuterin) aktívnej voči G⁺, G⁻ baktériám, kvasinkám, plesniam a protozómam. Chemickou analýzou reuterinu bolo zistené, že sa jedná o dehydratovaný derivát glycerolu – hydroxypropionaldehyd, ktorý inhibuje aktivitu ribonukleotidreduktázy.

Okrem uvedených inhibičných vlastností bola u laktobacilov popísaná antienterotoxická aktivita (Mitchell a Kenworthy, 1976), dekonjugácia žlčo-

Bakteriocín ¹	Produkčný kmeň ²	Spektrum aktivity ³	Referencie ⁴
Lactocin 27	<i>Lb. helveticum</i>	<i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. acidophilus</i>	Upreti a Hinsdill (1973)
Helveticin J	<i>Lb. helveticum</i>	<i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. bulgaricus</i> <i>Lb. casei</i>	Joerger a Klaenhammer (1986)
Bac	<i>Lb. fermentii</i>	<i>Lactobacillus</i> sp.	De Klerk a Smit (1967)
Lactacin B	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. leichmanii</i> <i>Lb. bulgaricus</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. casei</i>	Barefoot a Klaenhammer (1983)
Lactacin F	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. fermentum</i> <i>E. faecalis</i>	Muriana (1987)
Plantaricin A	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lactobacillus</i> sp. <i>Pediococcus</i> sp. <i>Leuconostoc</i> sp. <i>E. faecalis</i>	Daeschel ai. (1990)
Plantaricin B	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lc. mesenteroides</i> <i>P. damnosus</i>	West a Warner (1988)
Plantaricin S	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lactobacillus</i> sp. <i>Leuconostoc</i> sp. <i>Lactococcus</i> sp. <i>Pediococcus</i> sp.	Jimenez-Diaz ai. (1990)
Sakacin A	<i>Lb. sake</i>	<i>Lactobacillus</i> sp. <i>L. monocytogenes</i>	Schillinger a Lucke (1989)
Lactocin S	<i>Lb. sake</i>	<i>Lactobacillus</i> sp. <i>Lc. mesenteroides</i> <i>P. acidilactici</i> <i>P. pentosaceus</i>	Mortvedt a Nes (1990)
Caseicin 80	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. casei</i>	Rammelsberg ai. (1990)
Brevicin 37	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lactobacillus</i> sp. <i>Leuconostoc</i> sp. <i>Pediococcus</i> sp.	Rammelsberg a Radler (1990)

¹bakteriocín, ²productive strain, ³activity spectrum, ⁴reference

vých kyselín (Klaver a van der Meer, 1993) aktivácia makrofágov (Tomioaka a Saito, 1992) a antitumorová aktivita (Adachi, 1992).

ZÁVER

Empirické použitie širokého spektra prevažne zbierkových a terénnych kmeňov pre výrobu probiotík bez cielenej laboratórnej diagnostiky je málo efektívne a neprináša očakávané výsledky. Zohľadnenie kritérií výberu produkčných kmeňov hlavne ako sú druhová špecifita, adherencia, inhibičný efekt a dobrá rastová schopnosť v čreve umožňuje vývoj účinných probiotík. Keďže mechanizmus účinku probiotík úzko súvisí s vlastnosťami bakteriálnych kmeňov zintenzívnenie jeho štúdia by viedlo k definovaniu ďalších nových kritérií výberu a tým k zvýšeniu probiotického efektu. Možnosť zvyšovania probiotického účinku kmeňov poskytujú aj ich kombinácia s aditívami (oligosacharidy, fytoaditíva, rastové faktory, salicyláty, antibiotiká) za účelom potencovania ich inhibičného, resp. antien-

terotoxického účinku (Pollmann ai., 1980; Bailey ai., 1991; Yadava ai., 1995). Značné možnosti pri zvyšovaní efektu probiotík dávajú metódy molekulárnej biológie, ktoré umožňujú značenie kmeňov vhodnými markermi pre štúdium kolonizácie a inkorporácie požadovaných vlastností do autochtónnych črevných baktérií.

Diskutuje sa o prijateľnej medzinárodnej definícii pre probiotiká.

LITERATÚRA

- ABDEL-BAR, N. M. – HARRIS, N. D. (1984): Inhibitory effect of *L. bulgaricus* on psychro-trophic bacteria in associative cultures and in refrigerated foods. *J. Food Prot.*, 47, 61–64.
- ADACHI, S. (1992): Lactic acid bacteria and the control of tumours. In: WOOD, B. J. B. (ed.): *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. London and New York, Elsevier Applied Science, 233–262.

