

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

3

VOLUME 42 (LXIX)
PRAHA
MARCH 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., Reinfeld, 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 Hofírek, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic
Prof. MuDr. Drahomír Horký, 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 Věžník, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Editor-in-Chief – Vedoucí redaktorka

Ing. Zdeňka Radošová

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

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

Periodicita: Časopis vychází měsíčně (12x ročně), ročník 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: Agri, CAB Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

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

AMINO ACID UPTAKE BY THE SHEEP RUMEN EPITHELIUM

ZADRŽANIE AMÍNOKYSELINY V BACHOROVOM EPITELI OVIEC

Z. Faixová, J. Várady

University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: By the modification of the methods which are used for determination of amino acid uptake in the mammary gland and in the small intestine the uptake of ^{14}C -lysine was measured in two parts of the sheep rumen epithelium *in vitro*. Three various lysine concentrations were used (0.95; 4.95 and 9.95 mM/l). Duration of the incubation was 15, 30 or 60 minutes. Comparison of the lysine distribution ratios as depending upon the duration of incubation period in the dorsal rumen sac at 9.95 mM/l concentration revealed significant differences between at the 15min and 60min incubation (0.952 ± 0.089 vs 1.931 ± 0.108 ; $P < 0.05$, respectively) and between 30min and 60min incubation (1.165 ± 0.138 vs 1.931 ± 0.108 , $P < 0.05$, respectively) – Fig. 1. Comparison of the lysine distribution ratios as depending upon the duration of incubation period in the ventral rumen sac at 4.95 mM/l concentration revealed significant differences between the incubations of 15 and 30 min (1.182 ± 0.131 vs 1.742 ± 0.113 ; $P < 0.05$, respectively) and between the incubations of 15 and 60 min (1.182 ± 0.131 vs 2.10 ± 0.204 ; $P < 0.05$, respectively) – Fig. 2. Comparison of the lysine distribution ratios in both the dorsal and ventral sac as depending upon the duration of incubation period after 15min incubation revealed a significant difference at the 4.95 mM/l concentration 1.619 ± 0.078 vs 1.182 ± 0.131 ; $P < 0.05$, respectively) – Fig. 3. Our results showed that the lysine uptake in the dorsal and ventral sheep rumen epithelium is dependent on the incubation duration only under certain concentrations of lysine. Differences in absorption of lysine between dorsal and ventral rumen epithelium are not mostly significant.

sheep; rumen; rumen epithelium; amino acid; lysine; uptake

ABSTRAKT: Modifikáciou metód, podľa ktorých sa stanovuje množstvo zadržaných aminokyselín značených ^{14}C v mliečnej žľaze a v tenkom čreve hovädzieho dobytku, bolo merané zadržanie ^{14}C -lyzínu v epiteli dorzálneho a ventrálneho bachorového vaku *in vitro*. V pokuse boli použité tri rôzne koncentrácie lyzínu (0,95; 4,95 a 9,95 mmol/l). Inkubácia trvala 15, 30 alebo 60 minút. Porovnávaním distribučných absorpčných pomerov lyzínu v dorzálnom bachorovom vaku v závislosti od dĺžky inkubácie sme zistili pri koncentrácii 9,95 mmol/l signifikantné rozdiely medzi inkubáciou v dĺžke 15 a 60 min ($0,952 \pm 0,089$ oproti $1,931 \pm 0,108$; $P < 0,05$) a medzi inkubáciou v dĺžke 30 a 60 min ($1,165 \pm 0,138$ oproti $1,931 \pm 0,108$; $P < 0,05$). Porovnávaním distribučných absorpčných pomerov lyzínu vo ventrálnom bachorovom vaku v závislosti od dĺžky inkubácie sme zistili pri koncentrácii 4,95 mmol/l signifikantné rozdiely medzi inkubáciou v dĺžke 15 a 30 min ($1,182 \pm 0,131$ oproti $1,742 \pm 0,113$; $P < 0,05$) a medzi inkubáciou v dĺžke 15 a 60 min ($1,182 \pm 0,131$ oproti $2,10 \pm 0,204$; $P < 0,05$). Porovnávaním distribučných absorpčných pomerov lyzínu v dorzálnom a ventrálnom bachorovom vaku v závislosti od dĺžky inkubácie sme zistili signifikantné rozdiely po 15 min inkubácie pri koncentrácii 4,95 mmol/l ($1,619 \pm 0,078$ oproti $1,182 \pm 0,131$; $P < 0,05$). Výsledky pokusov ukázali, že množstvo zadržaného lyzínu v epiteli dorzálneho a ventrálneho bachora oviec je závislé od dĺžky inkubácie len pri určitých koncentráciách. Rozdiely v množstve zadržaného lyzínu v dorzálnom a ventrálnom bachorovom vaku boli vo väčšine prípadov nesignifikantné.

ovca; bachor; bachorový epitel; aminokyselina; lyzín; zadržanie

ÚVOD

Bachorová stena zohráva významnú úlohu vo výmene dusíkatých metabolitov medzi krvou a bachorovým obsahom (Várady a i., 1973).

V bachore prebieha intenzívna degradácia proteínov na peptidy a aminokyseliny. Nedegradované voľné aminokyseliny môžu byť substrátom pre mikrobiálnu proteosyntézu, alebo môžu byť pasážované do nižších častí zažívacieho aparátu a resorbovať sa z čreva do krvi. Malé množstvo aminokyselín môže prestupovať do krvi už cez

stenu bachora (Hoover a Miller, 1991). Bachorová stena je pre aminokyseliny obojstranne priepustná.

Na sledovanie prestupu aminokyselín cez stenu bachora sa používajú rôzne metódy. Leibholz (1971) inkubovala zmes aminokyselín vo vypláchnutom bachore oviec *in vivo* a sledovala ich úbytok z bachora pri rôznych koncentráciách. Autorka zistila, že v procese prestupu aminokyselín cez bachorovú stenu vznikajú interakcie medzi aminokyselinami a že jednotlivé aminokyseliny majú rôzny vplyv na prestup ďalších aminokyselín.

Kompetitívne vzťahy medzi aminokyselinami počas ich prestupu cez bachorový epitel zistili aj Faixová a Várady (1994). Leng a i. (1978) študovali resorpciu a zastúpenie aminokyselín z bachora do krvi metódou extrakorporálnej perfúzie bachora pri nízkej hladine α -aminodusika v bachore a po pridaní enzýmového hydrolyzáta kazeínu. Zistili, že resorpcia aminokyselín z bachora prebieha aj pri nízkej hladine voľných aminokyselín v bachorovom obsahu a že existuje určitá selekcia vo vstrebávaní v závislosti od koncentrácie α -aminodusika v bachorovom obsahu.

Modifikáciu metód, ktoré sa používajú na stanovenie množstva zadržaných aminokyselín v mliečnej žľaze (Baumrucker, 1984) a v tenkom čreve (Guerino a Baumrucker, 1987) sme našli metódu vhodnú na stanovenie množstva ^{14}C -lyzínu zadržaného v bachorovom epiteli.

Cieľom našej práce bolo stanoviť množstvo lyzínu zadržaného v dvoch morfológicky odlišných častiach bachora v závislosti od koncentrácie a dĺžky inkubácie.

MATERIÁL A METÓDY

V experimentoch sme použili tri ovce plemena slovenské merino s priemernou hmotnosťou 40 až 45 kg. Dietetické zloženie krmnej dávky: sušina 1252,6 g, stráviteľné dusikaté látky 25,9 g a škrobové jednotky 0,522. Zvieratá mali voľný prístup k vode.

Použité chemikálie:

L- $^{14}\text{C}(\text{U})$ -lyzín (Du Pont), špecifická aktivita 326,4 mCi/g
[Carboxyl- ^{14}C] - inulín (Du Pont), špecifická aktivita 1,8 mCi/g

L-lyzín. HCl (Serva), p. a., kyselina chloristá (Merck), Brayov kvapalný scintilačný roztok, ostatné chemikálie (Lachema), p. a.

Po usmrtení zvierat *i. v.* podaním pentobarbitalu sme z brušnej dutiny vybrali bachor a odstránili bachorový obsah. Z dorzálného aj ventrálného bachorového vaku sme nastrihali po tri kusy, stiahli z nich svalovú vrstvu a na vlastný pokus sme použili bachorový epitel s podsliznicovým väzivom s hmotnosťou od 200 do 400 mg.

Každý kusok bachorového epitelu sme vložili do samostatnej Erlenmeyerovej banky s obsahom 25 ml, ktorá obsahovala 4,7 ml Krebs-Ringerovho bikarbonátového pufru (KRB pufer). Bachorový epitel v KRB pufrí sme predinkubovali vo vodnom kúpeli pri teplote 37 °C po dobu 20 minút. Vlastná inkubácia sa začala po pridaní 0,3 ml KRB pufru s lyzínom a ^{14}C -lyzínom (0,0166 $\mu\text{Ci/ml}$). Výsledná koncentrácia lyzínu bola 0,95, 4,95 alebo 9,95 mmol/l. Vlastná inkubácia trvala 15, 30 alebo 60 minút.

Po inkubácii sme kusky bachorového epitelu vybrali z Erlenmeyerových baniek, osušili, odvážili a vložili do skúmaviek s 5 ml studenej 3% kyseliny chloristej. Kusky bachorového epitelu v 3% kyseline chloristej sme homogenizovali na homogenizátore (OMNI mixér,

Du Pont) pri 16 000 otáčkach/min a centrifugovali 20 min pri otáčkach 1 800 g (Janetzki T 24D). 1 ml supernatantu a 1 ml inkubačného média po inkubácii sme pridali ku 5 ml scintilačného roztoku a použili na meranie ^{14}C rádioaktivity.

Extracelulárny priestor v kúskoch bachorového epitelu sme stanovili v paralelných experimentoch so ^{14}C -karboxylinulínom (Pocius a Baumrucker, 1980).

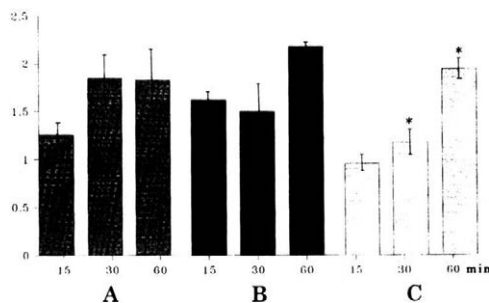
Sušina bachorového epitelu bola stanovená sušením tkaniva pri 105 °C počas 48 hodín.

Množstvo zadržaného lyzínu v bachorovom epiteli bolo vypočítané podľa autorov Pocius a Baumrucker (1980), ktorí merali zadržanie aminokyselín v kúskoch mliečnej žľazy kráv. Množstvo zadržaného lyzínu v bachorovom epiteli vyjadruje koncentráciu lyzínu v bunkovej vode po inkubácii. Výsledné množstvo zadržaného lyzínu sme použili na výpočet distribučného absorpčného pomeru (pomer koncentrácie lyzínu v bunkách bachorového epitelu ku koncentrácii lyzínu v médiu po inkubácii) – Auricchio a Rubino (1974).

Výsledky sú vyjadrené ako aritmetický priemer $\pm$ stredná chyba priemeru (SEM). Štatistická významnosť sa stanovila párovým Studentovým *t*-testom.

VÝSLEDKY

Signifikantné rozdiely v množstve zadržaného lyzínu v závislosti od dĺžky inkubácie v dorzálnom bachorovom vaku sme zistili medzi 15- a 60-minútovou inkubáciou a medzi 30- a 60-minútovou inkubáciou pri koncentrácii 9,95 mmol/l. Pri koncentráciách lyzínu 0,95 a 4,95 mmol/l sa množstvo zadržaného lyzínu nemilo nesignifikantne (obr. 1, tab. I).



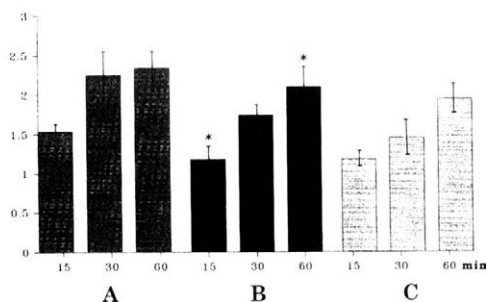
I. Množstvo lyzínu zadržaného v epiteli dorzálného bachorového vaku v závislosti od dĺžky inkubácie ($n = 9$, priemer $\pm$ SEM, * $P < 0,05$) – Lysine uptake in the epithelium of the dorsal rumen sac in relation to incubation period ($n = 9$, mean $\pm$ SEM, * $P < 0,05$)

Legenda – Legend:

os x = dĺžka inkubácie (min) – x -axis = incubation period (min)

os y = distribučný absorpčný pomer lyzínu – y -axis = lysine distribution ratio

koncentrácia lyzínu (mmol/l) – lysine concentration (mmol/l): A = 0,95, B = 4,95, C = 9,95



2. Množstvo lyzínu zadržaného v epiteli ventrálneho bacherového vaku v závislosti od dĺžky inkubácie ($n = 9$, priemer $\pm$ SEM, * $P < 0,05$) – Lysine uptake in the epithelium of the ventral rumen sac in relation to incubation period ($n = 9$, mean $\pm$ SEM, * $P < 0,05$)

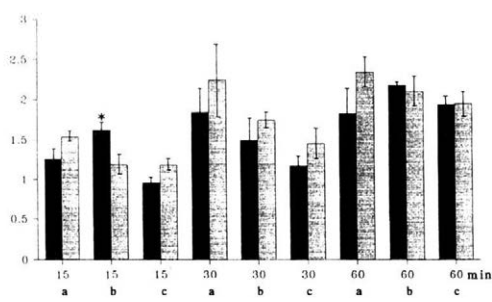
Legenda – Legend: Pozri obr. 1 – See Fig. 1

Množstvo zadržaného lyzínu vo vetrálnom bacherovom vaku v závislosti od dĺžky inkubácie sa signifikantne menilo medzi 15- a 30-minútovou inkubáciou a medzi 15- a 60-minútovou inkubáciou pri koncentrácii 4,95 mmol/l. Pri koncentráciách 0,95 a 4,95 mmol/l sa množstvo zadržaného lyzínu menilo štatisticky nevýznamne (obr. 2, tab. II).

Množstvo zadržaného lyzínu v dorzálnom a ventrálnom bacherovom vaku v závislosti od dĺžky inkubácie sa signifikantne menilo po 15-minútovej inkubácii pri koncentrácii lyzínu 4,95 mmol/l. Po 30- a 60-minútovej inkubácii a pri koncentráciách lyzínu 0,95 a 9,95 mmol/l sa množstvo zadržaného lyzínu menilo štatisticky nevýznamne (obr. 3, tab. III).

Priemerná hodnota tkanivovej vody v dorzálnom bacherovom vaku bola $85,0 \pm 0,5$ % hmotnosti tkaniva s individuálnymi krajnými hodnotami 82,5 a 86,3 %. Vo ventrálnom bacherovom vaku sme namerali priemernú hodnotu tkanivovej vody $83,6 \pm 0,2$ % hmotnosti tkaniva s individuálnymi krajnými hodnotami 82,8 % a 84,6 %.

Extracelulárny priestor zistený pomocou ^{14}C -karboxylinulínu pre dorzálny bacherový vak bol $52,93 \pm$



3. Množstvo lyzínu zadržaného v epiteli dorzálného a ventrálneho bacherového vaku v závislosti od koncentrácie lyzínu ($n = 9$, priemer $\pm$ SEM, * $P < 0,05$) – Lysine uptake in the epithelium of the dorsal and ventral rumen sacs in relation to lysine concentration ($n = 9$, mean $\pm$ SEM, * $P < 0,05$)

Legenda – Legend:

os x = koncentrácia lyzínu (mmol/l) – x-axis = lysine concentration (mmol/l)

y = distribučný absorpčný pomer lyzínu – y-axis = lysine distribution ratio

koncentrácie lyzínu (mmol/l) – lysine concentrations (mmol/l) a = 0,95, b = 4,95, c = 9,95

■ dorzálny bacherový vak – dorsal rumen sac

▨ ventrálny bacherový vak – ventral rumen sac

0,13 % s individuálnymi krajnými hodnotami 48,25 a 65,84 % a pre ventrálny bacherový vak $50,24 \pm 0,47$ % s individuálnymi krajnými hodnotami 45,80 a 70,05 %.

DISKUSIA

Na základe dosiahnutých výsledkov je zjavné, že množstvo lyzínu zadržaného v epiteli dorzálného a ventrálneho vaku je závislé od dĺžky inkubácie len pri určitej koncentrácii. Podobné výsledky sme dosiahli meraním množstva zadržaného lyzínu vo ventrálnom bacherovom vaku. Rozdiely v množstve zadržaného lyzínu v dorzálnom a ventrálnom bacherovom vaku boli vo väčšine prípadov nesignifikantné.