- ADAMS, M. R. – HALL, C. J. (1988): Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **23**, 287–292.
- ALM, L. – LEIJONMARCK, C. E. – PERSSON, A. K. – MIDTVEDT, T. (1989): Survival of lactobacilli during digestion: an *in vitro* and *in vivo* study. In: GRUBB, R. – MIDTVEDT, T. – NORIN, E. (eds.): *The Regulatory and Protective Role of the Normal Microflora*. New York, M. Stockton Press, 293–297.
- ASPERGER, H. (1986): Wirkungen von Milchsäurebakterien auf andere Mikroorganismen. *Österr. Milchwirtsch.*, **41**, suppl 1 to issue 4, 1–22.
- BAILEY, J. S. – BLANKESHIP, L. C. – COX, N. A. (1991): Effect of fructo-oligosaccharide on *Salmonella* sp. colonization of the chicken intestine. *Poult. Sci.*, **70**, 2433–2438.
- BEZKOROVAINY, A. (1989): Iron transport and utilisation by bifidobacteria. In: BEZKOROVAINY, A. – MILLER-CATCHPOLE, R. (ed.): *Biochemistry and Physiology of Bifidobacteria*. Boca Raton, CRC Press, 147–176.
- BLOMBERG, L. – HENRIKSSON, A. – CONWAY, P. L. (1993): Inhibition of adhesion of *E. coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 34–39.
- BRILIS, V. I. – BRILENE, T. A. – LENZNER, H. P. – LENZNER, A. A. (1985): Studies of adhesion process of lactobacilli from human microflora. In: *Proc. Int. Symp. Bacteria and the Host*, May 14–17, Prague, 73–75.
- BROCKETT, M. – TANNOCK, G. W. (1981): Dietary components influence tissue associated lactobacilli in the mouse stomach. *Can. J. Microbiol.*, **27**, 452.
- COCONNIER, M. H. – KLAENHAMMER, T. L. – KERNEIS, S. – BERNET, M. F. – SERVIN, A. L. (1992): Protein mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2F04 on human enterocyte and mucus secreting cell lines in culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2034–2039.
- CONWAY, P. (1989): Lactobacilli: fact and fiction. In: GRUBB, R. – MIDTVEDT, T. – NORIN, E. (eds.): *The Regulatory and Protective Role of the Normal Microflora*. New York, M. Stockton Press, 263–281.
- CONWAY, P. L. – KJELLEBERG, S. (1989): Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus fermentum* strain 737 to mouse stomach squamous epithelium. *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 1175–1186.
- CORRIER, D. E. – HINTON, A. – ZIPRIN, R. L. – BEIER, R. C. – DE LOACH, J. R. (1990): Effect of dietary lactose on cecal pH, bacteriostatic volatile fatty acids and *Salmonella typhimurium* colonization of broiler chickens. *Avian Diseases*, **34**, 617–625.
- CORRIER, D. E. – NISBET, D. J. – HOLLISTER, A. G. – SCANLAN, C. M. – HARGIS, B. M. – DE LOACH, J. R. (1993): Development of defined cultures of indigenous cecal bacteria to control salmonellosis in broiler chicks. *Poult. Sci.*, **72**, 1164–1168.
- DAHL, T. A. – MIDDEN, W. R. – HARTMAN, P. E. (1989): Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *J. Bact.*, **171**, 2188–2194.
- DAESCHEL, M. A. (1989): Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.*, **43**, 164–166.
- FRETER, R. – BRICKNER, H. – BOTNEY, M. – CLEVEN, D. – ARANKI, A. (1983): Mechanisms that control bacterial populations in continuous flow culture models of mouse large intestinal microflora. *Infect. Immun.*, **39**, 676–685.
- FULLER, R. (1975): Nature of the determinant responsible for the adhesion of lactobacilli to chicken crop epithelial cells. *Gen. Microbiol.*, **87**, 245–250.
- FULLER, R. (1977): The importance of lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. *Brit. Poult. Sci.*, **18**, 85–94.
- FULLER, R. (1992): The effect of probiotics on the gut microbiology of farm animals. In: WOOD, B. J. B. (ed.): *The Lactic Acid Bacteria*. AS 3108, 171–192.
- GILLILAND, S. E. (1990): Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **87**, 175–188.
- HAMDAN, I. Y. – MIKOLAJCZAK, E. M. (1974): Acidolin: an antibiotic produced by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Antibiotic.*, **27**, 631.
- HARLEY, J. B. – SANTANGELO, G. M. – RASMUSSEN, H. – GOLDFINE, H. (1978): Dependence of *E. coli* hyperbaric oxygen toxicity on the lipid acyl chain composition. *J. Bact.*, **134**, 808–820.
- HENRIKSSON, A. – SZEWCZYK, R. – CONWAY, P. L. (1991): Characteristics of the adhesive determinants of *Lactobacillus fermentum* 104. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 499–502.
- HIDAKA, H. – EIDA, T. – HAMAYA, T. (1986): European patent application 85109590.1, Publication number 0 171 026.
- HILLMAN, K. – WHYTE, A. L. – STEWART, C. S. (1993): Dissolved oxygen in the porcine gastrointestinal tract. *Lett. Appl. Microbiol.*, **16**, 299–302.
- HINTON, A. – HUME, M. E. (1995a): Synergism of lactate and succinate as metabolites utilized by *Veillonella* sp. to inhibit the growth of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* *in vitro*. *Avian Diseases*, **39**, 309–316.
- HINTON, A. – HUME, M. E. (1995b): Antibacterial activity of the metabolic by-products of a *Veillonella* sp. species and *Bacteroides fragilis*. *Anaerobe*, **1**, 121–127.
- CHAN, R. C. Y. – REID, G. – IRVIN, R. T. – BRUCE, A. W. – COSTERTON, J. W. (1985): Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* sp. whole cells and cell wall fragments. *Infect. Immun.*, **47**, 84–89.
- CHATEAU, N. – CASTELLANOS, I. – DESCHAMPS, A. M. (1993): Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* sp. isolates of a commercial probiotic consortium. *J. Appl. Bacteriol.*, **74**, 36–40.
- CHESSON, A. (1993): Probiotics and other intestinal mediators. In: COLE, D. J. A. – WISIMAN, J. – M.A. VARLEY, M. A. (eds.): *Principles of Pig Science*. Loughborough, UK, Nottingham University Press, 197–214.
- CHUNG, K. C. – GOEPFERT, J. M. (1970): Growth of *Salmonella* sp. at low pH. *J. Food Sci.*, **35**, 326–328.
- JONSSON, E. – CONWAY, P. (1992): Probiotics for pigs. In: FULLER, R. (ed.): *Probiotics The Scientific Basis*. London, Chapman and Hall, 260–316.
- KLAENHAMMER, T. R. (1988): Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, **70**, 337–349.

- KLAVER, F. A. M. – VAN DER MEER, R. (1993): The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1120–1124.
- KLETER, G. – LAMMERS, W. L. – VOS, E. A. (1984): The influence of pH and concentration of lactic acid and NaCl on the growth of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese. *Netherl. Milk and Dairy J.*, **38**, 31–41.
- KMET, V. – JONECOVÁ, Z. – NEMCOVÁ, R. – LAUKOVÁ, A. (1986): Bakteriociny u bachorových laktobacilov, streptokokov a stafylokokov. In: 17. Kongr. Českoslov. Spol. Mikrobiol. ČSAV, České Budejovice.
- KONG, S. – DAVISON, A. J. (1980): The role of interactions between O_2 , H_2 , OH^- , e^- and O_2^- in free radical damage to biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.*, **204**, 13–29.
- KRAUSE, D. O. – EASTER, R. A. – WHITE, B. A. – MACKIE, R. I. (1995): Effect of weaning diet on the ecology of adherent lactobacilli in the gastrointestinal tract of the pig. *J. Anim. Sci.*, **73**, 2347–2354.
- LAW, B. A. – JOHN, P. (1981): Effect of the lactoperoxidase bactericidal system on the formation of the electrico-chemical proton gradient in *E. coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **10**, 67–70.
- LIN, J. H. – SAVAGE, D. C. (1985): Cryptic plasmids in *Lactobacillus* strains isolated from the murine gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 1004–1006.
- MARSHALL, W. M. E. – REITER, B. (1980): Comparison of the antibacterial activity of the hypothiocyanite anion towards *Streptococcus lactis* and *E. coli*. *J. Gen. Microbiol.*, **120**, 513–516.
- MITCHEL, I. DE G. – KENWORTHY, R. (1976): Investigations on a metabolite from *Lactobacillus bulgaricus* which neutralizes the effect of enterotoxin from *E. coli* pathogenic for pigs. *J. Appl. Bacteriol.*, **41**, 163–174.
- MORISHITA, Y. – FULLER, R. – COATES, M. E. (1982): Influence of dietary lactose on the gut flora of chicks. *Brit. Poultry Sci.*, **23**, 349–359.
- MUKAI, T. – ARIHARA, K. (1994): Presence of intestinal lectin-binding glycoproteins on the cell surface of *Lactobacillus acidophilus*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1851–1854.
- MUKAI, T. – ARIHARA, K. – ITOH, H. (1992): Lectin-like activity of *Lactobacillus acidophilus* strains JCM 1026. *FEMS Microbiol. Lett.*, **98**, 71–74.
- MURALIDHARA, K. S. – SHEGGEY, G. G. – ELLIKER, P. R. – ENGLAND, D. C. – SANDINE, W. E. (1977): Effect of feeding lactobacilli on the coliform and lactobacillus flora of intestinal tissue and feces from piglets. *J. Food Prot.*, **40**, 288–295.
- PEDERSEN, K. – TANNOCK, G. W. (1989): Colonization of the porcine gastrointestinal tract by lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 279–283.
- PIARD, J. C. – DESMAZEAUD, M. (1992): Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antimicrobial substances. *Lait*, **72**, 113–142.
- PIVNICK, H. – NURMI, E. (1982): The Nurmi concept and its role in the control of salmonellae in poultry. In: DAVIES, R. (ed.): *Developments in Food Microbiology-1*. Essex, UK, Applied Science Publishers, 41–70.
- POLLMAN, D. S. – DANIELSON, D. M. – PEO, E. R. (1980): Effect of *Lactobacillus acidophilus* on starter pigs fed a diet supplemented with lactose. *J. Anim. Sci.*, **51**, 638–644.
- PRICE, R. J. – LEE, J. S. (1970): Inhibition of *Pseudomonas* sp. by hydrogen peroxide producing lactobacilli. *J. Milk Food Technol.*, **33**, 13–18.
- PRUITT, K. M. – REITER, B. (1985): Biochemistry of peroxidase system: antimicrobial effects. In: PRUITT, K. M. – TENOVUO, J. (eds.): *The Lactoperoxidase System. Immunology series*. Vol. 27. New York, M. Dekker Inc, 143–178.
- PRUITT, K. M. – TENOVUO, J. – ANDREWS, R. W. – MC KANE, T. (1982): Lacto-peroxidase-catalysed oxidation of thiocyanate: polarographic study of the oxidation products. *Biochemistry*, **21**, 562–567.
- PURDY, M. A. – TENOVUO, J. – PRUITT, K. M. – WHITE, W. E. (1983): Effect of growth phase and cell envelope structure on susceptibility of *Salmonella typhimurium* to the lactoperoxidase thiocyanate hydrogen peroxide system. *Infect. Immun.*, **39**, 1187–1195.
- RADA, V. – VOŘÍŠEK, K. – RYCHLÝ, I. (1993): Selected characteristic of lactobacilli isolated from the chicken gut. *Folia Microbiol.*, **38**, 115.
- REDDY, G. V. – SHAHANI, K. M. – FRIEND, B. A. – CHANDAN, R. C. (1994): Production and partial purification of bulgarin from *Lactobacillus bulgaricus*. *Cult. Dairy Prod. J.*, **7**–11.
- REID, G. (1988): Lactobacillus inhibitor production against *E. coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Can. J. Microbiol.*, **34**, 344–351.
- REITER, B. (1985): The lactoperoxidase system of bovine milk. In: PRUITT, K. M. – TENOVUO, J. (eds.): *The Lactoperoxidase System. Immunology series*. Vol. 27. New York, M. Dekker Inc, 123–141.
- REITER, B. – HARNULV, G. (1984): Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. *J. Food Prot.*, **47**, 724–732.
- REITER, B. – MARSHALL, W. M. – PHILIPS, S. M. (1980): The antibiotic activity of the lactoperoxidase-thiocyanate- H_2O_2 system in the calf abomasum. *Res. Vet. Sci.*, **28**, 116–122.
- ROWLAND, I. R. (1992): Metabolic interactions in the gut. In: FULLER, R. (ed.): *Probiotics*. London, Chapman and Hall, 29–54.
- SALYERS, A. A. (1984): Bacteroides of the human lower intestinal tract. *Ann. Rev. Microbiol.*, **38**, 293–313.
- SCHNEITZ, C. – NUOTLO, L. – LOUNATMA, K. (1993): Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer (S-layer). *J. Appl. Bacteriol.*, **74**, 290–294.
- SHAHANI, K. M. – VAKIL, J. R. – KILARA, A. (1976): Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. *Cult. Dairy Prod. J.*, **11**, 14.
- SHERMAN, L. A. – SAVAGE, D. C. (1986): Lipoteichoic acids in *Lactobacillus* strains that colonize the mouse gastric epithelium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **4**, 467–485.
- SIRAGUSA, G. R. – JOHNSON, M. G. (1989): Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth by the lactoperoxidase-thiocyanate- H_2O_2 antimicrobial system. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2802–2805.

- SPENCER, R. J. – CHESSON, A. (1994): The effect of *Lactobacillus* spp. on the attachment of enterotoxigenic *E. coli* to isolated porcine enterocytes. *J. Appl. Bacteriol.*, 77, 215–220.
- STAVRIC, S. – GLEESON, T. M. – BLANCHFIELD, B. – PIVNICK, H. (1987): Role of adhering microflora in competitive exclusion of *Salmonella* sp. from young chicks. *J. Food Prot.*, 50, 928–932.
- STEELE, W. F. – MORRISON, M. (1969): Antistreptococcal activity of lactoperoxidase. *J. Bact.*, 97, 635–639.
- SUWA, Y. – KOGA, K. – FUJIKAWA, S. – OKAZAKI, M. – IRIE, T. – NAKADA, T. (1987): European patent application 87115999.2. Publication number 0 265 970 A2.
- TANNOCK, G. W. – SZYLIT, O. – DUVAL, Y. – RABAND, P. (1982): Colonization of tissue surfaces in the gastrointestinal tract of gnotobiotic animals by *Lactobacillus* strains. *Can. J. Microbiol.*, 28, 1196–1198.
- TEN BRINK, B. – MINEKUS, M. – VAN DER VOSSEN, J. M. B. M. – LEER, R. J. – HUIS INT VELD, J. H. J. (1994): Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M 46. *J. Appl. Bacteriol.*, 77, 140–148.
- THOMAS, E. L. (1985): Bacterial hydrogen peroxide production. In: PRUITT, K. M. – TENOVUO, J. (eds.): The lactoperoxidase system. Immunological series. Vol. 27. New York, M. Dekker Mc, 179–202.
- TOMIOKA, H. – SAITO, H. (1992): Lactic acid bacteria in the support of immunocompromised hosts. In: WOOD, B. J. B. (ed.): The Lactic Acid Bacteria. AS3108. 263–296.
- VANDEVOORDE, L. – VANDE WOESTYNE, M. – BRUYNEEL, B. – CHRISTIAENS, H. – VERSTRAETE, W. (1992): Critical factors governing the competitive behaviour of lactic acid bacteria in mixed cultures. In: WOOD, B. J. B. (ed.): The Lactic Acid Bacteria. The Lactic acid bacteria in health and disease. AS3107. 447–476.
- VIDGREN, G. – PALVA, I. – PAKKANEN, R. – LONAT-MAA, K. – PALVA, A. (1992): S-layer protein gene of *Lactobacillus brevis*: Cloning by polymerase chain reaction and determination of the nucleotide sequence. *J. Bacteriol.*, 174, 7419–7427.
- VINCENT, J. G. – VEOMETT, R. C. – RILEY, R. F. (1959): Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bact.*, 78, 477.
- YADAVA, J. N. S. – GUPTA, S. – AHMAD, I. – VARMA, N. – TANDON, J. S. (1995): Neutralization of enterotoxins of *E. coli* by coleonal (forskolin) in rabbit and guinea pig ileal loop models. *Indian J. Anim. Sci.*, 65, 1177–1181.