I. Zadržanie lyzínu v dorzálnom bacherovom vaku – Lysine uptake in the dorsal rumen sac

Koncentrácia lyzínu ¹ (mmol/l)	Inkubácia ² (min)	Distribučný pomer lyzínu (priemer $\pm$ SEM) ³	Štatistická významnosť ⁴	
0,95	15	1,255 $\pm$ 0,127	15 vs 30 min	n.s.
	30	1,846 $\pm$ 0,273	15 vs 60 min	n.s.
	60	1,828 $\pm$ 0,328	30 vs 60 min	n.s.
4,95	15	1,619 $\pm$ 0,078	15 vs 30 min	n.s.
	30	1,490 $\pm$ 0,278	15 vs 60 min	n.s.
	60	2,177 $\pm$ 0,049	30 vs 60 min	n.s.
9,95	15	0,952 $\pm$ 0,089	15 vs 30 min	n.s.
	30	1,165 $\pm$ 0,138	15 vs 60 min	$P < 0,05$
	60	1,931 $\pm$ 0,108	30 vs 60 min	$P < 0,05$

¹lysine concentration, ²duration of incubation period, ³distribution ratio of lysine (mean $\pm$ SEM), ⁴significance

II. Zadržanie lyzinu vo ventrálnom bachorovom vaku – Lysine uptake in the ventral rumen sac

Koncentrácia lyzinu ¹ (mmol/l)	Inkubácia ² (min)	Distribučný pomer lyzinu (priemer ± SEM) ³	Štatistická významnosť ⁴	
0,95	15	1,536 ± 0,085	15 vs 30 min	n.s.
	30	2,247 ± 0,895	15 vs 60 min	n.s.
	60	2,338 ± 0,185	30 vs 60 min	n.s.
4,95	15	1,182 ± 0,131	15 vs 30 min	<i>P</i> < 0,05
	30	1,742 ± 0,113	15 vs 60 min	<i>P</i> < 0,05
	60	2,10 ± 0,020	30 vs 60 min	n.s.
9,95	15	1,182 ± 0,089	15 vs 30 min	n.s.
	30	1,449 ± 0,206	15 vs 60 min	n.s.
	60	1,942 ± 0,169	30 vs 60 min	n.s.

For 1–4 see Tab. I

III. Zadržanie lyzinu v dorzálnom a ventrálnom bachorovom vaku – Lysine uptake in the dorsal and ventral rumen sac

Inkubácia ¹ (min)	Koncentrácia lyzinu ² (mmol/l)	Distribučný pomer lyzinu (priemer ± SEM) ³	Štatistická významnosť ⁴
15	0,95	DBV ⁵ 1,255 ± 0,127	n.s.
		VBV ⁶ 1,536 ± 0,085	
	4,95	DBV 1,619 ± 0,078	<i>P</i> < 0,05
		VBV 1,182 ± 0,131	
	9,95	DBV 0,952 ± 0,089	n.s.
		VBV 1,182 ± 0,089	
30	0,95	DBV 2,247 ± 0,089	n.s.
		VBV 1,846 ± 0,273	
	4,95	DBV 1,490 ± 0,278	n.s.
		VBV 1,742 ± 0,113	
	9,95	DBV 1,165 ± 0,138	n.s.
		VBV 1,449 ± 0,206	
60	0,95	DBV 1,828 ± 0,328	n.s.
		VBV 2,338 ± 0,185	
	4,95	DBV 2,177 ± 0,049	n.s.
		VBV 2,10 ± 0,204	
	9,95	DBV 1,931 ± 0,108	n.s.
		VBV 1,942 ± 0,169	

¹duration of incubation period, ²lysine concentration, ³distribution ratio of lysine (mean ± SEM), ⁴significance, ⁵dorsal rumen sac, ⁶ventral rumen sac

Bachor prežúvavcov je orgán s veľkou resorpčnou kapacitou. Sliznica bachora je pokrytá klkami, ktoré zvyšujú resorpčnú plochu bachora. Bachor je schopný vstrebávať konečné produkty trávenia (Dominique a i., 1991; Feješ a i., 1991), vodu (Holtenius a Dahlborn, 1990), elektrolyty (Höller a i., 1988; Martens a Gaebel, 1988; Gaebel a i., 1989) a mnohé ďalšie zlúčeniny (Hichcliff a i., 1991).

Veľkosť a usporiadanie klkov sa v jednotlivých častiach bachora líši. Najhustejšie a najdlhšie sú vo ventrálnom bachorovom vaku, kým v dorzálnom bachorovom vaku sú malé a riedke. Aafjes (1971) zistil, že časti bachorovej steny s vyšším počtom papil absorbo-

vali viac únikavých mastných kyselín ako časti s riedkymi papilami.

Schopnosť bachorového epitelu absorbovať lyzín je ohraničená. Výsledky viacerých autorov naznačujú, že absorpcia lyzinu v jednotlivých tkanivách je rozdielna.

Baumrucker (1984) nameral v preparátoch mliečnej žľazy hovädzieho dobytká po 60-minútovej inkubácii pre koncentráciu lyzinu 0,1 mmol/l distribučný absorpčný pomer 9,39. Guerino a Baumrucker (1987) dosiahli pre koncentráciu lyzinu 0,1 mmol/l po 60-minútovej inkubácii distribučný absorpčný pomer 2,47 v intestinálnom tkanive hovädzieho dobytká. Podobné výsledky s absorpciou lyzinu zistili Hagihira a i. (1961) v tenkom čreve chrčka a Munc

a Schultz (1969) u zajaca. V našich pokusoch s epitelom dorzálneho a ventrálneho bachorového vaku sme namerali pri koncentrácii lyzínu 0,95 mmol/l po 60-minútovej inkubácii distribučný absorpčný pomer pre lyzín 1,82 v dorzálnom a 2,33 vo ventrálnom bachorovom vaku.

Podľa autorov Munck a Schultz (1969) nie je nízka transportná kapacita intestinálneho tkaniva pre lyzín spôsobená rýchlosťou, akou lyzín prestupuje cez kefkový lem pomocou transportných systémov, ale je zapríčinená nízkou schopnosťou lyzínu prestupovať cez bazolaterálnu membránu.

Výsledky pokusov ukázali, že množstvo zadržaného lyzínu v epiteli bachora oviec je závislé od dĺžky inkubácie len pri vymedzených koncentráciách a že schopnosť dorzálneho a ventrálneho bachorového vaku zadržiavať lyzín je skoro rovnaká.

LITERATÚRA

AAFJES, J. H. (1971): Digestive physiology. In: CHURH, H. C. (ed.): Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants. 2nd ed. Corvallis, O. S. U. Book Stores, Inc., p. 127.

AURICCHIO, S. – RUBINO, A. (1974): Intestinal mucosa. In: CURTIUS, H. C. – ROTH, M. (eds.): Clinical Biochemistry, Principles and methods. 1st ed. Berlin, Walter de Gruyter and Co., pp. 1271–1276.

BAUMRUCKER, C. R. (1984): Cationic amino acid transport by bovine mammary tissue. J. Dairy Sci., 67, 2500–2505.

DOMINQUE, B. M. F. – DELLOW, D. W. – WILSON, P. R. – BARRY, T. N. (1991): Nitrogen metabolism, rumen fermentation, and water absorption in red deer, goats and sheep. N. Z. J. Agric. Res., 34, 391–400.

FAIXOVÁ, Z. – VÁRADY, J. (1994): Prestup aminokyselín cez bachorový epitel oviec: interakcie medzi leucínom a lyzínom. Vet. Med. – Czech, 39, 255–262.

FEJEŠ, J. – FAIXOVÁ, Z. – VÁRADY, J. – CIBULA, M. (1991): Prestup aminokyselín cez bachorovú sliznicu oviec *in vitro*. Vet. Med. – Czech, 36, 551–560.

GAEBEL, G. – BELL, M. – MARTENS, H. (1989): The effect of low mucosal pH on sodium and chloride movement

across the isolated rumen mucosa of sheep. Quart. J. Exp. Physiol., 74, 35–44.

GUERINO, F. – BAUMRUCKER, C. R. (1987): Identification of methionine and lysine transport systems in cattle small intestine. J. Anim. Sci., 65, 630–640.

HAGIHARA, H. – LINN, E. C. C. – SAMY, A. H. – WILSON, T. H. (1961): Active transport of lysine, ornithine, arginine and cystine by the intestine. Biochem. Biophys. Res. Comm., 4, 478–484.

HINCHICLIFF, K. W. – JERNIGAN, A. D. – UPSON, D. W. – CONSTABLE, P. D. (1991): Ruminant pharmacology. Vet. Clin. N. Amer. – Food Anim. Pr., 7, 633–649.

HÖLLER, H. – BREVES, G. – KOCABATMAZ, M. – GERDES, H. (1988): Flux of calcium across the sheep rumen wall *in vivo* and *in vitro*. Quart. J. Exp. Physiol., 73, 609–618.

HOLTENIUS, K. – DAHLBORN, K. (1990): Water and sodium movements across the ruminal epithelium in fed and food-deprived sheep. Exp. Physiol., 75, 57–67.

HOOVER, W. H. – MILLER, T. K. (1991): Rumen digestive physiology and microbial ecology. Vet. Clin. N. Amer. – Food Anim. Pr., 7, 311–325.

LEIBHOLZ, J. (1971): The absorption of amino acids from the rumen of the sheep. I. The loss of amino acids from solutions placed in the washed rumen *in vivo*. Austral. J. Agric. Res., 22, 639–645.

LENG, L. – TOMÁŠ, J. – BAJO, M. – SZÁNYIOVÁ, M. (1978): Resorpcia aminokyselín z perfundovaného bachora oviec. Veter. Med. (Praha), 23, 337–345.

MARTENS, H. – GAEBEL, G. (1988): Transport of Na a Cl across the epithelium of ruminant forestomachs: rumen and omasum. A review. Comp. Biochem. Physiol., 90A, 569–575.

MUNCK, B. G. – SCHULTZ, S. G. (1969): Lysine transport across isolated rabbit ileum. J. Gen. Physiol., 53, 157–163.

POCIUS, P. A. – BAUMRUCKER, C. R. (1980): Amino acid uptake by bovine mammary slides. J. Dairy Sci., 63, 746–749.

VÁRADY, J. – BOĐA, K. – BAJO, M. – SZÁNYIOVÁ, M. – TOMÁŠ, J. (1973): Výmenné procesy dusíka medzi krvou a bachorovým obsahom u oviec pred a po kŕmení. Veter. Med. (Praha), 18, 417–424.

Received: 96–04–03

Accepted after corrections: 96–10–03

Kontaktná adresa:

MVDr. Zita Faixová CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/633 21 11–15, e-mail: faixova@vsvnov.uvm

ÚSTŘEDNÍ ZEMĚDĚLSKÁ A LESNICKÁ KNIHOVNA, PRAHA 2, SLEZSKÁ 7

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

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

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

Knihovna poskytuje svým uživatelům následující služby:

Výpůjční služby

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

Reprografické služby

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

Služby z automatizovaného systému firemní literatury

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

Referenční služby

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

Půjčování videokazet

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

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

Adresa knihovny:

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna
Slezská 7
120 56 Praha 2

Výpůjční doba:

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

Telefonické informace:

vedoucí:	24 25 50 74, e-mail: IHOCH@uzpi.agrec.cz
referenční služby:	24 25 79 39/linka 520
časopisy:	24 25 66 10
výpůjční služby:	24 25 79 39/linka 415
meziknihovní výpůjční služby:	24 25 79 39/linka 304
Fax:	24 25 39 38
E-mail:	ÚZLK@uzpi.agrec.cz

CONTROL OF GASTROINTESTINAL HELMINTH INFECTIONS IN LAMB PASTURE REARING*

TLUMENÍ GASTROINTESTINÁLNÍCH HELMINTÓZ PŘI PASTEVNÍM ODCHOVU JEHŇAT

K. Chroust

*University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine,
Brno, Czech Republic*

ABSTRACT: Two sheep herds kept in different geographic conditions with spring lambing by the end of March and April (herd No. 1: 400 ewes, 600 metres above sea level; herd No. 2: 450 ewes, 300 metres above sea level) were examined. The dynamics of gastrointestinal nematode and *Moniezia* spp. cestode egg counts in samples taken regularly every 4 to 5 weeks was studied during the year 1995 with the intention to verify the system of effective control of these helminth infections under pasture conditions of lamb rearing. In ewes a significant rise in gastrointestinal nematode egg counts was proved during the lambing season, „spring rise phenomenon“, and during the summer pasture until autumn months with maximum EPG values reaching 150 (Figs. 1 and 2). In lambs that started grazing at 1 to 4 weeks of age, the excretion steeply rose to maximum EPG values 350 and 290, respectively, after 4 to 5 weeks of grazing (Figs. 1 and 2). In order to control these rising infections, ewes were treated with antihelminthic albendazol by the end of February (herd No. 1) and in March (herd No. 2) and lambs during the first or third decade of July. This anthelmintic treatment significantly lowered egg excretion to EPG values lower than 30 in ewes and 50 or 60, respectively, in lambs. Later, during the summer and autumn months, a mild rise of egg counts was found in lambs. These maxima were liquidated anthelmintic treatment in both herds in late autumn months and it also lowered helminth infections to minimum during winter months (EPG values lower than 50). The excretion of *Moniezia* spp. eggs had the same dynamics as that gastrointestinal nematodes. Values of lamb infection prevalence reached 21% in herd No. 1 and 29% in herd No. 2. Anthelmintic treatment during July controlled cestode findings in lambs. Albendazol (Vermidan susp. 2.5%), dosed 5 mg/kg of body weight, proved highly effective in the control of gastrointestinal nematodes and *Moniezia* spp. cestodes.

ewes; lambs; gastrointestinal nematodes; *Moniezia* spp.; anthelmintic treatment; albendazol

ABSTRAKT: Vyšetřování byla prováděna ve dvou stádech ovcí chovaných v rozdílných geografických podmínkách s jarním bahněním koncem března a v dubnu (stádo č. 1: 400 bahnic, 600 m n.m.; stádo č. 2: 450 bahnic, 300 m n.m.). V průběhu roku 1995 byla sledována dynamika vylučování vajíček gastrointestinálních nematodů (GIN) a tasemnic rodu *Moniezia* ze vzorků trusu odebíraných ve čtyř- až pětítýdenních intervalech s cílem ověřit systém účinného tlumení těchto helmintóz v podmínkách pastevního odchovu jehňat. U bahnic byl prokázán výrazný vzestup vylučování vajíček gastrointestinálních nematodů v období souvisejícím s bahněním („spring rise phenomenon“) a dále postupně v průběhu letní pastvy až do podzimních měsíců (EPG max. 150). U jehňat docházelo k prudkému narůstání vylučovaných vajíček již po čtyřech až pěti týdnech pastvy až na hodnoty EPG 350 ve stádě č. 1 a 290 ve stádě č. 2. Za účelem ztlumení těchto maxim infekce byla provedena dehelmintizace ve stádě č. 1 u bahnic koncem února a u jehňat v první dekádě července a ve stádě č. 2 u bahnic v březnu a u jehňat ve třetí dekádě července. Tato dehelmintizace výrazně snížila hodnoty EPG (méně než 30 u bahnic a 50 resp. 60 u jehňat). Opětovný, avšak již mírnější nárůst infekce po dehelmintizaci byl pozorován u jehňat v dalších letních a podzimních měsících. Tento vzestup byl likvidován v obou stádech dehelmintizací provedenou u jehňat i bahnic v pozdních podzimních měsících a tím bylo zajištěno minimální promoření v průběhu zimního ustájení. Byla prokázána vysoká účinnost albendazolu (Vermidan susp. 2.5%) v dávce 5 mg/kg živé hmotnosti. Shodný průběh mělo i vylučování vajíček resp. článků *Moniezia* spp., kde u jehňat dosáhly hodnoty prevalence 21 % resp. 29 %. Provedené dehelmintizace albendazolem zcela utlumily nálezy tasemnic u jehňat i bahnic.

bahnice; jehňata; gastrointestinální nematodi; *Moniezia* spp.; dehelmintizace; albendazol

* Supported by the Grant Agency of Czech Republic (Grant No. 508/94/1351).

Po vzniku nových ekonomických podmínek od začátku 90. let prodělává chov ovcí v České republice vážnou krizi, která vyžaduje podstatné změny v technologii odchovu zaměřené zejména na minimalizaci nákladů na chov a produkci jehněčího masa. Dosavadní systém chovu ovcí v podmínkách zimního bahnění (v prosinci a lednu) a odchov jehňat v ovčinech do věku tří až čtyř měsíců byl výrazně nerentabilní a vyžadoval vysoké dotace státu. Uplatnění metodiky pastevního odchovu s posunem bahnění ovcí do jarních měsíců (konec března a duben) umožňuje při permanentním pobytu zvířat na pastvě úsporu zejména jader-
ných krmiv. Výživa jehňat je zajišťována pouze mateřským mlékem a pastevními porosty a je oproti tradičnímu způsobu odchovu výrazně rentabilnější (Skřivánek aj., 1991). Způsob pastevního odchovu jehňat však vyžaduje i nové postupy při tlumení parazitóz zvláště u jehňat vzhledem ke skutečnosti, že jehňata jsou při společném pobytu s matkami na pastvě vystavena parazitární infekci prakticky již od prvních dnů života.

Cílem práce bylo ověřit systém účinného tlumení helmintóz v podmínkách pastevního odchovu jehňat. Tato práce vychází rovněž z výsledků podrobného sledování dynamiky gastrointestinálních helmintóz při rozdílných technologiích odchovu jehňat získaných v roce 1994 (Chroust, 1995).

MATERIÁL A METODA

Vyšetřování byla prováděna v průběhu roku 1995 ve dvou stádech ovcí v rozdílných geografických podmínkách: stádo č. 1 o počtu 400 bahnic v oblasti Českomoravské vysočiny (asi 600 m n.m.) a stádo č. 2 v oblasti severní Moravy (asi 300 m n.m.). Bahnění v těchto stádech probíhalo od konce března do začátku května, s maximem porodů v prvních dvou dekadách dubna. Věk jehňat při zahájení pastvy se pohyboval od jednoho do maximálně čtyř týdnů a hmotnost od 6 do 12 kg.

Obě stáda byla v průběhu celého roku pravidelně parazitologicky sledována. Vzorky trusu byly odebírány v pravidelných časových intervalech čtyř, maximálně pěti týdnů v množství 15 % od bahnic a roků a 20 % od jehňat. Vyšetřování vzorků bylo prováděno individuálně, a to metodou flotační, larvoskopickou a sedimentační. Počet vajíček gastrointestinálních nematodů (EPG) byl stanoven pomocí McMaster počítačích komůrek v modifikaci podle Chrousta (1970). Kultivace infekčních larev (La III) gastrointestinálních nematodů za účelem detailní rodové, resp. druhové determinace byla prováděna ze společných vzorků trusu podle metodiky Chrousta a Hulínské (1971), determinace infekčních larev podle klíče Hulínské (1969).

Jako podklad pro plánování a realizaci dehelmintizace byly brány výsledky sledování dynamiky vylučo-

vání vajíček gastrointestinálních helmintóz v průběhu zimního ustájení a pastevní sezony. K dehelmintizaci byl použit albendazol v dávce 5 mg/kg ž.h. (Vermitan susp. 2,5%-Sanofi). Cílem aplikace anthelmintika bylo tlumení maxim infekce se zaměřením na gastrointestinální nematodózy (GIN) a tasemnice *Moniezia* spp.

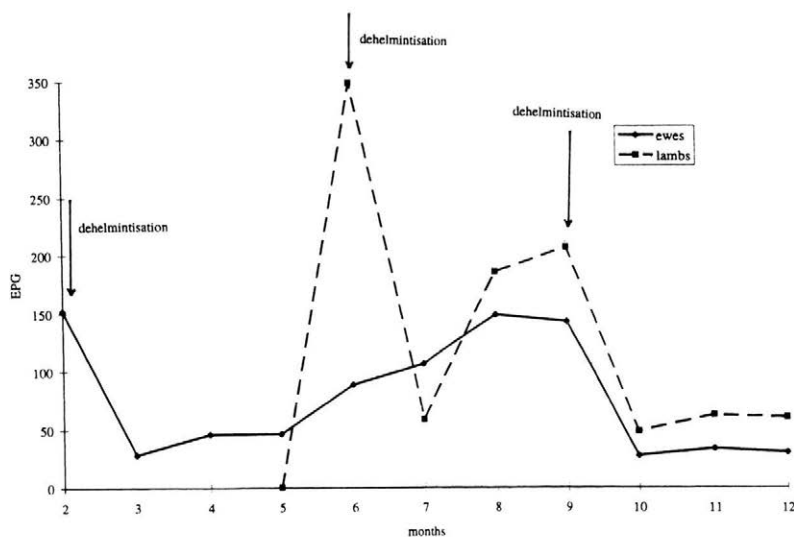
VÝSLEDKY

Výsledky vyšetřování obou stád metodou sedimentační na přítomnost vajíček motolic a metodou larvoskopickou na larvy plicnívek byly po celou dobu pokusů negativní.

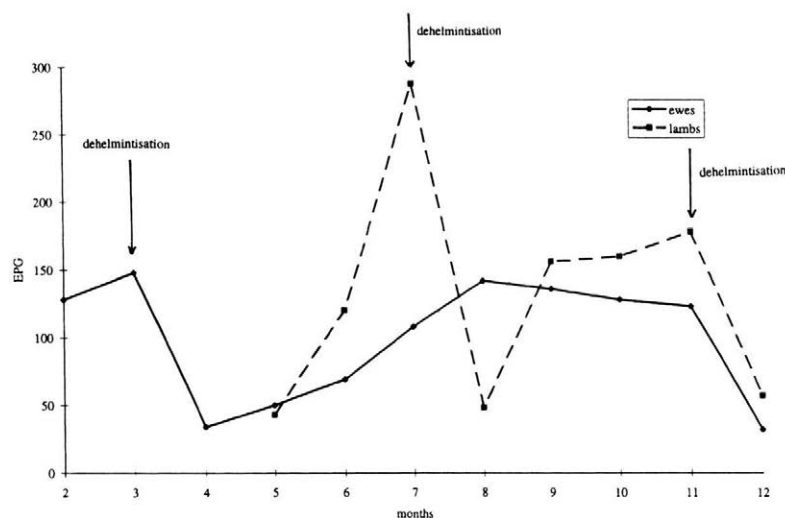
Výsledky vyšetřování na hlístice gastrointestinálního traktu v průběhu roku 1995 jsou znázorněny na obr. 1 a 2. V grafech jsou šipkou vyznačeny termíny dehelmintizace albendazolem. Dehelmintizace bahnic byla provedena ve stádě č. 1 koncem února a ve stádě č. 2 ve druhé dekádě března. Účelem dehelmintizace bylo odstranění hypobiotických stadií nematodů a zmírnění průběhu tzv. „spring rise fenomenu“, tj. jarního vzestupu vylučování vajíček GIN, které má úzkou souvislost s březostí a bahněním ovcí a je příčinou rychlého a silného promořování pastvin. Tato dehelmintizace měla poměrně vysokou účinnost a snížila vylučování vajíček GIN na hodnoty nižší než EPG 50. Období bahnění v těchto stádech probíhalo již za podmínek minimálního vylučování vajíček GIN i tasemnic. V průběhu pastvy pak vylučování vajíček GIN u bahnic opět postupně narůstalo až na hodnoty EPG 150 v letních měsících. Jejich výrazné snížení se projevilo po podzimním odčervení provedeném ve stádě č. 1 začátkem října a ve stádě č. 2 začátkem listopadu. Nízké hodnoty EPG se pak udržovaly do konce sledovaného období.

Dynamika infekce GIN u jehňat měla v obou stádech velmi prudký nárůst EPG již po čtyřech až pěti týdnech pastvy a dále v průběhu června a července. Dehelmintizace byla proto provedena v chovu č. 1 v první a v chovu č. 2 začátkem třetí dekády července, věk jehňat se pohyboval od 8 do 12 měsíců. Dehelmintizace výrazně snížila maximum infekce, které pokleslo z průměrných hodnot EPG 350 ve stádě č. 1 a 290 ve stádě č. 2 na hodnoty EPG 60 resp. 50. Opětovný, avšak již mírnější nárůst infekce byl pozorován v dalších letních i podzimních měsících, ten však již dosahoval nižších hodnot (EPG 210 resp. 180). Další dehelmintizace v podzimních měsících snížila vylučování vajíček u jehňat na EPG méně než 60.

V návaznosti na ovoskopická vyšetřování vzorků trusu bahnic a jehňat ukázala souběžně prováděná kultivace a determinace infekčních larev GIN (La III) na maximální zastoupení larev *Ostertagia* spp. (20 až 55 %), *Trichostrongylus* spp. (10 až 32 %), *Chabertia ovina* (10 až 30 %), *Oesophagostomum* spp. (4 až 22 %) a podstatně nižší nálezy u *Bunostomum trigonocephalum*, *Haemonchus contortus*, *Cooperia* spp. a *Strongyloides papillosus*. V obou stádech se v průběhu letní



1. Dynamika ovoskopických nálezů gastrointestinálních nematodů (EPG) u bahnic a jehňat ve stádě č. 1 – Dynamics of ovoscopic findings of gastrointestinal nematodes (EPG) in ewes and lambs in herd No. 1



2. Dynamika ovoskopických nálezů gastrointestinálních nematodů (EPG) u bahnic a jehňat ve stádě č. 2 – Dynamics of ovoscopic findings of gastrointestinal nematodes (EPG) in ewes and lambs in herd No. 2

pastvy prudce zvyšovala prevalence *Nematodirus* spp. až na 70 % u jehňat a až na 40 % u bahnic, ojedinělé nálezy byly zjištěny u *Trichocephalus ovis*.

Dynamika vylučování vajíček resp. článků tasemnic rodu *Moniezia* měla obdobný průběh jako u GIN. Od konce května se začínal ve vyšetřovaném trusu zvyšovat počet pozitivních nálezů vajíček *Moniezia* spp. u bahnic a v průběhu června i u jehňat. U jehňat narůstala prevalence velmi rychle, ve stádě č. 1 dosáhly hodnoty 21 % a 29 % ve stádě č. 2. Provedená dehelmintizace albendazolem v průběhu července utlumila nálezy tasemnic u bahnic i jehňat, které pak v průběhu letního období dosahovaly poměrně nízké prevalence (do 5 %).

DISKUSE

Pokusy prováděné v této práci potvrdily výsledky našich vyšetřování z roku 1994 (Chroust, 1995) a prokázaly, že vylučování vajíček GIN a tasemnic má v průběhu roku výrazně dynamický charakter. U bahnic je významným nálezem vzestup EPG v období souvisejícím s bahněním („spring rise phenomenon“), který se manifestuje zejména v průběhu března a v první polovině dubna. Tento jev je nutno považovat za velmi nebezpečný zdroj diseminace vajíček GIN a možnost infekce jehňat od prvních dnů po narození. Provedená dehelmintizace podstatně snížila vylučování vajíček a tím i možnost infekce jehňat. Nicméně křivka

dynamiky infekce GIN u jehňat se podstatně lišila od křivky u bahníků. Prudký nárůst počtu vylučovaných vajíček již po čtyřech až pěti týdnech pastvy potvrzuje značně vyšší vnímavost jehňat k infekci helminty. Tyto nálezy prokazují, že problematika gastrointestinálních helmintóz je v chovech ovcí s jarním bahněním velmi závažná a představuje značné riziko pro jehňata přicházející na pastvu, kde se v minulém roce pásly infikované ovce. K nejrychlejšímu nárůstu infekce docházelo v průběhu pastevního období u *Nematodirus* spp. u jehňat. Procentuální zastoupení ostatních druhů, resp. rodů GIN se v průběhu pastevního období podstatně neměnilo.

Významným faktorem v epizootologii těchto helmintóz je skutečnost, že na infekcích bylo zastoupeno široké spektrum 8 až 10 druhů, resp. rodů, a obdobná dynamika byla zjišťována v průběhu vyšetřování pastevních porostů na infekční larvy GIN. Naše nálezy potvrzují i některé práce zahraničních autorů, kteří podobná vyšetřování u ovcí prováděli, zejména Thomas a Boag (1973) ze Skotska, Trepp (1973) ze Švýcarska, Goldstein aj. (1978), Gränzer aj. (1979), Benesch (1991) z Německa, Pelinski (1980) z Polska a Varády a Praslička (1993) ze Slovenska.

Prováděná dehelmintizace albendazolem prokázala dobrou účinnost jak u bahníků, tak u jehňat. Intenzita infekce a prevalence u GIN a tasemnic *Moniezia* spp. poklesly po provedených dehelmintizacích o více než 90 %. V souladu s našimi dřívějšími nálezy (Chroust, 1995) je možno potvrdit původní předpoklad, že optimální doba pro dehelmintizaci jehňat při pastevním odchovu je nejpозději v první polovině července. V oblastech stacionárního výskytu helmintóz trávicího traktu je významným signálem prudké zvyšování počtu vylučovaných vajíček GIN a tasemnic v trusu a rovněž infekčních larev na vegetaci. Dobré výsledky s použitím albendazolu potvrzují i další autoři, např. Low a Reinecke (1991), Mage a Pothier (1990) a Gundlach aj. (1991) a další.

LITERATURA

BENESCH, C. (1991): Zweijährige Untersuchungen über Vorkommen, Häufigkeit und Stärke des Befalls mit Magen-Darm-Strongyiden bei Schafen anhand des Sektionsgutes des Staatlichen Veterinär-Untersuchungsamtes. Vet. Diss. Gießen, 1–37.

- CHROUST, K. (1970): Kvantitativní metoda pro stanovení počtu vajíček gastroenterohelminthů (oocyst kokcidii) v trusu přežvýkavců a koní. Metodiky ÚSVÚ Praha, s. 312–313.
- CHROUST, K. (1995): Dynamics of gastrointestinal helminth infections in two systems of lamb rearing. Acta Vet. (Brno), 64, 171–177.
- CHROUST, K. – HULÍNSKÁ, I. (1970): Metoda koprokultury pro diagnostiku invazních larev (La III) gastrointestinálních nematodů přežvýkavců a koní. Metodiky ÚSVÚ Praha, s. 313–314.
- GOLDSTEIN, N. – BUNKE, V. – BÜRGER, H. J. (1978): Ökologische und Eizootologische Untersuchung über Magen-Darm-Strongyiden beim Schaf. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 91, 286–289.
- GRÄNZER, W. – GRAUNKE, W. D. – SENDKE, A. (1979): Zur Epidemiologie der Parasitosen beim Schaf in Bayern. Landwirtsch. Jb., 398–402.
- GUNDLACH, J. L. – UCHACZ, S. – SADZKOWSKI, A. – TAMCZUK, K. (1991): Albendazol i luksalbendazol – preparaty benzimidazolowe o szerokim spektrum w leczeniu parazyto przeżuwaczy. Med. Wet., 47, 364–365.
- HULÍNSKÁ, I. (1969): Die Determinationsmerkmale der Invasionslarven bei Schafhelminthen. Acta Sci. Nat. Acad. Sci. Bohemoslov., Brno, III, 1–25.
- LOW, J. P. – REINECKE, R. K. (1991): Overberg research projects. XIII. A comparison of the efficacy of albendazole drench and an albendazole slow-release capsule against nematode parasites in sheep. J. S. Afr. Vet. Assoc., 62, 182–183.
- MAGE, C. – POTHIER, F. (1990): Prevention of gastrointestinal Strongyles in sucking ewes with Proftril administered at turn-out. Rev. Med. Vet., 141, 765–769.
- PELINSKI, M. (1980): Seasonal dynamics of stomach nematode invasion in sheep and the effect of inhibition phenomenon of larval development on the sheep infestation in spring. Acta Parasit. Pol., 27, 493–506.
- SKRIVÁNEK, M. – CHROUST, K. – ŠVEC, K. – BÍLEK, M. – HORÁK, F. – JÍLEK, F. (1991): Pastevní odchov jehňat. Zemědělec, 41, 3–5.
- THOMAS, R. J. – BOAG, R. J. B. (1973): Epidemiological studies on gastrointestinal nematode parasites of sheep. Res. Vet. Sci., 15, 238–249.
- TREPP, H. C. (1973): Epizootologische Untersuchungen über Magen-Darm-Strongyiden-Befall des Schafes. [Veterinary Dissertation.] Zürich, 42 p.
- VARÁDY, M. – PRASLIČKA, J. (1993): Výskyt a druhové zastúpenie gastrointestinálnych nematódov v chovoch oviec na Slovensku. Veterinárstvi, 43, 142–143.

Received: 96–07–18

Accepted: 96–10–17

Kontaktní adresa:

Prof. MVDr. Karel Chroust, DrSc., Ústav parazitologie FVL, Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Česká republika
Tel.: 05/41 56 22 62, fax 05/41 56 22 72

TESTING OF TKT MEDIUM FOR *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* SCREENING IN BULK MILK SAMPLES

OVĚŘENÍ TKT MÉDIA PRO SCREENING *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* V BAZÉNOVÝCH VZORCÍCH MLÉKA

P. Benda, M. Vyletělová

Research Institute for Cattle Breeding, Rapotín, Czech Republic

ABSTRACT: A selective medium for quantitative determination of *Streptococcus agalactiae* in bulk milk samples was tested. Among the medium bases, Edwards medium (EW) supplemented with 6 to 9% (v/v) of carefully washed sheep erythrocytes was proved to be best (Tab. V). The production of sphingomyelinase C (BHE, Tab. II) or D (COREX, Tab. I) as a supplement supporting the formation of specific hemolytic zones in the medium, was tested in four strains of *Staphylococcus aureus* and seven strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Submersion aerated cultivation was used for enzyme production; optimum cultivation time is about 100 hours (Figs. 1, 2). To determine the activity of the enzymes produced a screening method was developed applying hemolytic interactions with CAMP factor of *Str. agalactiae*. Method sensitivity and reproducibility are sufficiently high for the purposes of observation (Tab. III). The produced enzymes did not show any changes in their activity over the whole period of storage under all conditions of storage (32 days/7 °C, 48 weeks/-18 °C, lyophilizate 48 weeks/20 °C). Sphingomyelinase C is more resistant to heat denaturation, not losing its activity even after being warmed to 85 °C for 5 min; sphingomyelinase D is sensitive to temperatures higher than 50 °C (Fig. 3). COREX was selected (sphingomyelinase D), produced by the strain CNTCC 18/62 of *C. pseudotuberculosis*. The enzyme was applied either in raw filtrate of the medium (sterilization by repeated membrane filtration) or in prepurified form obtained by cold acetone precipitation, providing the same results. The medium is highly specific and likely enough selective for *Str. agalactiae*, unlike BHE it does not provide any positive results with UBERIS-factor + strains of *Str. uberis* (Tab. V). Optimum cultivation time is 18 hours; prolongation of cultivation for more than 24 hours brings about the risk of falsely positive readings (Tab. VI) in the strains of accompanying microflora (*Morganella morganii* ssp. *morganii*, δ -hemolytic staphylococci).