Received 96–02–29

Accepted for publication 96–07–29

Kontaktná adresa:

MVDr. Radomíra Nemcová, CSc., Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Hlinkova 1/A, 040 01 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/374 29, 360 87, fax 095/633 18 53

Professor MVDr. et Dr. h.c. mult. František (Frank) Král in Bulgaria and USA**Profesor MVDr. et dr. h. c. mult. František (Frank) Král v Bulharsku a v USA**

Professor Král became a legend. He was engaged in Czech veterinary medicine from its very beginning in the new independent Czechoslovak state for 29 years; of this time, 19 years as a faculty member, teacher at the School of Veterinary Medicine in Brno. He soon outgrew the limits of the school. Král was very active in postgraduate education of practitioners. For many years he enjoyed the favour of students and voters, and as an exponent of the Czechoslovak Agrarian Party he participated as a representative in Moravian and Brno city council.

His journey to Bulgaria belongs among the not quite elucidated events of his life. In the oppressive atmosphere of the beginning nazi occupation of Czech lands he appeared in Sofia in May 1939. He was awarded a honorary doctor of veterinary medicine of the Sofia University of Saint Kliment of Ochrid, and was also decorated with the Order of Saint George IIIrd class. According to oral communications of witnesses in Sofia these distinctions were conferred upon him after he offered the Czech teachers-veterinarians from nazi-occupied Brno to Sofia University. His proposal was not accepted by the Bulgarian side.

After 1948, at the age of 56, he left the country and came to the USA. Here he actively participated in veterinary medicine for 31 years, until his death in 1980. His American career was longer than that in his native country. For 15 years he was a faculty member at the School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania. Even after retiring at the age of 71, he did not interrupt the contact with this University and continued to work.

Dermatology became his destiny. During his entire professional career he had great interest in this discipline. His beginning as a dermatologist was exceptionally fortunate, it grew from the very roots of the discipline and traces back to the famous Vienna Medical School, the renowned founders and heads of which were Karel Rokytanský and Josef Škoda. Its members were also the dermatologist Ferdinand Hebra and his followers, Hebra's son Hans and Hugo Schindelka; all of them except for Hans Hebra were natives of the Czech lands. Schindelka, doctor of medicine, became professor at the Vienna Veterinary School, and has been regarded as the founder of veterinary dermatology that flourished under his leadership. He included the discipline into veterinary curriculum. Král transferred this excellent tradition from Vienna to Brno and in a short time he published a monograph on veterinary dermatology. Thus he made Brno one of the focuses of this discipline. After World War II he transferred it to the USA and became a well known and distinguished founder of American veterinary dermatology. At the Philadelphia place of work, and also at the graduate School of Medicine he thus further quickly developed his Middle European heritage in dermatology in a fruitful way. In 1959 he received the first Annual Gaines Award in recognition of his pioneer work in veterinary dermatology, and in 1961, at the 12th World Veterinary Congress the first awarded congress prize, among many others.

Despite memories, apologies and praising articles about Král as a dermatologist have been wrongfully and to our own detriment neglected in recent Czech professional literature.

Prof. MVDr. et Dr. h. c. mult. František (Frank) Král se stal českou zvěrolékařskou legendou. Byl a je vzpomínán, oslavován, opomíjen i zamlčován. U nás se o něm psalo v několika historicky oddělených údobích (Dostál, 1931; Klobouk, 1942; Konvička, 1946; Konrád, 1968; Novotný a Böhm, 1968a, b; Velíšková, 1969; Sindlář, 1985; Skala, 1989; Anonymus, 1992; Fried, 1992a, b; hb, 1992; Konrád a Kábrt, 1992; Vach, 1992). Jeho osudy, jak je i nejnověji združňováno (Böhm aj., 1993), jsou však naši veterinární veřejnosti známy jen omezeně, kuse a nepřesně.

Bulharsko 1939

Král působil na poli českého zvěrolékařství od samých začátků jeho formování v novém samostatném československém státě 29 let; z toho 19 roků působil

jako učitel brněnského vysokého učení zvěrolékařského. Mezi málo osvětlené události tohoto období patří jeho bulharská mise, u nás opakovaně mylně datovaná do roku 1938 (Konrád a Kábrt, 1992; Vach, 1992). V jeho životopise zpracovaném pro pensylvánskou univerzitu je zařazena do roku 1939, do začátku nacistické okupace.

V dusné atmosféře nástupu bytostného ohrožení všeho českého se v květnu 1939 Král objevuje – je uváděn jako profesor speciální patologie a terapie Veterinární univerzity v Brně na Moravě – v Sofii. Během krátkého pobytu se mu dostává hodnosti čestného doktora veterinární medicíny Sofijské univerzity Svatého Klimenta Ochridského a je bulharským carem Borisem III. vyznamenán řádem Svatého Jiří III. třídy.

Sám dekorovaný si později zapsal: „Důstojnický řád bulharský, který jsem dostal osobně od bulharského Krále Borise v roce 1939 v Sofii po slavnostním udělení čestného doktorátu od sofijské univerzity. Tento

čestný doktorát dostalo 12 významných vědeckých pracovníků z celého světa. Já byl jediný z Československa a jako jediný řečník za všechny doktoranty jsem děkoval bulharské univerzitě v bulharské řeči za přítomnosti Krále Borise a jeho choti. Večer na to jsem byl jediný pozván na večeři v Konaku s Králem Borisem a jeho rodinou“.

Dle vyprávění sofijských pamětníků tomu tak bylo proto, že Král přijel z tehdejšího protektorátu Čechy a Morava nabídnout české učitele z Brna vysokému veterinárnímu učení sofijskému. Nabídka však nebyla bulharskou stranou přijata.