TKT medium; properties; phospholipase C and D; *Streptococcus agalactiae*; quantitative determination; milk; bulk samples

ABSTRAKT: Bylo testováno selektivní médium pro kvantitativní stanovení *Streptococcus agalactiae* v bazénových vzorcích mléka. Z bázi média se nejlépe osvědčilo Edwardsovo médium (EW), doplněné o 6 až 9 % (v/v) pečlivě praných ovčích erytrocytů. U čtyř kmenů *Staphylococcus aureus* a sedmi kmenů *Corynebacterium pseudotuberculosis* byla ověřena schopnost produkce sfingomyelinázy C, resp. D, jako suplementu, umožňujícího v médiu vznik specifických hemolytických zón. K produkci enzymů bylo použito submerzní provzdušňované kultivace; optimální doba kultivace činí asi 100 hodin. Pro stanovení aktivity získaných enzymů byla vyvinuta screeningová metoda, využívající hemolytické interakce s CAMP faktorem *Str. agalactiae*. Citlivost a reprodukovatelnost metody byla dostačující pro účely sledování. Připravené enzymy nevykazovaly změny aktivity po celou dobu uchovávání za všech podmínek uchování (32 dní/7 °C, 48 týdnů/-18 °C, lyofilizát 48 týdnů/20 °C). K tepelné denaturaci je odolnější sfingomyelináza C, neztrácející aktivitu ani po zahřátí po dobu 5 min/85 °C; sfingomyelináza D je citlivá k teplotám vyšším než 50 °C. Vybrán byl COREX (sfingomyelináza D), produkovaný kmenem *C. pseudotuberculosis* CNTCC 18/62. Enzym byl aplikován se stejnými výsledky buď přímo v surovém filtrátu média (sterilizace opakovanou membránovou filtrací), nebo v prepurifikované formě, získané chladovou acetonovou precipitací. Médium je pro *Str. agalactiae* vysoce specifické a pravděpodobně i dostatečně selektivní. Optimální doba kultivace je 18 h; při prodloužení nad 24 h vzrůstá riziko falešně pozitivních odečtů u kmenů doprovodné mikroflóry (*Morganella morganii* ssp. *morganii*, δ -hemolytické stafylokoky).

TKT médium; vlastnosti; fosfolipáza C a D; *Streptococcus agalactiae*; stanovení kvantitativní; mléko; bazénové vzorky

ÚVOD

Streptococcus agalactiae patří v současné době stále k nejdůležitějším etiologickým činitelům, zúčastněným v patogenezi mastitid skotu. Proto informace o preva-

lenci *Str. agalactiae* ve stádech je velmi užitečným vodítkem při řešení problémů mastitid. K problému lze přistoupit dvojím způsobem. Buď je možno individuálně vyšetřit celé stádo, nebo kvantitativně stanovit *Str. agalactiae* v bazénovém vzorku mléka. Druhý způsob

je pochopitelně mnohem rychlejší a levnější; oprávněný je však pouze v indikovaných případech použití (kontrola účinnosti prováděných ozdravných opatření, screening stád, kontroly stád bez výskytu *Str. agalactiae*).

Využití CAMP fenoménu (Christie aj., 1944) v diagnostice *Str. agalactiae* v bazénových vzorcích mléka se datuje od doby, kdy Hauge a Kohler-Ellingsen (1953) popsali TKT (Thalium-Krystal-violet-Toxin) médium. Tato půda je založena na bázi Edwardsova média, doplněného o β -toxin (β -hemolysin) *Staphylococcus aureus*. Přímou v primokultuře se pak kolem kolonií *Str. agalactiae* vytváří zóny synergických hemolytických interakcí. Podobné hemolytické zóny však tvoří na TKT-médium i *Str. uberis* s produkcí UBERIS faktoru (Skalka aj., 1980b). Odlišení obou taxonů v primokultuře je velmi obtížné i přes pozitivní eskulinovou aktivitu *Str. uberis*. TKT médium bylo některými autory modifikováno (Postle, 1968; Ward aj., 1970), zvláště směrem ke zvýraznění eskulinové aktivity citranem železnatým; stále se však v médiu projevovala interferující hemolytická aktivita některých kmenů *Str. uberis*. Tento nedostatek klasického TKT média navrhli odstranit Skalka aj. (1979b), kdy využili synergickou hemolytickou interakci mezi fosfolipázou (sfingomyelinázou) D, produkovanou kmeny *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a CAMP faktorem kmenů *Str. agalactiae*. Navržené kultivační médium (Skalka a Smola, 1979c) je místo stafylokokovým β -hemolysinem suplementováno fosfolipázou D (autory nazývanou COREX). Chybělo však podrobnější otestování přípravy a složení média, kultivačních podmínek a selektivity. Pro naše účely bylo navíc třeba médium důkladně ověřit pro použití v analýze bazénových vzorků mléka.

MATERIÁL A METODY

Sledování produkce sfingomyelináz testovanými kmeny mikroorganismů

Bylo použito šest kmenů *Corynebacterium pseudotuberculosis* z České národní sbírky typových kultur (CNTCC) Praha a jeden kmen z České sbírky mikroorganismů (CCM) Brno (tab. I), dále pak tři kmeny *Staph. aureus* z CCM a jeden kmen vlastní proveniencce (tab. II). Všechny kmeny byly nejprve 2x pasážovány na krevním agaru (Columbia Blood agar, HiMedia, Bombay, India). Poté u nich byl předběžně testován výskyt synergických hemolytických interakcí na pevné půdě (Columbia agar s přidavkem 8 % praných beraních erytrocytů) se třemi kontrolními kmeny *Str. agalactiae* (kmen CCM 6187, dva kmeny vlastní).

U kmenů *C. pseudotuberculosis* a *Staph. aureus* byla dále ověřena tvorba sfingomyelináz při submerzní kultivaci. 200 ml živného bujónu č. 2 (Imuna, Šarišské Michaľany) v případě stafylokoků nebo 200 ml Brain Heart Infusion (Oxoid) v případě korynebakterií bylo

inokulováno 10 ml suspenze bakterií ve fyziologickém roztoku. Kultivace probíhala 72 hodin při teplotě 37 °C za stálého míchání provzdušňováním v promývačce plynů o objemu 500 ml. Pro snížení pěnivosti byl do média přidáván Tween 80 v koncentraci 0,5 %. Narostlá suspenze byla odstředěna v chlazené centrifuzě při 10 000 rpm/4 °C (Janetzki K-24). Supernatant byl poté dvakrát zfiltrován přes membránový ultrafiltr (Synpor č. 9). Výsledný surový filtrát obsahoval méně než 1 CFU bakterií/l ml (kultivační metoda, GTK agar, Milcom Tábor). Prepurifikace enzymů ze surového filtrátu byla provedena metodou acetonové precipitace (Haque a Baldwin, 1969). V surovém filtrátu i v prepurifikovaném koncentráte enzymů byl stanoven titr sfingomyelináz mikrodostičkovou metodou (IIIc.).

V případě sledování dynamiky tvorby sfingomyelináz byly použity kmeny *Staph. aureus* 27/SAD a *C. pseudotuberculosis* CNTCC 18/62. Kultivace probíhala za stejných podmínek celkem 192 hodin. Narostlá sus-

I. Produkce sfingomyelinázy D (COREX) sbírkovými kmeny *Corynebacterium pseudotuberculosis* – kvalitativní a kvantitativní test. Titr značí exponent posledního ředění, způsobujícího hemolytickou interakci (např. titr 8 = ředění 1 : 2⁸ = 1 : 256) – Production of sphingomyelinase D (COREX) by collection strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* – quality and quantity test. The titer shows an exponent of the last dilution inducing hemolytic interaction (e.g. titer 8 = dilution 1 : 2⁸ = 1 : 256)

Sbírkový kmen ¹	Produkce enzymu ²	
	na pevném médiu ³	titr v tekutém médiu ⁴
CNTCC COR 14/61	velmi dobrá ⁵	4
CNTCC COR 16/61	průměrná ⁶	3
CNTCC COR 18/62	výborná ⁷	8
CNTCC COR 39/70	průměrná	6
CNTCC COR 99/89	nedetekovatelná ⁸	1
CNTCC COR 100/89	výborná	5
CCM 2822	slabá ⁹	1

¹ collection strain, ² enzyme production, ³ on solid medium, ⁴ titer in liquid medium, ⁵ very good, ⁶ mediocre, ⁷ excellent, ⁸ not detectable, ⁹ weak

II. Produkce β -hemolysinu (BHE) kmeny *Staph. aureus* – kvalitativní a kvantitativní test. Titr značí exponent posledního ředění, způsobujícího hemolytickou interakci (např. titr 9 = ředění 1 : 2⁹ = 1 : 512) – Production of beta-hemolysin (BHE) by strains of *Staph. aureus* – quality and quantity test. The titer shows an exponent of the last dilution inducing hemolytic interaction (e.g. titer 9 = dilution 1 : 2⁹ = 1 : 512)

Sbírkový kmen ¹	Produkce enzymu ²	
	na pevném médiu ³	titr v tekutém médiu ⁴
CCM 6188	výborná ⁵	11
CCM 4245	velmi dobrá ⁶	9
CCM 4246	výborná	11
27/SAD	výborná	12

For I–4 see Tab. I; ⁵ excellent, ⁶ very good

penze byla v množství 5 ml pravidelně odebrána a v surovém filtrátu byl stanoven titr sfingomyelináz stejným způsobem jako v předchozím případě. Současně byla stanovena hustota suspenze mikroorganismů (CFU/ml) na GTK agaru. Čistota kultury byla kontrolována křížovým rozetěrem na krevní agar s plnou beraní krví.

Metody stanovení titru sfingomyelináz, vliv teploty kultivace

Byly ověřovány tři metody stanovení titru sfingomyelináz:

Klasická zkumavková metoda (Hot-Cold test)

Testování probíhalo podle Haque a Baldwin (1969).

Plotnová metoda

30 ml EW (HiMedia), po rozpuštění ochlazeného na 45 °C, bylo smíseno s 2 ml příslušného dvojkového ředění surového filtrátu či purifikovaného koncentrátu sfingomyelináz, 0,3 ml 0,1 M $MgSO_4$ a 3 ml 25% suspenze pranych beraních erytrocytů. Médium bylo plněno po 10 ml do Petriho misek a předsušeno. Poté byly na povrch média v každé misce vyočkovány jednou čarou tři kontrolní kmeny *Str. agalactiae*. Kultivace probíhala přesně 24 h/37 °C. Za titr enzymu bylo považováno poslední ředění testovaného materiálu, způsobující totální širokou hemolytickou interakci okolo čáry kontrolních kmenů *Str. agalactiae*. Titr byl vyjádřen jako exponent, tedy titr 0 značí neředěný materiál a titr 12 materiál 4 096krát zředěný.

Modifikace plotnové metody na mikrodestičkách

Do jamek mikrotitračních destiček s plochým dnem byla napipetována řada 50 µl dvojkového ředění enzymu ve fyziologickém roztoku s 1 mM $MgSO_4$. Bylo smíseno 30 ml EW (HiMedia) ochlazeného na 45 °C s 0,3 ml 0,1 M $MgSO_4$ a 3 ml 25% suspenze pranych beraních erytrocytů nebo s 0,3 ml 0,1 M $MgSO_4$, 2 ml prepurifikovaného CAMP faktoru (Skalka aj., 1979a) a 3 ml 25% suspenze pranych beraních erytrocytů. Půda byla pipetována po 100 µl do jamek s enzymem. Zařazeny byly vždy i pozitivní a negativní kontroly a slepé vzorky. U varianty bez CAMP faktoru byl na povrch média v jamkách vyočkován kmen *Str. agalactiae* CCM 6187. Inkubace probíhala v obou případech 18 h/37 °C. Za titr enzymu bylo považováno poslední ředění, způsobující totální projasnění média v jamce.

Porovnání metod

V surových filtrátech všech submerzně kultivovaných kmenů *Staphylococcus aureus* a *Corynebacterium pseudotuberculosis* byly stanoveny obsahy BHE a COREXu všemi třemi metodami současně.

Vliv teploty kultivace

Plotnová metoda byla kultivována při teplotách 20 °C, 23 °C, 27 °C, 30 °C, 33 °C, 37 °C a 40 °C.

Hodnocena byla velikost hemolytických zón a shoda se stanovením při teplotě 37 °C.

Stanovení expirace surového filtrátu sfingomyelináz, teplotní denaturace enzymů, prepurifikace enzymů, vliv opakovaného rozmrazení

Byly testovány tyto formy uchování studovaných enzymů: (1) Lyofilizáty ze 3 ml surového filtrátu/+20 °C, (2) 3 ml surového filtrátu/-50 °C, (3) 3 ml surového filtrátu/-18 °C, (4) 3 ml surového filtrátu/+7 °C a (5) 3 ml surového filtrátu/+20 °C.

Po uplynutí 1, 2, 4, 8, 16 a 32 dní (varianty 4 až 5) nebo 1, 2, 4, 8, 16, 32 a 48 týdnů (varianty 1 až 3) byly ve filtrátech stanovovány titry BHE či COREXu plotnovou metodou. Stanoven byl také vliv vystavení zvýšené teplotě na aktivitu enzymů (simulace denaturace po přidání do připraveného média). Zkumavky s obsahem 3 ml surového filtrátu byly vystaveny po dobu 5 min zvoleným teplotám; poté byla ve filtrátu stanovena aktivita sfingomyelináz.

Prepurifikace sfingomyelináz probíhala metodou dle Haque a Baldwin (1969). Stanovili jsme také recovery aktivity enzymu.

Dále byl ověřen vliv opakovaných rozmrazení u enzymů uchovávaných zmrazením. Osm zkumavek se 3 ml surového filtrátu bylo postupně v intervalu 24 h osmkrát rozmrazeno, v jednotlivých intervalech byly postupně odebrány a v materiálu stanovena aktivita enzymů.

Testování bází médií

Byly testovány tři báze médií: (1) EW, (2) Columbia Blood agar (HiMedia) s přidavkem krystalové violeti a octanu thalného jako pro EW, ale bez eskulinu, a (3) Columbia Blood agar s přidavkem antibiotického supplementu (*Streptococcus Selective Supplement*, Oxoid) v koncentracích 0,5; 1,0 a 2,0 výrobkem předepsaného množství. Celkem 100 ml sterilizované báze, ochlazené na teplotu 45 °C, bylo doplněno BHE nebo COREXem do koncentrace jako v případě plotnové metody. Dále v případě (3) byl přidán antibiotický suplement příslušných koncentrací. Po doplnění 8 ml 25% suspenze erytrocytů byla média rozlévána do Petriho misek. Ověření kvality probíhalo jednak vyočkováním kontrolních kmenů *Str. agalactiae*, jednak inokulací 0,1 ml bazénových vzorků syrového kravského mléka ze stájí s výskytem *Str. agalactiae* na povrch média. Hodnocena byla záchytnost, selektivita média, velikost vytvořených hemolytických zón a přehlednost odečtu.

Ověřen byl také vliv koncentrace erytrocytů na kvalitu média; ke 30 ml zchlazeného média (1) byla přidávána 25% suspenze erytrocytů v koncentracích 1,8; 3,6; 5,4; 7,2 a 9 % (v/v).

Subjektivně byly posouzeny také změny kvality připravených médií s uchováváním při chladničkových teplotách. Médium V.a. s BHE, resp. s COREXem, byly uchovávány při 7 °C a v týdenních intervalech byly sledovány změny kvality média.

K pokusu byly použity bazénové vzorky mléka, analyzované v rámci pravidelného screeningu kvality mléka v oblasti KDV Zábřeh na Moravě. Vzorky mléka nebyly konzervovány, analyzovány byly do dvou hodin po doručení do laboratoře. Celkem bylo analyzováno 610 vzorků mléka.

0,1 ml bazénového vzorku mléka bylo vyočkováno na TKT médium s COREXem nebo s BHE (V.a), rozetřeno a dosušeno v termostatu. Kultivace na povrch pudy byla zvolena pro lepší odečet morfologie kolonií a snadnější subkultivaci; není také nutné opakovaně připravovat média pro každou dávku vzorků jako v případě zalévání vzorku. Kultivace probíhala při 37 °C; odečty byly prováděny po 18, 24, 48 a 72 hodinách. Standardními metodami byla ověřována identita všech mikroorganismů, vytvářejících zóny široké hemolýzy, podobné hemolytickým zónám *Str. agalactiae*. Pro G+ koky byl navíc určen typ produkovaného hemolýzinu (Skalka aj., 1979a, 1980a). Jako *Str. agalactiae* byly určeny kmeny vytvářející synergické hemolytické interakce, kataláza negativní a hippurát a fosfatáza pozitivní.