USA 1948 až 1980

Po osvobození v roce 1945 se Král znovu ujímá funkce přednosty kliniky na Vysoké škole veterinární v Brně. Rychle nachází cestu k posluchačům. Účastní se jako jeden z mála učitelů školy jejich někdy až bouřlivých spolkových schůzí. Rozvážně na nich vystupuje a těší se jejich důvěře.

Po roce 1948 z Brna mizí, emigruje. Brzy na to se objevuje v USA. Zde aktivně působí ve veterinární medicíně 31 rok, až do svého skonu v roce 1980, déle než ve veterinárním poli českém.

Do USA přišel nemladý, bylo mu padesát šest let. V tomto věku se, zvláště v Americe, nezačíná snadno. Bylo tomu tak i v jeho případě. Navíc, i když mu severoamerická veterinární scéna nebyla cizí, nebyla mu blízká.

Zprvu, v roce 1949, byl přidružen k pracovníkům pensylvánské univerzity ve Filadelfii. Ale již v průběhu dalšího roku pracoval jako asistent a poté byl postupně přefazován až do kategorie nejvyšší. Kmenovým pracovníkem veterinární fakulty pensylvánské univerzity byl 15 let. Ale ani po penzionování, kdy mu bylo jednadsměsát let, v práci neustal a s univerzitou styky nepřerušil.

Záhy se i v USA prosadil. Počal být uznáván, respektován, oceňován a vyznamenáván nejen pro své rozsáhlé odborné znalosti, ale i pro jejich mistrné uplatňování, pro atraktivní prezentace na nejrůznějších veterinárních i lékařských akcích (Anonymus, 1973, 1977, 1980a b, c; Schwartzman, 1981, 1995; Martin, 1984). Rád cestoval. Dovedl být přívětivý a získávat si přátele. Přitahoval svou oddaností profesi, působivými, obrazově znamenitě dokumentovanými slovními projevy, zkušenostmi bravurního klinika, nevyčerpatelnou aktivitou, zářivým optimismem, zcela zřejmou vůlí se uplatňovat a znalosti rozdávat. Byl rádcem a pomocníkem mladším, které potkal podobný osud. Toto období Králůva života bylo českému čtenáři přiblíženo teprve u příležitosti stého výročí jeho narození (Fried, 1992a, b; Hb, 1992; Konrád a Kábrt, 1992; Böhm aj., 1993) nejvíce Vachem (1992).

Působení prof. F. Krále v USA

- 1949 – začíná být pracovníkem pensylvánské univerzity (University of Pennsylvania) a na její veterinární fakultě (School of Veterinary Medicine) přednášet interní veterinární medicínu
- 1950 – (asistent professor, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania)
 - (associate professor, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania)
 - začíná přednášet a referovat na schůzích a zasedáních amerických veterinárních organizací (American Veterinary Medical Association), a to nejen v Pensylvánii a dalších státech USA, ale i v Kanadě, Německu a Švýcarsku
- 1952 – začíná přednášet dermatologii lékařům (Department of Dermatology, Graduate School of Medicine, University of Pennsylvania)
- 1956 – profesor interní veterinární medicíny (School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania)
- 1963 – penzionován

Pocty prokázané prof. F. Královi během jeho působení v USA

- 1958 – Cycle Award AVMA
- 1959 – First World Price na světovém veterinárním kongresu v Madridu (za výstavu ilustrací kožních nemocí u zvířat a lidí)
 - první výroční Gaines Award (za pionýrskou práci ve veterinární dermatologii)
 - z prostředků Fulbright Foundation vyslán k působení na univerzitě v Mnichově
- 1961 – Twelfth International Veterinary Congress Price AVMA, Detroit
- 1962 – čestný doktorát veterinární medicíny, Univerzita v Mnichově
- 1963 – emeritní profesor dermatologie, School of Veterinary Medicine, Pennsylvania University
- 1964 – zlatý diplom Vysokého učení veterinárního ve Vídni
- 1968 – obnova diplomu čestného předsedy Spolku veterinárních mediků v Brně, jímž byl zvolen již v roce 1933
- 1973 – první Achievement Award of American Academy of Veterinary Dermatology
- 1975 – první čestný člen American College of Veterinary Internal Medicine
 - člen Rotary Club of Philadelphia
 - člen American Veterinary Medical Association (AVMA)
 - člen Pennsylvania Veterinary Medical Association
 - člen New York Academy of Sciences
 - člen Keyston Veterinary Medical Association
 - člen Society of Phi Zeta
 - člen Society for Investigative Dermatology
 - člen Philadelphia Dermatologic Society

- čestný člen North Carolina Veterinary Medical Association
- čestný člen Washington Veterinary Medical Association
- čestný člen Alumni Association of the University of Pennsylvania
- čestný člen Alpha Psi Fraternity

Král a dermatologie

Již v době brněnského působení Král hranice svého pracoviště a školy přerůstal. Byl velmi aktivní i mezi praktiky, v jejich postgraduálním vzdělávání (Vrtiš, 1974). Přesahoval i meze zvěrolékařství. Byl vpravdě zoon politikem. Jako exponent agrární strany se podílel na moravské zemské a brněnské městské samosprávě. Po léta se těšil přízni studentů (byl též čestným předsedou Spolku veterinárních mediků; Vach, 1992) a voličů a stál v čele mnoha organizací a spolků (Velíšková, 1969; Šindlář, 1985; Anonymus, 1992; Fried, 1992a, b; Konrád a Kábrt, 1992; Vach, 1992; Böhm aj., 1993).

Osudem se mu však stala dermatologie. V průběhu celé své profesionální kariéry o ni jevil hluboký zájem. Chápal ji jako vzrušující dobrodružství (Schwartzman, 1995). Kožní změny mu byly výrazem interakce organismu a prostředí, byly mu zrcadlem, v němž se procesy probíhající v těle zobrazují.

Jeho dermatologické začátky byly šťastné. Vyrůstají ze samých novodobých kořenů oboru. Sahají až k začátkům novodobého nazírání na kožní neduhy slavné vídeňské lékařské školy, do doby, kdy její čelní představitelé docházeli světového ohlasu. Jejimi uznávanými zakladateli a hlavami byli: Karel Rokitský (narozen v Hradci Králové), patolog, svobodný pán (Mr, 1868; Anonymus, 1932a; Wyklíč, 1988) a Josef Škoda (narozen v Plzni), klinik (Dcha, 1872; Anonymus, 1906, 1932b). Ten získal pro své medicínské názory brněnského rodáka, rytíře Ferdinanda Hebru (Anonymus, 1896a, 1993a). Škoda, ač sám vysoko ceněný odborník v dermatologii, postoupil Hebrovi ze své kliniky nemoci vnitřních a kožních oddělení kožních chorob. Ten pak tento obor vyprostil z pout teorií humorálních. Jako exaktní pozorovatel své klinické závěry racionálně opíral o patomorfologické nálezy. Neváhal ani před experimentováním. Své lékařské umění posléze předal synovi, rytíři Hansovi, jenž je obohatil a vtělil do četných vědeckých a odborných prací (Anonymus, 1896b, 1993b).

V té době, před více než sto lety, studoval na vídeňském lékařském učení Hugo Schindelka (Wirth, 1913; Anonymus, 1915; Jaksch a Ullrich, 1968; Skala, 1990), syn známého znojenského lékaře. Po dokončení medicínských studií a absolvování vojenské služby si doplnil vzdělání na vídeňské škole zvěrolékařské, kde se později stal profesorem interní medicíny. Dermatologické dědictví Hebru na své nové působiště přenesl, pevně začlenil do zvěrolékařského kurikula a přivedl k nebývalému rozkvětu. Přesvědčivě

to dokládá jeho dílo Hautkrankheiten bei Haustieren, které vyšlo dvakrát krátce po sobě (Schindelka, 1902, 1908). Právem je proto obecně pokládán za zakladatele zvěrolékařské dermatologie.

Krátce po druhém vydání Schindelkovy knihy přišel na vídeňskou zvěrolékařskou školu student František Král. Vysoko ctěný Schindelka (vyznamenaný rytířským křížem Řádu Františka Josefa, Řádem železné koruny III. třídy a poctěný titulem dvorního rady) brzy na to, v jednadesátém roce svého věku, zemřel. Jeho ostatky byly uloženy na znojenském hřbitově (Wirth, 1913), ale jeho dílo nezůstalo bez odezvy. Ovlivnilo i mladého Krále, který na Schindelkově klinice již jako student a asistent pracoval. Zřejmě na něj zapůsobili některé, až oslnující prvky Schindelkova učitelského umu, od „velkých“ názorných přednášek s demonstracemi pacientů, které měnily poklidné, suchopárné vysokoškolské lekce v nezapomenutelná, znamenitě režirovaná představení, až po hluboké zaujetí dermatologií. Král tyto vynikající tradice imponujícím způsobem přenesl na brněnskou školu. Při tom se však nevzdával možnosti poučit se o kožních neduzích i jinde, např. u pražského profesora Šambergra a v monumentálním díle berlinského Julia Hellera (Heller, 1910; Schwartzman, 1995). Takto chápanou dermatologii rozvíjel i spoluprací, např. s prof. Trýbem z brněnské Lékařské fakulty. Plodnost Králova rozletu dokumentuje i skutečnost, že byl schopen v době náročného zakládání kliniky a plnění řady dalších tíživých povinností vyplývajících z budování školy, problematiku zvěrolékařské dermatologie literárně ztvárnit do monografie (Král, 1931). Vydal ji vlastním nákladem za podpory ministerstva školství a národní osvěty v Rolnické tiskárně v Brně. Nejčastěji v ní cituje Schindelku, k němuž se hlásí již v úvodu. Kniha vyšla v době, kdy Královi ještě nebylo čtyřicet let. Byla jedním z prvních vkladů brněnské školy do českého veterinárního písemnictví.

Královo zaujetí kožními chorobami se plně projevilo i později, na jeho filadelfském působišti. Rychle a plodně je rozvinul, jak ve výuce studentů, tak ve výchově graduovaných veterinářů i lékařů, jimž přednášel na Graduate School of Medicine, své americké alma mater. V USA během patnácti let uveřejnil více než třicet původních vědeckých prací, podílel se na vzniku čtyř knižních dermatologických publikací a proslovil na tři sta odborných přednášek.

Knižní díla prof. F. Krále vydaná během jeho působení v USA

- 1953 – Veterinary Dermatology (s B. Novakem)
- 1955 – Colics in the Horse (s W. LaGrangem)
- 1960 – Compendium of Veterinary Dermatology
- 1964 – Veterinary and Comparative Dermatology (s R. M. Schwartzmanem)
- 1968 – Atlas of Canine and Feline Dermatoses (s R. M. Schwartzmanem)

Královův zakladatelský přínos do veterinární dermatologie byl oslnivý. Dokládá to skutečnost, že byl v roce 1959 za pionýrskou práci ve veterinární dermatologii vyznamenán výroční Gainesovou cenou. V téže roce na Světovém veterinárním kongresu v Madridu představil tak vynikající soubor ilustrací kožních onemocnění zvířat, že byl poctěn znovu, tentokrát první světovou kongresovou cenou (Polák, 1967; Vach, 1992). Nepochybně při tom zúročil i svůj dlouhodobý, již z Brna známý zájem o obrazové, a to i filmové, ztvárňování chorob hospodářských zvířat (Velíšková, 1969; Vrtiš, 1974; Šindlář, 1985). Další nebyvalou poctou bylo, že v roce penzionován byl jmenován emeritním profesorem dermatologie. Posléze, v roce 1975, se stal prvním čestným členem American College of Veterinary Internal Medicine. Odchodem Krále z české veterinární scény zájem o jeho dermatologické umění na brněnském veterinárním učení nekončil. Začátkem šedesátých let byla vydána Veterinární dermatologie (Jelínek a Šobra, 1961). Její autoři se až kompetitivně pokusili mezeru po Královi zacelit. Projevili při tom náležitou míru vědecké poctivosti tím, že se korektně k vídeňským kořenům zvěrolékařské dermatologie Škody, Hebrů a Schindelky přihlásili a neopoměli ani Krále. Citovali i jeho americkou dermatologickou publikaci z padesátých let. Královu světovou proslulost a jeho americké dílo, tehdy pro některé politicky nežádoucí, uznali.

Osudy přímých styků Krále s brněnským veterinárním učením však poté, v šedesátých letech, příliš šťastné nebyly. Jednoznačně, s nadšením, jej v roce 1968 byli hotovi přijmout studenti. Byl mu obnoven diplom čestného předsedy jejich tehdy velmi aktivního spolku (Vach, 1992; Motlík, 1995). Jeho styky s pracovníky, učiteli školy té doby charakterizoval Vach (1992). Bohužel, svou přinejmenším ambivalentností, dvojakostí a pasivitou se na útulnu kontaktů s Králem aktivně podíleli i někteří pracovníci klinické oblasti Králem v Brně založené, rozvíjené a ve světě uznávané. Neúspěšná byla i tehdejší jednání o Králově nezištné nabídce obdarovat školu svou bohatou odbornou knihovnou.

O to politováníhodnější je, že se na brilantní tradici české veterinární dermatologie vědomě nenavazuje. Přes vzpomínky, apologie a oslavné články je Král, jako jeden ze zakladatelů veterinární dermatologie, v naší odborné literatuře i nyní opomíjen (Doubek et al., 1994).

ZÁVĚR

Prof. MVDr. et MVDr. h.c. mult. František (Frank) Král byl osobností odborně i politicky mimořádnou. Jako jediný je z brněnské školy v moderní historii veterinární medicíny vzpomínán (Dunlop a Williams, 1996).