VÝSLEDKY

Sledování produkce sfingomyelinázy testovanými kmeny mikroorganismů

Nejllepší výsledky produkce sfingomyelinázy D jak při předběžném testování na pevné půdě, tak při submerzní kultivaci kmenů *C. pseudotuberculosis* jsme obdrželi pro kmeny CNTCC COR 18/62 a CNTCC

COR 39/70. Naopak kmeny CNTCC COR 99/89 a CCM 2822 produkovaly pouze slabě detekovatelné stopy enzymu (tab. I).

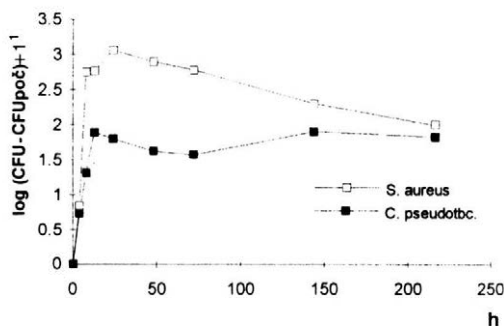
Výsledky sledování produkce stafylokokového β -hemolýzinu (BHE) testovanými kmeny mikroorganismů při submerzní kultivaci uvádí tab. II. Všechny kmeny produkovaly BHE ve značném množství.

Pozitivní hemolytické interakce na pevné půdě byly podmíněny použitím pranych erytrocytů. Pokud bylo médium připraveno z defibrinované plné krve, hemolytické interakce *Str. agalactiae* s BHE byly omezeny a interakce s COREXem se ani pro jeden sledovaný kmen nepodařilo prokázat. Také při použití pouze jedinou prapraných erytrocytů docházelo k částečné inhibici interakcí COREXu.

Typické růstové křivky mikroorganismů jsou uvedeny na obr. 1. Výsledky pro *C. pseudotuberculosis* však nebudou zcela přesné. Za uvedených kultivačních podmínek submerzní kultura *C. pseudotuberculosis* výrazně autoaglutinuje a výsledky nejsou zcela reprodukovatelné.

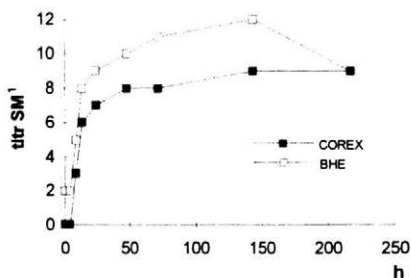
Dynamika produkce enzymů je znázorněna na obr. 2. Je zřejmé, že produkce enzymů v podstatě kopíruje růstové křivky a je maximální v exponenciální fázi růstu. Prodloužení kultivace nad 72 h již nemá tak výrazný vliv na konečný titr enzymů v médiu, naopak u stafylokoků může dojít po delší kultivaci k poklesu aktivity produkovaného BHE. Důvodem bude pravděpodobně postupně se zvyšující obsah stafylokokového α -hemolýzinu, neboť většina kmenů jej produkuje, byť ve slabší míře. Tento jev byl pozorován pro všechny sledované kmeny *Str. aureus* a projevoval se obtížnými odečty výsledků při kultivacích delších než 150 hodin.

Z výsledků je také zřejmé, že optimální doba kultivace se pohybuje u stafylokoků mezi 50 až 100 hodinami, kdy ještě nehrozí inhibice α -hemolýzinem, u ko-



1. Růstové křivky kmenů *Staph. aureus* SAD 27 a *Corynebacterium pseudotuberculosis* CNTCC 18/62. Hodnoty na ose y značí logarithmus rozdílu aktuálního a počátečního počtu CFU/1 ml kultivačního média – Growth curves of the strains *Staph. aureus* SAD 27 and *Corynebacterium pseudotuberculosis* CNTCC 18/62. Values on y-axis indicate logarithm of the difference between actual and starting counts of CFU/1 ml culture medium

¹log (CFU – starting CFU) + 1



2. Dynamika produkce sfingomyelinázy C (BHE) kmenem *Staph. aureus* SAD 27 a sfingomyelinázy D (COREX) kmenem *Corynebacterium pseudotuberculosis* CNTCC 18/62. Hodnoty na ose y značí titr, tj. exponent posledního ředění, způsobujícího hemolytickou interakci (např. titr 8 = ředění 1 : 2⁸ = 1 : 256) – Dynamics of sphingomyelinase C production (BHE) by the strain *Staph. aureus* SAD 27 and sphingomyelinase D (COREX) by the strain *Corynebacterium pseudotuberculosis* CNTCC 18/62. Values on y-axis indicate the titer, i.e. exponent of the last dilution inducing hemolytic interaction (e.g. titer 8 = dilution 1 : 2⁸ = 1 : 256)

¹sphingomyelinase titer

rynebaktérií pak mezi 100 až 150 hodinami. Riziko ovlivnění výsledku případnou kontaminací je nízké, množství vytvořeného enzymu je však již dostatečné. Ve všech našich kultivacích jsme se nesetkali s detekovatelnou kontaminací.

Metody stanovení titru sfingomyelináz, vliv teploty kultivace

Přesnost metod nebylo možno hodnotit, neboť chybí standardní metoda. Reprodukovatelnost metod byla přibližně stejná, všechny jsou spolehlivě schopny detekovat poslední ředění s pozitivní reakcí. Při paralelních stanoveních jsme nenalezli rozdíly, opakovaná stanovení v delších časových intervalech již byla zatížena chybami, nepřesahujícími ale jedno ředění. Z tohoto hlediska se nám nejspolehlivější jevila plotnová metoda, nejvíce bylo zatíženo chybami stanovení COREXu zkumavkovou metodou. Nejcitlivější metodou byla sledována plotnová metoda spolu s metodou na mikrodestičkách (tab. III). Klasická zkumavková metoda vykazovala zhruba čtyřikrát nižší citlivost než předešlé metody. U mikrodestičkové metody jsme nenalezli rozdíly mezi použitím prepurifikovaného CAMP faktoru a přímým vyočkováním kmene *Str. agalactiae* na povrch média v jamce.

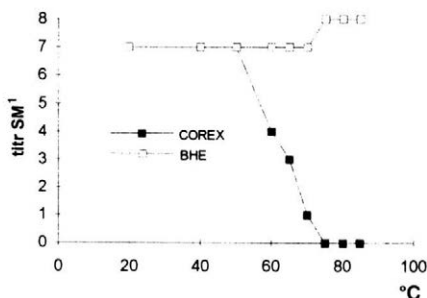
Z uvedených důvodů byly zvoleny pro další práci plotnová a mikrodestičková metoda. Plotnovou metodu jsme pro její reprodukovatelnost používali při sledování expirace enzymů, mikrodestičkovou metodu pak pro sledování dynamiky produkce enzymů. Dalšími nezanedbatelnými výhodami zvolených metod jsou relativní jednoduchost a shoda stanovení (alespoň v našem sledování) s výslednou aplikací enzymu a tím i spolehlivost výsledného média.

Pro kultivaci testů s COREXem se jevíly jednoznačně nevhodné kultivační teploty již okolo 30 °C, zatímco testy s BHE dávaly korektní výsledky i při teplotě 20 °C. Výsledky jsou obsaženy v tab. IV.

Stanovení expirace surového filtrátu sfingomyelináz, teplotní denaturace enzymů, prepurifikace enzymů, vliv opakovaného rozmražení

Při všech sledovaných způsobech uložení se sfingomyelinázová aktivita surového filtrátu jak pro COREX, tak pro BHE neměnila. Pro uložení při +20 °C bylo však nutno ukončit sledování již po 21 dnech vzhledem k náhodnému přerůstání zbytkovou kontaminací stafylokoky či korynebakteriemi. Aktivita sice zůstávala stejná, ale nebylo možno vyloučit kompenzaci úbytku aktivity produkcí nově narůstající kultury.

Výsledky testování teplotní denaturace enzymů (obr. 3) ukazují, že BHE *Staph. aureus* nesnižoval aktivitu ani po zahřátí 5 min/85 °C. Naproti tomu CO-



3. Vliv pětiminutové expozice při zvýšené teplotě na aktivitu sfingomyelinázy C (BHE) kmene *Staph. aureus* SAD 27 a sfingomyelinázy D (COREX) *Corynebacterium pseudotuberculosis* CNTCC 18/62. Hodnoty na ose y značí titer, tj. exponent posledního ředění, způsobujícího hemolytickou interakci (např. titer 8 = ředění 1 : 2⁸ = 1 : 256) – The effect of five-minute exposure to an increased temperature on the activity of sphingomyelinase C (BHE) of the strain *Staph. aureus* SAD 27 and sphingomyelinase D (COREX) of *Corynebacterium pseudotuberculosis* CNTCC 18/62. Values on y-axis indicate the titer, i.e. exponent of the last dilution inducing hemolytic interaction (e.g. titer 8 = dilution 1 : 2⁸ = 1 : 256)

¹sphingomyelinase titer

III. Srovnání metod stanovení sfingomyelináz. Titr značí exponent posledního ředění, způsobujícího hemolytickou interakci (např. titer 9 = ředění 1 : 2⁹ = 1 : 512) – Comparison of methods of sphingomyelinase determination. The titer shows an exponent of the last dilution inducing hemolytic interaction (e.g. titer 9 = dilution 1 : 2⁹ = 1 : 512)

Sbírkový kmen ¹	Submerzní provzdušňovaná kultivace, titer enzymu (72h/37 °C) v surovém filtrátu, metoda stanovení ²		
	zkumavková ³	mikrodestička ⁴	plotnová ⁵
CCM 6188	9	11	11
CCM 4245	7	9	9
CCM 4246	9	11	11
27/SAD	10	12	12
CNTCC COR 14/61	2	4	5
CNTCC COR 39/70	4	6	6
CNTCC COR 18/62	6	8	8
CNTCC COR 100/89	4	5	5

¹collection strain, ²submersion aerated cultivation, enzyme titer (72h/37 °C) in raw filtrate, method of determination, ³test-tube, ⁴micro-plate, ⁵plate

REX *C. pseudotuberculosis* byl zcela denaturován již při 75 °C, nicméně „technologicky“ důležitá teplota 50 °C neměla ještě vliv na aktivitu.

Prepurifikace sfingomyelináz metodou dle Haque a Baldwin (1969) přináší výhody v možnosti podstatného zkoncentrování enzymů a zmenšení objemů používaných k lyofilizaci. Dosahovali jsme recovery aktivity enzymů lepší než 50 %. Proto např. COREX bylo možno bez problémů zkoncentrovat tak, že objem prepurifikovaného enzymu, nutného pro přípravu 600 ml média, činil pouze 0,3 ml.

Sledované enzymy jsou necitlivé k opakovanému rozmrazení uchovávaného materiálu. Ani po osmi cyklech rozmrazení a zmrazení (–18 °C/+25 °C) nedošlo ke změně aktivity sfingomyelináz.

Testování bází médií

Výsledky testování bází médií s COREXem pomocí kontrolních kmenů uvádí tab. V. Nejlepší výsledky jsme obdrželi pro EW. Použití Streptococcus Selective Supplement s Columbia agarem firmy Oxoid nepřináší žádné výhody. Médium se suplementem v předepsané koncentraci již pravděpodobně potlačuje produkci CAMP faktoru u *Str. agalactiae*, neboť hemolytické interakce jsou výrazně slabší a méně zřetelné. Výsledky suplementace BHE jsou podobné výsledkům suplementace COREXem. Jediným rozdílem je pozitivní hemolytická interakce UBERIS faktor + kmenů *Str. uberis*. Pro médium identické s EW, ale bez eskulinu, jsme obdrželi výsledky totožné s EW, proto nejsou uvedeny v tabulce.

V tab. VI jsou uvedeny výsledky kvantitativního ověřování bází médií na bazénových vzorcích mléka. Hodnoty v tabulce značí počty CFU s pozitivními hemolytickými interakcemi; jsou průměrem ze tří opakování. U vzorku č.1213 byly v primokultuře přítomny kolonie UBERIS faktor + kmene *Str. uberis*, proto vykazuje EW s BHE podstatně vyšší výsledky. Rozdíly mezi zbývajícími médii naznačují lepší záchytnost EW s COREXem, pro malý rozsah souboru je však nelze považovat za relevantní. Columbia agar s OXOID suplementem není tak selektivní jako EW a umožňuje růst i jiných G+ mikroorganismů (např. laktobacily), které na EW nerostou. Tím také vzrůstá riziko kompetitivní inhibice v kultuře.

Koncentrace erytrocytů ve výsledném médiu (testováno pro EW s COREXem) neměla vliv ani na velikost hemolytických zón, ani na záchytnost média. Nejvhodnější koncentrace erytrocytů v médiu (z hlediska snadného odečtu primokultur) se jeví v rozmezí 6 až 9 % (v/v).

S prodlouženým uchováváním při teplotě 7 °C docházelo i při uchovávání v uzavřených PE sáčcích k vysychání média. Jak v případě BHE, tak COREXu se po dobu nejméně jednoho měsíce neměnila schopnost hemolytické interakce s kmeny *Str. agalactiae*. U média s BHE však po 2 až 3 týdnech docházelo k postupné lýze erytrocytů v médiu a k projasnění média.

Ověření selektivity média, identifikace doprovodné mikroflóry

Z TKT média s BHE i s COREXem byly izolovány kmeny mikroorganismů, vytvářející hemolytické zóny okolo kolonií. Tab. VI obsahuje seznam nejčastěji izolovaných taxonů spolu s popisem růstu na TKT agaru. Stafylokoky produkující δ-hemolysin nepatřily do jednoho druhu. Izolovali jsme dva druhy *Staph. simulans*, *Staph. haemolyticus* a *Staph. xylosus*. U ojediněle izolovaných kmenů *Staph. aureus* se pravděpodobně nejednalo o hemolytické synergické interakce, neboť izolované kmeny vždy intenzivně produkovaly β-hemolysin a hemolytické zóny byly vždy malého průměru.

Z TKT s BHE bylo izolováno celkem 252 kmenů s typickými širokými zónami hemolytických interakcí okolo kolonií. Všechny izoláty náležely buď ke *Str. agalactiae* nebo ke *Str. uberis*. Na TKT s COREXem pak ze 134 kmenů byly všechny potvrzeny jako *Str. agalactiae*.

Výrazný vliv na obraz primokultury (a tím i snadnost odečtu) měla doba kultivace. Po 18 h byly vždy plně vyvinuty hemolytické zóny kolem kolonií *Str. agalactiae* (pro BHE také *Str. uberis*), zatímco hemolytické zóny interferující mikroflóry chyběly nebo byly slabě vyvinuté. Již po 24 h však byly zřetelné patrné především zóny δ-hemolytických stafylokoků a *Morganella morganii* ssp. *morganii*. Primokultury kultivované déle než 24 h byly mnohdy velmi obtížně odečitatelné. Erytrocyty v médiu (obzvláště v médiu s BHE) byly již částečně narušeny, pravděpodobně společným působením teploty a exosubstancí doprovodné mikroflóry, nejčastěji enterokoků. Také vzhled hemolytických zón δ-hemolytických stafylokoků se po 48 h blížil velikosti zónám *Str. agalactiae*.

DISKUSE

Cílem naší práce bylo podrobné ověření vlastností selektivního média pro kultivaci *Str. agalactiae*. V první řadě jsme potvrdili použitelnost sfingomyelinázy D *C. pseudotuberculosis* jako suplementu pro TKT médium. Výsledky naší práce plně souhlasí s pracemi autorů Skalka aj. (1979b, 1980b); naopak jsou v rozporu s pracemi, popírajícími existenci synergické hemolytické interakce sfingomyelinázy D a CAMP faktoru *Str. agalactiae* (Bernheimer aj., 1980; Barksdale aj., 1981). Uvedené rozpory by bylo podle našeho názoru možno vysvětlit některými z následujících faktů:

- Podle našich výsledků existují podstatné rozdíly v produkci sfingomyelinázy D kmeny *C. pseudotuberculosis*. Například kmen CCM 2822, použitý Skalkou aj. (1979b), se nejeví příliš vhodný pro kvantitativní produkci COREXu; kmen CNTCC 18/62 naproti tomu produkuje po 72 h submerzní kultivace přibližně stonásobně více sfingomyelinázy D (tab. I).
- Synergické hemolytické interakce mezi COREXem a CAMP faktorem *Str. agalactiae* jsou inhibovány,

IV. Vliv kultivační teploty na intenzitu synergických hemolytických interakcí mezi CAMP faktorem *Str. agalactiae* a BHE, resp. COREXem – The effect of culture temperature on the intensity of synergic hemolytic interactions of the CAMP factor of *Str. agalactiae* and BHE or COREX

Teplota (°C) – Temperature (°C)	Hemolytické interakce s CAMP faktorem <i>Str. agalactiae</i> /24 h		Hemolytic interactions with the CAMP factor of <i>Str. agalactiae</i> /24 h	
	BHE	COREX	BHE	COREX
40, 37, 33	korektní, zřetelné, dobře ohraničené, totální hemolýza	korektní, zřetelné, dobře ohraničené, totální hemolýza	correct, clear, well-defined, total hemolysis	correct, clear, well-defined, total hemolysis
30	korektní, zřetelné, dobře ohraničené, totální hemolýza s difúzními okraji	méně zřetelné, hemolýzy nekompletní	correct, clear, well-defined, total hemolysis with diffuse margins	less clear, incomplete hemolyses
27	korektní, zřetelné, dobře ohraničené, totální hemolýza s difúzními okraji	nezřetelné, hemolýzy nekompletní	correct, clear, well-defined, total hemolysis with diffuse margins	unclear, incomplete hemolyses
23	slabší, ale stále zřetelné, dobře ohraničené, totální hemolýza	téměř bez interakce	weaker but still clear, well-defined, total hemolysis	hardly any interactions
20	menší, méně zřetelné	bez interakce	smaller, less clear	without interactions

V. Vliv použitého základu TKT média na růst kontrolních kmenů mikroorganismů. Výsledky po suplementaci COREXem – The effect of the applied base of TKT medium on the growth of control strains of microorganisms. The results after supplementation by COREX

Testovaný kmen – Test strain	Edwardsovo médium	Columbia Blood Agar Base + Streptococcus Selective Supplement Oxoid (poměr k doporučené koncentraci)			Edwards medium	Columbia Blood Agar Base + Streptococcus Selective Supplement Oxoid (ratio to recommended concentration)		
		0,5	1	2		0,5	1	2
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	výrazná kompletní hemolýza, zřetelně ohraničená	kompletní hemolýza, menší než v TKT z Edwardsova média	mírně potlačená hemolýza, výrazně menší	slabá nekompletní hemolýza	clear complete, well-defined hemolysis	complete hemolysis, smaller than in TKT from Edwards medium	slightly suppressed hemolysis, clearly smaller	weak incomplete hemolysis
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 6188	potlačený růst	stopový růst	potlačený růst	potlačený růst	suppressed growth	trace growth	suppressed growth	suppressed growth
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> 5312	dobrý růst, bez hemolýzy	dobrý růst, bez hemolýzy	dobrý růst, bez hemolýzy	dobrý růst, bez hemolýzy	satisfactory growth, without hemolysis	satisfactory growth, without hemolysis	satisfactory growth, without hemolysis	satisfactory growth, without hemolysis
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> P1561	růst poněkud potlačený, zřetelná hemolýza	růst poněkud potlačený, zřetelná hemolýza	slabý růst, stopy hemolýzy	potlačený růst	rather suppressed growth, clear hemolysis	rather suppressed growth, clear hemolysis	weak growth, traces of hemolysis	suppressed growth
<i>Streptococcus uberis</i> UBERIS faktor + P212	dobrý růst, bez hemolýzy	dobrý růst, bez hemolýzy	dobrý růst, bez hemolýzy	dobrý růst, bez hemolýzy	satisfactory growth, without hemolysis	satisfactory growth, without hemolysis	satisfactory growth, without hemolysis	satisfactory growth, without hemolysis

VI. Popis mikroorganismů rostoucích na TKT agaru za tvorby hemolytických zón – Description of microorganisms growing on TKT agar while hemolytic zones are produced

	Růst na TKT + COREX nebo BHE	Growth on TKT + COREX or BHE
<i>Escherichia coli</i>	Růst pouze po prodloužené kultivaci nad 30 h; totální hemolýza, opakovanější, vypouklé, hladké kolonie. Všechny kmeny byly hemolytické i na běžném krevním agaru. Ahemolytické <i>E. coli</i> netvoří zóny na TKT.	Growth only after prolonged cultivation for more than 30 hours; fairly opaque, convex, smooth colonies. All strains were hemolytic even on common blood agar. Ahemolytic <i>E. coli</i> does not form any zones on TKT.
<i>Proteus mirabilis</i>	Některé kmeny běžně rostou na TKT. Pozitivní hemolýzy na TKT jsou svázané se slabou hemolýzou na krvi. Tvoří plazivé či ploché kolonie, někdy s červeným nádechem okolo kolonií.	Some strains commonly grow on TKT. Positive hemolyses on TKT are associated with weak hemolysis on blood agar. Creeping or flat colonies are produced, sometimes with red tinge around the colonies.
<i>Morganella morganii</i> ssp. <i>morganii</i>	Větší (1 až 1,5 mm) vypouklé, hladké kolonie, slabý zelenavý nádech kolonií i okolí, hemolýzy téměř stejné jako u streptokoků. Čistá kultura na krevním agaru často hemolyzující, hemolýzy menšího průměru než na TKT. Po druhé pasáži na TKT již obvykle nejsou hemolýzy zřetelné.	Larger (than 1.5 mm) convex, smooth colonies, faint greenish tinge of colonies and the environs, hemolyses almost the same as in streptococci. Pure cultures on blood agar often showing hemolysis, hemolyses of smaller diameter than on TKT. Hemolyses are not usually clear after the second passage on TKT any longer.
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Opakované, drobné, vypuklé, hladké kolonie, hemolytické interakce jasné, ostře haemolyticus ohraničené. Kultury na KA typické G+ koky, nehemolytické, pigmentující.	Opaque tiny, convex, smooth colonies, clear hemolytic, well-defined interactions. Cultures on KA characterized by G+ cocci, nonhemolytic, pigmented.
<i>Streptococcus uberis</i> UBERIS faktor +	Typické kolonie streptokoků; drobnější, hladké, někdy mukózní. Pozitivní hemolytické interakce zcela typické, pouze na médiu s BHE. Na krevním agaru ahemolytické, zřídka slabě viridující.	Typical colonies of streptococci; somewhat tiny, smooth, sometimes mucous. Positive hemolytic interactions are quite typical, on medium with BHE only. Ahemolytic, rarely slightly viridescence on blood agar.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Opakované, velmi drobné, vypuklé, hladké kolonie, hemolytická zóna malá, jasná, ostře ohraničená. Růst pouze po prodloužené kultivaci nad 48 hodin. Kultura na KA typický <i>Staph. aureus</i> .	Opaque, very tiny, convex, smooth colonies, hemolytic zone is small, clear, well-defined. Growth only after prolonged cultivation for more than 48 hours. Culture on KA is typical <i>Staph. aureus</i> .

použijeme-li pro kultivaci média s obsahem krevní plazmy. Také pouhé stopy plazmy ve špatně vypraných erytrocytech mají vliv na intenzitu interakce. K podobným výsledkům dospěli i Skalka a Smola (1979d) pro klasický CAMP test s BHE.

- Při kultivačních teplotách asi 30 °C již dochází k oslabení synergické hemolytické interakce mezi COREXem a CAMP faktorem.

Dalším předmětem naší práce bylo ověření „technologicky“ důležitých vlastností sledovaných sfingomyelináz včetně způsobu přípravy. Z důvodu předpokládané vyšší výtěžnosti jsme zvolili submerzní způsob kultivace, i když je velmi dobře použitelná i technika povrchových kultur (Skalka aj., 1979b), zvláště pro *Staph. aureus*. To dokumentuje i nenulový titr BHE při startu sledování dynamiky tvorby enzymů (obr. 2), kdy pouhý přídavek 10 ml husté suspenze 24hodinové kultury do kultivačního média (500 ml) zvýšil titr na hodnotu 2. Submerzní způsob kultivace se však rozhodně osvědčil; z jedné dávky (500 ml kultury) lze izolovat množství enzymu, postačující k suplementaci médií pro řádově 10^4 analýz. Pro některé aplikace by však mohl být nevýhodný vyšší obsah balastních peptidů, pocházejících z kultivačního média. Potvrdili jsme také výhodnost a vysokou výtěžnost prepurifikace enzymů, i když pro naše účely (suplementace kultivačního média) je surový filtrát sterilizovaný membránovou filtrací zcela postačující.

Sfingomyelinázy C a D, uchovávané za podmínek naší práce, se jeví jako překvapivě stabilní enzymy. Aktivita při žádném ze způsobů uchování se neměnila po celou dobu sledování; zvláště důležitá je možnost dlouhodobého zmrazení či lyofilizace. Také opakovaný cyklus zmrazení neměl vliv na aktivitu enzymů. COREX je však mnohem citlivější k denaturaci záhřevem, kdy již při teplotách nad 50 °C dochází ke ztrátě aktivity enzymu. Stafylokokový BHE je naproti tomu mimořádně termostabilní; v tomto směru se nabízí srovnání se stafylokokovými enterotoxiny.

Důležitý je také způsob stanovení aktivity sfingomyelináz. Naše screeningová metoda, kdy de facto použijeme totožné podmínky stanovení jako při výsledné aplikaci, se ukázala zhruba čtyřnásobně citlivější než zkumavková metoda (Haque a Baldwin, 1969). Produkci sfingomyelinázy D kmeny CCM 2822 a CNTCC 99/89 se zkumavkovou metodou vůbec nepodařilo prokázat.

Jako nejlepší selektivní báze pro TKT se ukázala média, založená na selektivním účinku thalia a krystalové violeti, ať již s eskulinem (klasické Edwardsovo médium) či bez eskulinu. V zachytivosti se neliší od média se Streptococcus Selective Supplement firmy Oxoid a v selektivitě média a kvalitě hemolytických interakcí jej rozhodně předčí. Použití antibiotického suplementu neřeší ani problém taxonů, vytvářejících falešně pozitivní hemolytické zóny na TKT médiu na bázi EW. Jak δ -hemolytické stafylokoky, tak i kmeny *Morganella morganii* ssp. *morganii* byly schopny růstu

i za přítomnosti antibiotického suplementu. Je však nutno poznamenat, že naše závěry mohou mít omezenou platnost; vztahují se pouze k jednomu typu analyzovaného materiálu – ke vzorkům syrového mléka.

Připravené médium je použitelné po dobu nejméně 14 dní. Po této době však erytrocyty v půdě s BHE již začínají spontánně lýzovat. Podobné zkušenosti uvádějí také Sicho aj. (1993). Médium s COREXem však nevykazuje viditelné změny ani po jednom měsíci uchování a jeho životnost je limitována jinými faktory než lýzou erytrocytů či ztrátou hemolytické aktivity.

Pro širší ověření kvality média na terénních vzorcích jsme používali již jen jeden typ báze TKT média, a to EW. Potvrdili jsme poznatek, že TKT médium suplementované BHE není specifické pouze pro *Str. agalactiae*; totožné hemolytické interakce jsme pozorovali i pro kolonie *Str. uberis* s produkcí UBERIS faktoru (Skalka aj., 1980b). Při použití COREXu problém *Str. uberis* odpadá a médium je pro *Str. agalactiae* vysoce specifické. Vzhledem k raritnímu výskytu kmenů *Str. agalactiae* z případů mastitid bez produkce CAMP faktoru (podle našich sledování do 2 %, sledováno 2 058 kmenů) je půda pravděpodobně i dostatečně selektivní, i když ověřit toto tvrzení by bylo obtížné.

Tvorba hemolytických zón v okolí kolonií (ať již přímým působením hemolyzinů či hemolytickými interakcemi) byla pozorována i pro další taxony (tab. VI) a pro obě testované sfingomyelinázy. Hemolytické zóny jsou však většinou výrazně odlišné od typických zón kolonií *Str. agalactiae*. K záměně by mohlo dojít snad pouze u δ -hemolytických stafylokoků či *Morganella morganii* ssp. *morganii* po kultivaci delší než 24 hodin.

Velmi důležitým faktorem při stanovení *Str. agalactiae* z bazénových vzorků mléka na TKT agaru je doba kultivace. Optimální výsledky jsme docílovali při délce kultivace kolem 18 hodin; při kultivacích přesahujících 24 h již vzrůstá pravděpodobnost falešně pozitivních výsledků.

ZÁVĚR

Pro optimální výsledky kultivace *Str. agalactiae* z bazénových vzorků mléka je podle našich zjištění nutné:

- jako bázi použít Edwardsovo médium s 6 až 9 % (v/v) pečlivě praných ovčích erytrocytů
- médium doplnit sfingomyelinázou D *Corynebacterium pseudotuberculosis* (COREX) do koncentrace asi čtyřnásobně vyšší, než je minimální koncentrace, nutná k vytvoření pozitivní hemolytické interakce
- inokulovat vzorky mléka o objemu 0,1 ml na povrch mírně předsušného média
- odečty primokultury provádět maximálně po 18 h kultivace.

Médium je vysoce selektivní a specifické pro *Str. agalactiae* a podle našeho názoru pro kmeny s typickými hemolytickými interakcemi není třeba další konfirmační krok.

LITERATURA

- BARKSDALE, L. – LINDER, R. – SULEA, I. T. – POLLICE, M. (1981): Phospholipase D activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Corynebacterium ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a distinctive marker within the genus *Corynebacterium*. J. Clin. Microbiol., 13, 335–343.
- BERNHEIMER, A. W. – LINDER, R. – AVIGAD, L. S. (1980): Stepwise degradation of membrane sphingomyelin by corynebacterial phospholipases. Infect. Immun., 29, 123–131.
- CHRISTIE, R. – ATKINS, N. E. – MUNCH-PETERSEN, E. (1944): A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci., 22, 197–200.
- HAQUE, R. U. – BALDWIN, J. N. (1969): Purification and properties of staphylococcal beta hemolysin. II. Purification of beta hemolysin. J. Bact., 100, 751–759.
- HAUGE, S. – KOHLER-ELLINGSEN, J. (1953): Et selektivt agarmedium (TKT-mediet) beregnet til avising av gruppe B-streptokokker i samlemelk. Nord. Vet. Med., 5, 539–547.
- POSTLE, D. S. (1968): Evaluation of a selective medium for screening bulk milk samples for *Streptococcus agalactiae*. Amer. J. Vet. Res., 29, 669–678.
- SISCHO, W. M. – HEIDER, L. E. – MILLER, G. Y. – MOORE, D. A. (1993): Prevalence of contagious pathogens of bovine mastitis and use of mastitis control practice. J. Amer. Vet. Med. Assoc., 202, 595–600.
- SKALKKA, B. – SMOLA, J. – PILLICH, J. (1979a): A simple method of detecting staphylococcal hemolysins. Zbl. Bakt., 245, 283–286.
- SKALKKA, B. – SMOLA, J. – PILLICH, J. (1979b): Diagnostic availability of the hemolytic exosubstance of *Corynebacterium pseudotuberculosis* for isolation and identification of *Streptococcus agalactiae* and its comparison with the beta-toxin of *Staphylococcus aureus*. Zbl. Vet. Med. R. B., 26, 679–687.
- SKALKKA, B. – SMOLA, J. (1979c): Návrh diagnostického média pro *Streptococcus agalactiae*. Veterinářství, 29, 412–413.
- SKALKKA, B. – SMOLA, J. (1979d): O některých faktorech ovlivňujících výsledky CAMP-testu. Veterinářství, 29, 69.
- SKALKKA, B. – SMOLA, J. – PILLICH, J. (1980a): Diagnostic utilization of hemolytically active exosubstances of certain Gram-positive bacteria. II. Detection of staphylococcal hemolysins by means of a prepurified hemolytically active exosubstance of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. J. Hyg. Epid. Microb. Immun., 24, 36–41.
- SKALKKA, B. – SMOLA, J. – PILLICH, J. (1980b): Comparison of some properties of the CAMP-factor from *Streptococcus agalactiae* with the hemolytically latent active exosubstance of *Streptococcus uberis*. Zbl. Vet. Med. R. B., 27, 559–566.
- WARD, G. E. – POSTLE, D. S. – BERMAN, D. T. (1970): Evaluation and proposed applications of a one-step method for isolation and identification of *Streptococcus agalactiae*. J. Amer. Vet. Med. Assoc., 156, 224–229.