Veterinární dermatologii položila v minulém století základy nevelká skupina lékařů původem z Čech a Mo-

ravy. Jedním z jejich dědiců byl i Král. Jejich odkaz převzal a rozmnožil. Z Brna učinil jedno z ohnisek veterinární dermatologie. Po druhé světové válce je přenesl do zámoří a stal se uznávaným a ctěným zakladatelem veterinární dermatologie americké (Anonymous, 1973, 1980a, b, c; Schwartzman, 1981, 1995; Martin, 1984; Dunlop a Williams, 1996).

Během nedávných čtyř desetiletí veterinární dermatologii, vzešlou z vynikajícího díla odborníků z našich zemí, trvale v různých částech světa pěstoval a rozvíjel tak, že byl zahrnován nejvyššími veterinárními poctami. Nelze proto v instituci, u jejíhož zrodu jako zakladatel stál a na jejichž úspěších se rozhodující mírou podílel, nevěděti. Bylo by zpozdilé zasouvat Krále do nepaměti a zahalovat nevědomím. Zamlžovat jeho objektivizované a uznávané vklady do světového pokladu veterinářství by bylo nejen nemorální, ale ve svých důsledcích celé naší zvěrolékařské obci i kultuře škodlivé.

Poděkování

Je mně milou povinností vyslovit za účinnou pomoc vřelě díky D. K. Detweilerovi, D.V.M., M.S., D.Sc., členu A.C.V.I.M. a R. M. Schwartzmanovi, V.M.D. z Veterinární fakulty Pensylvánské univerzity ve Filadelfii (USA), prof. G. Kovačevovi, děkanovi Fakulty veterinární medicíny Vysokého institutu lesnického v Sofii (Bulharsko) a PhDr. J. Šindlářovi z Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně.

Prameny

Archiv University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
Biografický fond historického archivu kabinetu dějin veterinární medicíny Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně.
Dokumenty Sofijské univerzity „Svatého Klimenta Ochridského“, Bulharsko.
Dokumenty Veterinární fakulty Vysokého institutu lesnického v Sofii, Buharsko.

LITERATURA

ANONYMUS (1896a): Hebra Ferdinand. In: Ottův slovník naučný. 10. díl. Praha, s. 1008.
ANONYMUS (1896b): Hebra Hans. In: Ottův slovník naučný. 10. díl. Praha, s. 1008.
ANONYMUS (1906): Škoda Josef. In: Ottův slovník naučný. 24. díl. Praha, s. 638–639.
ANONYMUS (1915): Schindelka Hugo. In: Hospodářský slovník naučný. IV. díl. Praha, s. 525.
ANONYMUS (1932a): Rokitsanski Karel MUDr. svobodný pán. In: Masarykův slovník naučný. Díl VI. Praha, s. 199.
ANONYMUS (1932b): Škoda Josef, MUDr. In: Masarykův slovník naučný. Díl VII. Praha, s. 44.
ANONYMUS (1973): Emeritus Profesor Dr. Frank Kral. Almanac (University of Pennsylvania), 20 (5), 6.

- ANONYMUS (1977): Emeritus Professor Dr. Frank Kral. Almanac (University of Pennsylvania), 20, 30 October 1977, 6.
- ANONYMUS (1980a): Dr. Frank (František) Kral. Almanac (University of Pennsylvania), 27 (4), 8.
- ANONYMUS (1980b): Dr. Frank Kral dies; veterinary professor. Bulletin. Philadelphia, 9 September 1980.
- ANONYMUS (1980c): Dr. Frank Kral, 88; veterinary professor. Philadelphia Inquirer, 9 September 1980.
- ANONYMUS (1992): Sto let od narození prof. MVDr., Dr. med. vet. h.c. mult. Františka Krále (18. 8. 1892–7. 9. 1980). Veterinářství, 42, 281.
- ANONYMUS (1993a): Hebra Ferdinand von. In: Österreichisches Biographisches Lexikon 1815–1950. II. Band. 2. unveränderte Auflage. Wien, s. 232.
- ANONYMUS (1993b): Hebra Hans von. In: Österreichisches Biographisches Lexikon 1815–1950. II. Band. 2. unveränderte Auflage. Wien, s. 232.
- BÖHM, R. – BŘEHOVÁ, O. – ČERNOHOUS, J. – HAMŠÍK, V. – HEJLOVÁ, Š. – KÁBRT, J. – PIVNÍK, L. – PLEVA, V. – ŠIKULA, J. – ŠINDLÁŘ, J. (1993): 75 let vysokého veterinárního učení v Brně. Brno, 453 s.
- DOSTÁL, R. (1931): Zpráva odstupujícího rektora Magnificence Prof. Ph.Dr. Rudolfa Dostála o studijním dvouletí 1929/1931. In: Slavnostní inaugurace rektora Čs. vysoké školy zvěrolékařské v Brně Prof. M.V.Dr. Františka Krále dne 30. listopadu 1931. Brno, s. 5–18.
- DOUBEK, J. – KONVALINOVÁ, J. – NEČAS, A. – RYBNÍČEK, J. – SVOBODA, M. – SVOBODOVÁ, V. (1994): Dermatologie psa a kočky. Brno, 378 s.
- DUNLOP, R. H. – WILLIAMS, D. J. (1996): Veterinary Medicine. An Illustrated History. Mosby – Year Book Inc., St. Louis, XXVIa, 692 s.
- FRIED, K. (1992a): Kto bol profesor MVDr. František Král. Vet. Spravod., 27 (11–12), s. 1.
- FRIED, K. J. (1992b): Prof. Dr. František Král sa už živý nevrátil. Veterinářství, 42, 283–284.
- HELLER, J. (1910): Die Vergleichende Pathologie der Haut. Berlin, IX, 633, XVII s.
- JAKSCH, W. – ULLRICH, W. (1968): Die I. medizinische Klinik für Einhufer, Kleintiere und Geflügel. In: 200 Jahre Tierärztliche Hochschule in Wien. Wien, s. 121–131.
- JELÍNEK, V. – ŠOBRA, K. (1961): Veterinární dermatologie. Praha, 458 s.
- KLOBOUK, A. (1942): Padesátka prof. dr. Františka Krále. Věst. Českoslov. Vet., 12, 205–206.
- KONRÁD, J. (1968): Vnitřní choroby I. In: 50 let vysokého veterinárního učení v Brně. Brno, s. 247–252.
- KONRÁD, J. – KÁBRT, J. (1992): Prof. MVDr. Dr.h.c. František Král – 100. výročí narození. Veterinářství, 42, 284–286.
- KONVIČKA, J. (1946): Jihočeský hoch se uplatňuje. Zlatá stezka, 15 (5), 68–71.
- KOPLAS, Č. (1968): Pro návrat profesora MUDr. Františka Krále. Praha, 2 s.
- KRÁL, F. (1931): Veterinární dermatologie. Brno, 264 s.
- MARTIN, J. E. (1984): A legacy and a promise. The first one hundred years. 1884–1984. Philadelphia, s. 124–125.
- MOTLÍK, J. (1995): Osobní sdělení.
- NOVOTNÝ, E. – BÖHM, R. (1968a): Část první – Škola. In: 50 let vysokého veterinárního učení v Brně. Brno, s. 21–105.
- NOVOTNÝ, E. – BÖHM, R. (1968b): Část třetí – Personalie. In: 50 let vysokého veterinárního učení v Brně. Brno, s. 289–300.
- POLÁK, L. (1967): Osobní sdělení.
- SCHINDELKA, H. (1902): Hautkrankheiten der Haustieren. Wien-Leipzig.
- SCHINDELKA, H. (1908): Hautkrankheiten bei Haustieren. 2. vyd. Wien-Leipzig.
- SCHWARTZMAN, R. M. (1981): In memory of Frank Kral. Health Affairs. Fall/Winter.
- SCHWARTZMAN, R. M. (1995): Osobní sdělení.
- SKALA, L. (1989): Král František. In: Sbor. ČSAZ 130. Malý slovník biografii II. Praha, s. 125.
- SKALA, L. (1990): Schindelka Hugo. In: Sbor. ČSAZ 138. Malý slovník biografii III. Praha, s. 154.
- ŠINDLÁŘ, J. (1985): Z dějin brněnské vědecké kinematografie. Děj Věd. Tech., 18, 258–259.
- VACH, M. (1992): Před sto lety se narodil profesor František Král. Veterinářství, 42, 281–283.
- VELÍŠKOVÁ, H. (1969): Prof. dr. František Král. Bull. Českoslov. Spol. Věd. Kinematograf, 20, 8–11.
- VRTIŠ, V. (1974): Počátky dalšího profesního vzdělávání českých a československých veterinárních lékařů (od konce XIX. století do r. 1945). Hradec Králové, 126 s.
- WIRTH, D. (1913): Hofrat Schindelka. Tierärztl. Zbl., 36, 174–177.
- WYKLICKÝ, H. (1988): Rokitsanski Karl Frh von. In: Österreichisches bibliographisches Lexikon 1815–1950. IX. Band. Wien, s. 221–222.
- Dcha (1872): Škoda Josef. In: RIEGER, F. L. (1872): Slovník naučný. 9. díl. Praha, s. 53–54.
- hb (1992): Vědec světového věhlasu. Jihočeská pravda, 20. srpna.
- Mr (1868): Rokytanský Karel. (1868): In: RIEGER, F. L.: Slovník naučný. 7. díl. Praha, s. 619–620.

Antonín Holub, Koliště 9, 602 00 Brno

POKYNY PRO AUTORY

Časopis uveřejňuje původní vědecké práce, krátká sdělení a výběrově i přehledné referáty, tzn. práce, jejichž podkladem je studium literatury a které shrnují nejnovější poznatky v dané oblasti. Práce jsou uveřejňovány v češtině, slovenštině nebo angličtině. Rukopisy musí být doplněny krátkým a rozšířeným souhrnem. Časopis zveřejňuje i názory, postřehy a připomínky čtenářů ve formě kurzívy, glosy, dopisu redakci, diskusního příspěvku, kritiky zásadního článku apod., ale i zkušenosti z cest do zahraničí, z porad a konferencí.

Autoři jsou plně odpovědní za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. K práci musí být přiloženo prohlášení o tom, že práce nebyla publikována jinde.

O uveřejnění práce rozhoduje redakční rada časopisu, a to se zřetel k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu a kvalitě práce. Redakce přijímá práce imprimitované vedoucím pracoviště nebo práce s prohlášením všech autorů, že se zveřejněním souhlasí.

Rozsah původních prací nemá přesáhnout 10 stran psaných na stroji včetně tabulek, obrázků a grafů. V práci je nutné používat jednotky odpovídající soustavě měrových jednotek SI.

Rukopis má být napsán na papíře formátu A4 (30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, mezi řádky dvojité 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, nepodlépají se. Na všechny přílohy musí být odkazy v textu.

Pokud autor používá v práci zkratku jakéhokoliv druhu, je nutné, aby byly alespoň jednou vysvětleny (vypsány), aby se předešlo omylům. V názvu práce a v souhrnu je vhodné zkratku 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 autory 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 citovaná v textu práce se uvádí jménem autora a rokem vydání. Do seznamu se zařadí jen publikace citované v textu. Citace se řadí abecedně podle jména prvního autora.

Klíčová slova mají umožnit zhledání 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 should be typed on standard paper (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.

References in the manuscript are given in form of citations of the author's name and year of publication. A list of references should contain publications cited in the manuscript only. References are listed alphabetically by the first author's name.

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 42, No. 1, January 1997

CONTENTS

Ledecký V., Ševčík A., Capík I., Trbolová A.: Analysis of hip joint dysplasia development in dogs.....	1
Salem S. F., Mohsen A.: Brucellosis in fish (in English)	5
Benda P., Vyletělová M.: Testing of culture media for detection of <i>Staphylococcus aureus</i> in bulk milk samples	9
REVIEW ARTICLE	
Nemcová R.: Selection criteria of lactobacilli for probiotic use	19
INFORMATION	
Hruška K.: At the beginning of the new year	8
Hruška K.: The Medal of the Faculty of Medicine at Masaryk University at Brno has been Awarded to Prof. MVDr. Z. Věžník, DrSc.	18
Holub A.: Professor MVDr. et Dr. h.c. mult. František (Frank) Král in Bulgaria and USA	28

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 42, č. 1, Leden 1997

OBSAH

Ledecký V., Ševčík A., Capík I., Trbolová A.: Analýza vývoje dysplázie bedrových kloubů u psů	1
Salem S. F., Mohsen A.: Brucelóza ryb	5
Benda P., Vyletělová M.: Testování kultivačních médií pro stanovení <i>Staphylococcus aureus</i> v bazénových vzorcích mléka	9
PŘEHLED	
Nemcová R.: Kritéria výběru laktobacilů pro probiotické účely	19
INFORMACE	
Hruška K.: Na prahu nového ročníku	8
Hruška K.: Medaile Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně udělena Prof. MVDr. Z. Věžníkovi, DrSc.	18
Holub A.: Profesor MVDr. et dr. h. c. mult. František (Frank) Král v Bulharsku a v USA	28

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA ● Vydává Ústav zemědělských a potravinářských informací ● Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38 ● Sazba: Studio DOMINO – ing. Jakub Černý, Bří. Nejedlý 245, 266 01 Beroun, tel.: 0311/229 59 ● Tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1997

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