Received: 96–03–19

Accepted after corrections: 96–10–23

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 02

CHANGES IN MICROBIAL PARAMETERS DURING THE PRODUCTION OF FINE POULTRY SALAMI

ZMENY MIKROBIÁLNEHO OBRAZU V PRIEBEHU TECHNOLOGICKÉHO PROCESU VÝROBY JEMNEJ HYDINOVEJ SALÁMY

M. Pipová¹, P. Turek¹, A. Laciaková¹, M. Ivanová², I. Plachá³

¹University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

²District Veterinary Administration, Košice, Slovak Republic

³Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: Changes in microbiological parameters during the production of fine poultry salami was monitored in a private poultry-processing plant in Košice within a period of six months. This product consists of meat paste or mechanically deboned poultry meat (MDPM), which is produced with the help of a Protecon MPB 30 E deboning machine, pork trimmings, water (in the form of crushed ice), salt, spices, and garlic paste. The main raw food material (hand-boned meat and skin from poultry carcasses intended for mechanical deboning), MDPM immediately after production, salted MDPM after its 24-hour-storage and ripening in the chiller, pork trimmings added to MDPM at an amount of 25%, prepared salami emulsion, and the final product (fine poultry salami) were examined for the presence of pathogenic and potentially pathogenic microorganisms. The total plate count, the counts of indicator microorganisms (Coliforms and Enterococci), Staphylococci, psychrotrophic, proteolytic and lipolytic bacteria were also determined according to the Slovak government regulations. The results of the quantitative microbiological examination are shown in Figs. 1 and 2. It follows from them that the microbial load of poultry skin is considerably higher than that of hand-boned meat. During the deboning process an increase in all microbial parameters (on average by 1–3 radices) was noticed as compared with the raw food material (defrosted poultry carcasses before the mechanical deboning). MDPM contained 10^4 – 10^7 CFU/g; the count of coliforms ranged between 10^3 and 10^6 /g; the count of proteolytic and lipolytic bacteria between 10^4 and 10^6 /g; the count of Staphylococci and Enterococci between 10^2 and 10^4 /g. *Staphylococcus aureus* was discovered in about 50% samples of MDPM in an average concentration of 10^2 /g. In addition to the groups of bacteria listed above, a wide range of potentially pathogenic microorganisms belonging to the family Enterobacteriaceae, especially those of the genus *Proteus*, *Escherichia coli*, *Citrobacter* and *Providencia*, was also found in MDPM. In four cases *Salmonella enteritidis* was also detected in the samples of both the skin of chicken carcasses and the MDPM. The nitrate salting mixture added at a concentration of 2% did not significantly reduce the counts of bacteria present in the MDPM. The prepared salami emulsion was very high in all groups of microorganisms, which was also caused by the addition of pork trimmings. This component seems to be a very important source of microbial contamination, showing the following average bacterial counts: total plate count 4.8×10^6 /g, the count of psychrotrophic bacteria 1.0×10^6 /g, the count of Coliforms 7.0×10^5 /g, the count of Enterococci 9.2×10^3 /g, the count of Staphylococci 3.0×10^4 /g, the count of proteolytic microorganisms 2.7×10^5 /g, and the count of lipolytic microorganisms 4.2×10^5 /g. However, heat treatment of the final product reliably and almost completely devitalized all the bacteria found in the salami emulsion before heat processing. No pathogenic or potentially pathogenic bacteria were detected in any sample of fine poultry salami. Quite a high number of bacteria in the salami emulsion was reduced by heat treatment to a final average value of 10^2 /g.

mechanically deboned poultry meat; pork trimmings; fine poultry salami; microbiology; Coliforms; Enterococci; Staphylococci; *Salmonella* spp.; Enterobacteriaceae

ABSTRAKT: Počas šiestich mesiacov sa sledovali zmeny mikrobiálneho obrazu v priebehu technologického procesu výroby jemnej hydinovej salámy v súkromnom podniku Hydina v Košiciach. Vyšetrovala sa základná surovina (mäso a koža z hydinových trupov pred mechanickou separáciou), mechanicky separované hydinové mäso (MSHM) získavané na zariadení typu Protecon MPB 30 E, MSHM nasolené 2% prídavkom dusitanovej soliacej zmesi po 24-hodinovom zrení v chladiarni, bravčové výrobné mäso, hotové dielo, ako aj finálny výrobok po tepelnom opracovaní. Zisťovala sa prítomnosť patogénnych a podmienene patogénnych mikroorganizmov, stanovoval sa počet indikátorových mikroorganizmov (koliformné baktérie a enterokoky), počet stafylokokov, psychrotrofných, proteolytických a lipolytických mikroorganizmov. Z výsledkov zhrnutých v obr. 1 a 2 vyplynulo, že v priebehu mechanickej separácie došlo v porovnaní s východiskovou surovinou ku zvýšeniu všetkých sledovaných skupín mikroorganizmov o jeden až tri rády. Prídavok dusitanovej soliacej zmesi sa neprejavil pod-

statnou redukcíu mikrobiálnych počtov a prídavok bravčového výrezu mal za následok ďalšie zhoršenie sledovaných mikrobiologických parametrov. Tepelné opracovanie zredukovalo pomerne vysoký celkový počet mikroorganizmov v diele sledovaného výrobku na priemernú hodnotu $10^2/g$.

mechanicky separované hydínové mäso; bravčové výrobné mäso; jemná hydínová saláma; mikrobiológia; enterokoky; stafylokoky; *Salmonella* spp.; *Enterobacteriaceae*

ÚVOD

V súčasnom období sa spomedzi výrobkov hydínárskeho priemyslu najväčšej obľube tešia údené hydínové výrobky. Rýchly rozvoj výroby a neustále rozširovanie sortimentu tejto skupiny výrobkov sú podmienené predovšetkým strojovým vykosťovaním hydiny a produkciou takzvaného mechanicky separovaného hydínového mäsa (MSHM). Zhodnotenie zbytkového mäsa z hydínových trupov na jednej strane znamená značný ekonomický prínos, na druhej strane však so sebou prinieslo celý rad problémov súvisiacich s hygienickou akosťou takto získaného produktu (Nestorov a i., 1980; Newman, 1981; Horáková a Lukačka, 1984).

Hydínové separované mäso predstavuje z mikrobiologického hľadiska väčší problém ako iné druhy separovaného mäsa, nakoľko kontaminácia hydiny mikroorganizmami sa považuje za nevyhnutný dôsledok technologického spracovania na veľkokapacitných linkách, a to v ktorejkoľvek jeho fáze počnúc zabíjaním a končiac chladením a balením finálneho produktu (Jarchovská a Hartmanová, 1986). Hydina preto patrí k tým surovinám, ktoré sú obvyčajne masívne mikrobiálne kontaminované a ktoré sa uplatňujú ako významné vehikulum pre mikroorganizmy spôsobujúce niektoré alimentárne ochorenia, a to najmä salmonely, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* a *Listeria monocytogenes* (Mountney, 1983; Matyáš, 1993; Ivanová a i., 1995; Ivanová a Gajdoš, 1996).

Cieľom našej práce bolo sledovať zmeny mikrobiálneho obrazu v priebehu technologického procesu výroby jemnej hydínovej salámy, a to počnúc mikrobiologickým vyšetrením suroviny a končiac vyšetrením finálneho výrobku po tepelnom opracovaní pred jeho distribúciou do obchodnej siete.

MATERIÁL A METÓDA

Počas šiestich mesiacov sa v súkromnom podniku Hydina v Košiciach odoberali fázové vzorky v priebehu technologického procesu výroby finálneho výrobku Jemná hydínová saláma. Vyšetrovala sa východisková surovina (mäso a koža z rozmrazených hydínových trupov pred mechanickou separáciou), MSHM vyrobené z ozorkovanej suroviny na zariadení typu Protecon MPB 30 E, MSHM nasolené 2% prídavkom dusitanovej soliacej zmesi po 24-hodinovom zrení v chladniarni, bravčové výrobné mäso prídavané do diela uvedeného výrobku, hotové dielo, ako aj samotný finálny výrobok po jeho tepelnom opracovaní.

Všetky skupiny vzoriek sa podrobili tak kvalitatívnemu ako aj kvantitatívnemu mikrobiologickému vyšetreniu so zameraním na:

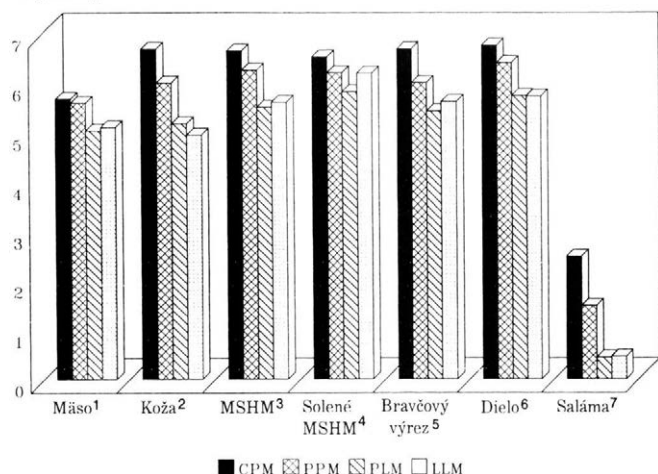
- dôkaz prítomnosti salmonel (STN 56 0088),
- celkový počet mezofilných aeróbných a fakultatívne anaeróbných mikroorganizmov (CPM) podľa STN 56 0083,
- počet psychrotrofných mikroorganizmov (PPM) tým istým spôsobom ako CPM, ale s inkubáciou 10 dní pri teplote 5 °C,
- počet koliformných baktérií (PKB) podľa STN 56 0085,
- počet enterokokov (PE) rozterom na povrch Slanetz-Bartley média (OXOID, U.K.), inkubácia 48 hodín pri teplote 37 °C,
- počet stafylokokov (PS) vrátane *Staphylococcus aureus* podľa STN ISO 6888 (56 0089),
- počet mikroorganizmov rodu *Proteus* (PP) podľa STN 56 0100,
- počet proteolytických (PLM) a lipolytických mikroorganizmov (LLM) rozterom na povrch modifikovaného média podľa Gutierrez, inkubácia 72 hodín pri teplote 30 °C.

VÝSLEDKY

V sledovanom období bolo vyšetrených celkom 86 vzoriek MSHM a soleného MSHM a po 43 vzoriek kuracích trupov, bravčového výrobného mäsa, diela na výrobu jemnej hydínovej salámy a hotového výrobku Jemná hydínová saláma.

Výsledky kvantitatívneho mikrobiologického vyšetrenia sú znázornené na obr. 1 a 2. Ako je z nich zrejmé, počet mikroorganizmov izolovaných z kože hydínových trupov určených na mechanickú separáciu bol asi o jeden rád vyšší ako počet mikroorganizmov zo zbytkového mäsa. V priebehu mechanickej separácie došlo v porovnaní s východiskovou surovinou ku zvýšeniu počtov všetkých sledovaných skupín mikroorganizmov v priemere o jeden až tri rády. CPM a PPM v 1 g MSHM sa pohyboval medzi 10^4 a 10^7 , PKB medzi 10^3 a 10^6 , počet proteolytických a lipolytických mikroorganizmov medzi 10^4 a 10^6 , počet stafylokokov a enterokokov medzi 10^2 a 10^4 . *Staphylococcus aureus* sa nachádzal asi u 50 % vzoriek MSHM v priemernej koncentrácii $10^2/g$. Okrem uvedených skupín mikroorganizmov bola kvalitatívnym mikrobiologickým vyšetrením MSHM zistená široká paleta podmienených patogénnych zástupcov z čeľade *Enterobacteriaceae*, najmä príslušníkov rodu *Proteus*, *E. coli*, *Citrobacter* a *Pro-*

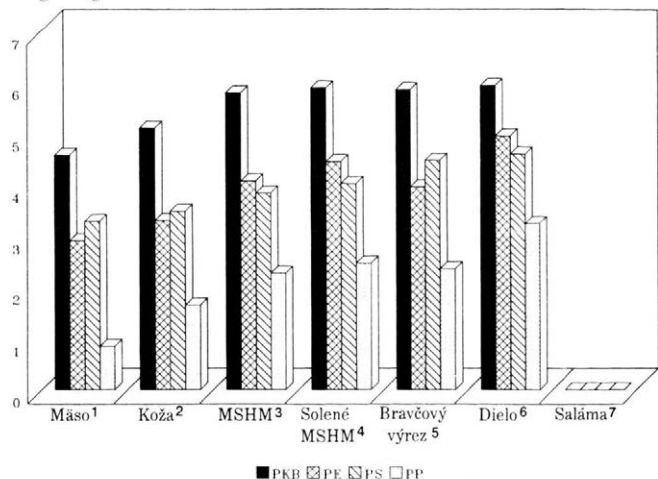
log KTJ/g



1. Zmeny celkového počtu mikroorganizmov (CPM), počtu psychrotrofných (PPM), proteolytických (PLM) a lipolytických mikroorganizmov (LLM) v priebehu technologického procesu výroby jemnej hydinovej salámy – The changes in the total plate counts (CPM), the counts of psychrotrophic (PPM), proteolytic (PLM) and lipolytic (LLM) microorganisms during the production of fine poultry salami

¹meat, ²skin, ³MDPM, ⁴salted MDPM, ⁵pork trimmings, ⁶salami emulsion, ⁷salami

log KTJ/g



2. Zmeny počtu koliformných baktérií (PKB), počtu enterokokov (PE), stafylokokov (PS) a proteov (PP) v priebehu technologického procesu výroby jemnej hydinovej salámy – The changes in the counts of Coliforms (PKB), Enterococci (PE), Staphylococci (PS) and *Proteus* spp. (PP) during the production of fine poultry salami

¹meat, ²skin, ³MDPM, ⁴salted MDPM, ⁵pork trimmings, ⁶salami emulsion, ⁷salami

videncia. V štyroch odberoch sa zistila a potvrdila aj prítomnosť *Salmonella enteritidis*, a to vo vzorkách kože z hydinových trupov pred mechanickou separáciou a v MSHM.

Ako je zjavné z grafického znázornenia, dvojpercentný prídavok dusitanovej soliacej zmesi sa neprejavil podstatnou redukciou mikrobiálnych počtov v MSHM. Hotové dielo ihneď po zamiešaní v kútri vykazovalo vysoké hodnoty vo všetkých sledovaných mikrobiologických ukazovateľoch. Do značnej miery k tomu prispel prídavok bravčového výrobného mäsa, ktoré sa javí v tejto fáze technologického procesu ako významný zdroj mikrobiálnej kontaminácie s nasledovnými priemernými hodnotami: CPM $4.8 \cdot 10^6/\text{g}$, PPM $1.0 \cdot 10^6/\text{g}$, PKB $7.0 \cdot 10^5/\text{g}$, PLM $2.7 \cdot 10^5/\text{g}$, LLM $4.2 \cdot 10^5/\text{g}$, PE $9.2 \cdot 10^3/\text{g}$ a PS $3.0 \cdot 10^4/\text{g}$.

Naopak tepelné opracovanie finálneho výrobku malo za následok spoľahlivú a takmer úplnú devitalizáciu všetkých prítomných mikroorganizmov. Ani v jednej z vyšetrovaných vzoriek jemnej hydinovej salámy sa nezistili ani patogénne ani podmienené patogénne mikroorganizmy a pomerne vysoký CPM v dielu bol následným tepelným opracovaním zredukovaný na priemernú hodnotu $10^2/\text{g}$.

DISKUSIA

Jedným zo základných predpokladov vysokej kvality finálnych výrobkov je kvalita použitej suroviny. V prípade jemnej hydinovej salámy, ktorá bola analyzovaná v našom experimente, základnú surovinu

(60 %) predstavuje MSHM, 25 % tvorí bravčové výrobne mäso a zbytok pripadá na soliace a korenacie zmesi, cesnakovú pastu a pitnú vodu vo forme ľadovej drte (PN 8/93-K).

Z hľadiska údržnosti MSHM je rozhodujúci stupeň jeho mikrobiálnej kontaminácie, ktorý je odrazom hygienickej úrovne v priebehu celého technologického procesu jatočného spracovania hydiny (Ivanová a Gajdoš, 1996). Koža hydiny predstavuje prirodzenú ochrannú bariéru znemožňujúcu prienik mikroorganizmov do svaloviny, preto aj počty mikroorganizmov izolované v našom experimente z kože boli podstatne vyššie ako počty mikroorganizmov zo zbytkového mäsa. Prítomnosť salmonel vo vzorkách kože z kuracích trupov si možno vysvetliť tým, že, ako uvádzajú Jarchovská a Hartmanová (1986), pri obáraní a skľabaní jatočnej hydiny dochádza k odstráneniu epidermálnej vrstvy kože, pričom sa mikroorganizmy (vrátane patogénnych) vtierajú do perových folikulov, čo prakticky znemožňuje ich odstránenie ďalšími technologickými operáciami.

Základné požiadavky týkajúce sa získavania a spracovania MSHM sú v podmienkach Slovenskej republiky zakotvené v Smernom technologickom postupe Hydinárskeho priemyslu v Bratislave z roku 1986. Tento však neobsahuje mikrobiologické limity. V súčasnosti sa v Slovenskej republike všeobecne akceptujú maximálne mikrobiálne limity obsiahnuté vo Výnose MZSV ČR – hlavného hygienika ČR zo dňa 15.1.1990 o mikrobiologických požiadavkách na požívatinu a jejích obalov. Podľa nich maximálne u troch z piatich vyšetrených vzoriek MSHM môže počet mezofilných aeróbných a fakultatívne anaeróbných mikroorganizmov dosiahnuť hodnotu $1,0 \cdot 10^7/\text{g}$ (u zostávajúcich vzoriek $1,0 \cdot 10^6/\text{g}$) u dvoch z piatich vzoriek počet koliformných baktérií hodnotu $1,0 \cdot 10^5/\text{g}$ (u zostávajúcich vzoriek $1,0 \cdot 10^4/\text{g}$), počet *Staphylococcus aureus* $5,0 \cdot 10^3/\text{g}$ (u zostávajúcich vzoriek $5,0 \cdot 10^2/\text{g}$) a počet mezofilných anaeróbných spórotvorných mikroorganizmov $1,0 \cdot 10^4/\text{g}$ (u zostávajúcich vzoriek $1,0 \cdot 10^3/\text{g}$). Salmonele nesmú byť prítomné v 25 g MSHM. Vychádzajúc z uvedených kritérií musíme konštatovať, že citovaným požiadavkám nevyhovovalo 63 % vyšetrených vzoriek MSHM, a to predovšetkým v dôsledku prekročenia limitu pre koliformné baktérie, ale tiež kvôli prítomnosti salmonel.

Aj keď sú uvedené výsledky pomerne nepriaznivé, korelujú s výsledkami iných autorov, ktorí sa zaoberali podobnou problematikou. Jarchovská a Hartmanová (1986) tiež uvádzajú, že vzorky MSHM produkované na zariadení typu Protecon nevyhovovali z hľadiska mikrobiologického v 77 percentách. Za veľmi závažný moment autorky považujú častý nález salmonel (v 25 výrobných partiách) a ojedinelé nálezy mikroorganizmov z rodu *Citrobacter* a *Staphylococcus aureus*. Upozorňujú na to, že v dôsledku častých záchytov salmonel sa javí MSHM z hygienického hľadiska ako riziková surovina.

Kňazovická (1994) vyšetrila spolu 248 vzoriek kuracieho a 232 vzoriek morčacieho separovaného mäsa, z toho uvedeným mikrobiologickým kritériám vyhovovalo len 38,7 % vzoriek kuracieho a 37,9 % vzoriek morčacieho separovaného mäsa. Kvalitatívnym mikrobiologickým vyšetrením obidvoch druhov MSHM zistila prítomnosť saprofytických mikroorganizmov, streptokokov, stafylokokov, *Pseudomonas* spp., podmienené patogénnych mikroorganizmov z čeľade *Enterobacteriaceae* ako *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp. a *Citrobacter* spp.. Prítomnosť salmonel nezistila ani v jednej z vyšetrovaných vzoriek. *Staphylococcus aureus* izolovala približne z 10 % vzoriek kuracieho a 3 % vzoriek morčacieho separovaného mäsa.

MSHM sa ihneď po separácii vychladzuje, prípadne solí prídavkom dusitanovej soliacej zmesi v koncentrácii 2 %. Výsledky našej práce, ako aj výsledky početných predchádzajúcich rozborov poukazujú na to, že uvedený prídavok soliacej zmesi podstatne neznižuje počty sledovaných mikroorganizmov v MSHM (Kňazovická, 1994; Pipová a i., 1994, 1995) a tiež neinhibuje množenie salmonel (Turek, 1984).

Okrem základnej suroviny sa na kvalite finálneho výrobku podieľajú aj vedľajšie suroviny, prísady a pomocné látky. Ako vyplýva z odbornej literatúry, komerčne vyrábané extrakty korenia (Saromexy) a soliace zmesi v našich podmienkach nepredstavujú významný zdroj mikrobiálnej kontaminácie. Naopak bravčové výrobne mäso, ktoré sa pridáva do všetkých druhov údených hydínových výrobkov, je pravidelným zdrojom masívnej mikrobiálnej kontaminácie diela (Zemanová a Hrubšová, 1991; Pipová a i., 1994, 1995).

Hoci všetky sledované ingrediencie podliehajú následnému tepelnému opracovaniu, nemožno podceňovať hygienické aspekty pri ich výrobe a ďalšej manipulácii. Je treba si uvedomiť, že kontaminovanú, menej hodnotnú a narušenú surovinu nikdy nemožno napraviť účinným tepelným opracovaním (Lát, 1989).

Aj keď je z uvedených výsledkov zrejmé, že v praxi používané teploty a doby expozície prítomnú mikrofóru spoľahlivo devitalizujú, treba mať na zreteli, že účinnok tepelného opracovania nikdy nie je stopercentný. Vyšší počet mikroorganizmov v použitých východiskových surovinách dáva väčší predpoklad, že niektoré z nich prežijú tepelné opracovanie, čo môže mať za následok vznik alimentárneho ochorenia.

LITERATÚRA

- HORÁKOVÁ, D. – LUKAČKA, J. (1984): Hygienické aspekty mechanickej separácie hydínového mäsa. Hyd. Priem., 26, 261–266.
- IVANOVÁ, M. – GAJDOŠ, J. (1996): Systém HACCP pri jatočnom spracovaní hrabavej hydiny. Slov. Vet. Čas., 21, 63–66.

- IVANOVÁ, M. – PIPOVÁ, M. – GAJDOŠ, J. (1995): Salmonely pri depistážnom vyšetovaní vzoriek u jatočnej hydiny. Slov. Vet. Čas., 20, 172–175.
- JARCHOVSKÁ, H. – HARTMANOVÁ, J. (1986): Mikrobiologické nálezy v drúbežim separovaném mäse. Veterinářství, 36, 312–313.
- KŇAZOVICKÁ, S. (1994): Mikrobiologické nálezy v hydinovom separovanom mäse. [Atestačná práca.] Košice, IVVVL, 50 s.
- LÁT, J. (1989): Hygienické aspekty výroby polotovár. Veterinářství, 39, 561–562.
- MATYÁŠ, Z. (1993): Analýza nebezpečí a kritické kontrolní (ochranné) body – HACCP. Brno, Bekros, 85 s.
- MOUNTNEY, G. J. (1983): Poultry Products Technology. 3rd ed. AVI Publishing Company Inc., Westport, Connecticut, 369 s.
- NESTOROV, N. – MITKOV, S. – BEJEV, K. – DAVIDOVÁ, I. – NIKOLOVÁ, R. – NIKOLOVÁ, T. (1980): Technologické, fyzikálnochemické a sanitárne vlastnosti strojovo vykoseného hydínového mäsa. Hyd. Priem., 23, 44–51.
- NEWMAN, P. B. (1981): The separation of meat from bone – a review of the mechanics and the problems. Meat Sci., 171–200.
- PIPOVÁ, M. – PLEVA, J. – IVANOVÁ, M. – BURDOVÁ, O. (1994): Mikrobiológia mechanicky separovaného hydínového mäsa. In: Zbor. XV. Hygiena alimentorum, Košice, s. 51.
- PIPOVÁ, M. – TUREK, P. – PAŽÁKOVÁ, J. – GAŠINCOVÁ, E. (1995): Microbiology of Mechanically Deboned Chicken Meat (MDCHM). In: Proc. XI. Konf. Nauk. Diagnostyka Mikrobiologiczna, Pulawy, Poland, June 20, 1995, p. 44.
- TUREK, P. (1984): Vplyv progresívnej technológie spracovania mäsa hrabavej hydiny z hľadiska dynamiky množenia *Salmonella typhimurium*. [Kandidátska dizertácia.] Košice, 135 s. – Vysoká škola veterinárska.
- ZEMANOVÁ, D. – HRUBŠOVÁ, E. (1991): Analýza hygienického rizika v hydínárskej výrobe – HACCP systém. Hydina, 33, 139–145.
- PN 8/93-K. Jemná hydínová saláma Špeciál N. 1993.
- STN 56 0083. Potravinárske výrobky. Stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů plotnovou metodou. 1986.
- STN 56 0085. Potravinárske výrobky. Stanovení počtu kóli-formních bakterií plotnovou metodou. 1986.
- STN 56 0088. Potravinárske výrobky. Průkaz bakterií rodu *Salmonella*. 1987.
- STN 56 0100. Mikrobiologické zkoušení potravin, předmětů běžného užívání a prostředí potravinářských provozoven. 1968.
- STN ISO 6888 (56 0089). Mikrobiológia. Všeobecné pokyny na stanovenie počtu *Staphylococcus aureus*. Technika počítania kolónií. 1995.
- STP 765-1/86. Mechanicky separované hydínové mäso. Smerný technologický postup, Hydínársky priemysel, koncern Bratislava, 1986.
- Výnos Ministerstva zdravotníctví a sociálních věcí ČR – hlavního hygienika ČR ze dne 15. I. 1990 o mikrobiologických požadavcích na poživatiny a jejich obaly. 71 s.

Received: 96–07–19

Accepted after corrections: 96–10–22

Kontaktná adresa:

MVDr. Monika Pí p o v á, CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/63 321 11–15, fax 095/76 76 75

IODINE DEFICIT IN FARM ANIMALS

DEFICIT JODU U HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT

Dne 13. prosince 1996 se uskutečnil ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně ve spolupráci se Zemědělskou fakultou Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích tematický seminář, věnovaný aktuální problematice deficitu jodu u hospodářských zvířat a výskytu látek se strumigenním účinkem v krmivech a napájecí vodě.

Na semináři byly předneseny tyto příspěvky:

Využitelnost jodu podaného ve formě jodidu draselného, ethylendiamin dihydrojodidu, humátu jodu a Productanu J-40 (*P. Suchý, I. Herzig, B. Písaříková, VÚVeL, Brno*): V bilančních pokusech na prasatech byla srovnávána využitelnost jodu z jodidu draselného (KI), ethylendiamin dihydrojodidu (EDDI), humátu jodu (HuI) a Productanu J-40. Vysoká využitelnost jodu byla prokázána u KI, EDDI a Productanu J-40, nižší pak u HuI. Z perspektivní lze považovat použití jodu zabudovaného v olejové bázi. Pokusy s HuI mimo jiné potvrdily vysoké vazebné vlastnosti huminových látek, a tím i nižší biologickou dostupnost jodu podaného v této formě.

Dynamika změn hladin jodu v moči a mléce při zajištění a vyloučení jeho zdrojů z krmné dávky dojníc (*J. Říha, I. Herzig, B. Písaříková, P. Suchý, VÚVeL, Brno*): Byly sledovány změny koncentrací jodu v moči a mléce dojníc při absenci doplňku jodu a při zajištění 33, 66 a 100 % jeho denní potřeby. Při 100% zajištění potřeby v krmné dávce byly nalezeny v moči a mléce dostatečně vysoké hladiny jodu. Ukončené podávání jodu provázal významný pokles koncentrace jodu v moči a mléce. Aplikace Jodonalu B na kůži mléčné žlázy zvýšila statisticky významně hladinu jodu v mléce i moči.

Odras zvýšeného příjmu jodu v jeho obsahu ve vejci (*V. Kroupová, J. Trávníček, P. Kratochvíl, Jihoče-*

ská univerzita, České Budějovice): Na nosnicích, jejichž krmná směs byla obohacena různými dávkami jodu, byl zjišťován odraz v hladinách jodu ve vaječném žloutku. Cílem je využít efektu akumulace jodu ve žloutku k zlepšení saturace lidské populace jodem.

Hmotnost a histometrické nálezy na štítné žláze u hospodářských zvířat v různých chovatelských podmínkách (*P. Kratochvíl, Jihočeská univerzita, České Budějovice*): Byly porovnány patologické a histopatologické nálezy u hospodářských zvířat v rozdílných chovatelských podmínkách a studována možnost klasifikace makroskopických nálezů strumy pomocí histologických technik, se zaměřením na zpřesnění diagnostiky těchto nálezů.

Vliv a význam strumigenů v krmivech a napájecí vodě (*B. Písaříková, I. Herzig, J. Říha, VÚVeL, Brno*): V pitných a napájecích vodách byly stanoveny hladiny dusičnanů, dusitanů, chloridů, síranů a fosfátů. Ve 14 lokalitách byly porovnány hladiny dusičnanů v napájecí vodě s obsahem jodu v moči dojníc. Se zvyšující se hladinou dusičnanů ve vodě byla zaznamenána i vyšší hladina jodu v moči, korelační analýzou zjištěný vztah byl vysoce statisticky významný.

Získané poznatky a další perspektivy výzkumu v oblasti jodové problematiky shrnuli ve svém vystoupení *doc. MVDr. I. Herzig, CSc. (VÚVeL, Brno)* a *prof. MVDr. J. Kursa, DrSc. (Jihočeská univerzita, České Budějovice)*.

Přednesené referáty vyslechli zástupci vysokých škol, výzkumných ústavů, praxe i firem působících v oblasti výživy zvířat (*Mikrop Čebín, Biofaktory Praha, Bioveta Ivanovice na Hané, ADA Detva, MERCK, Royalty BT a další*) z České republiky, Slovenské republiky, Maďarska a Ukrajiny.

MVDr. Pavel Suchý,

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

IDENTIFICATION OF SPECIES OF THE GENUS *CITROBACTER* AND THEIR PRESENCE IN RAW MATERIALS AND FOODS

IDENTIFIKACE DRUHŮ RODU *CITROBACTER* A JEJICH VÝSKYT V SUROVINÁCH A POTRAVINÁCH

E. Urbanová, Z. Páčová

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

ABSTRACT: Fifty-nine strains of bacteria were tested in study that were isolated from raw materials and foods (raw milk, farm milking parlors, sausage meat, raw potatoes, cheese, frozen oven-ready foods, confectionery products, cold dishes), and they were included in the genus *Citrobacter* using a commercial diagnostic kit ENTEROtest 16 (Lachema a.s., Brno), numeric identification program TNW (Czech Collection of Microorganisms, Faculty of Science of Masaryk University at Brno) and identification key (O'Hara et al., 1995). The results of the ENTEROtest itself, including OXI and ONPtests, did not provide satisfactory discrimination of detected strains to the level of species since 64.4% were identified by the genus by TNW program or designated as intermediary strains. Correct species identification was obtained in 33.9% only (Tab. I). Five next conventional tests (dulcitol, alpha-methyl-glucoside, raffinose, melibiose, arginine dihydrolase) were used and their results successfully specified 94.9% tested strains to the species level (Tab. I). A dichotomic identification key (O'Hara et al., 1995) enabled to classify the strains on the basis of the results of ENTEROtest 16 and two conventional tests (dulcitol, melibiosis) relatively easily, and it can be recommended for routine identification of typical *Citrobacters* from foods. Only ten strains were classified in a wrong way (16.9%) due to false results in ENTEROtest (Tab. II). Tab. III shows the strains classified wrongly by both identification systems. The tested set contained *Citrobacter braakii* in a majority of cases (30 strains), followed by *C. freundii* (17 strains), *C. youngae* (6 strains), 2 strains of genomospecies 10 and one strain of *C. koseri*, *C. amalonaticus* and *C. farmeri*. Tab. IV shows the presence of *Citrobacter* species in the particular raw materials and foods. The most frequently present species in raw materials: *C. braakii* (26 strains, 68.4%), *C. freundii* (3 strains, 7.9%) and *C. youngae* (3 strains, 7.9%). Foods contained these three species only: *C. freundii* (14 strains, 66.7%), *C. braakii* (4 strains, 19.0%) and *C. youngae* (3 strains, 14.3%). The percentage of the three most frequently present species in raw materials is substantially different from their percentage in foods (Fig. 1). The higher percentage of *C. freundii* presence in foods can be ascribed to secondary contamination.

diagnostic kit ENTEROtest 16; *Citrobacter* classification; identification systems

ABSTRAKT: Bylo testováno 59 kmenů citrobakterů izolovaných ze surovin a potravin. Nejčastěji byl zastoupen druh *C. braakii* (30 kmenů), dále *C. freundii* (17 kmenů), *C. youngae* (6 kmenů), genomospecies 10 (2 kmeny), a po jednom kmeni druhů *C. koseri*, *C. amalonaticus* a *C. farmeri*. Identifikace byla provedena na základě komerčního diagnostického setu ENTEROtest 16 a pěti dodatkových konvenčních testů, identifikačním programem TNW, resp. dichotomickým identifikačním klíčem. Programem TNW bylo správně identifikováno 94,5 % testovaných kmenů, dichotomickým klíčem 83,1 % testovaných kmenů. Druhové zastoupení citrobakterů v surovinách se výrazně lišilo od druhového zastoupení v potravinách. V surovinách nejčastěji zastoupený druh *C. braakii* (26 kmenů) tvořil 68,4 % všech izolátů, zatímco v potravinách byl jeho podíl 19%. Naopak *C. freundii* zastoupený v surovinách pouze třemi kmeny (7,9 %), tvořil v potravinách 66,7 % izolátů.

diagnostický set ENTEROtest 16; klasifikace citrobakterů; identifikační systémy

ÚVOD

Bakterie rodu *Citrobacter*, vyskytující se i jako součást střevní mikroflóry zvířat a lidí, mohou za určitých okolností působit vážné komplikace zdravotního stavu. *Citrobaktery* se podílí na infekcích močového a respiračního ústrojí, jsou izolovány z ran, méně často z případů septikémií a meningitid (Graham aj., 1981; Ullmann, 1986; Ramani aj., 1988) a příležitost-

ně z případů alimentárních onemocnění či nosokomiálních nákaz, kde vektorem je potravina (Thurm a Gericke, 1994). Rovněž u enterokolitid neznámé etiologie je přisuzována určitá role citrobakterům. V posledních několika letech rovněž narůstá počet údajů o záchytu druhů rodu *Citrobacter* u onemocnění ryb a želv (Toranzo aj., 1994). Faktem je, že vzrůstá počet izolací těchto bakterií jak v klinické praxi, tak v oblasti hygieny a kontroly potravin.

Bergeyho manuál z roku 1984 uvádí v rodě *Citrobacter* pouze tři druhy: *C. freundii*, *C. diversus*, *C. amalonaticus*. Současná klasifikace citrobakterů, na základě práce Brennera aj. (1993), zahrnuje osm druhů – *Citrobacter freundii*, *C. koseri* (dříve *C. diversus*), *C. amalonaticus*, *C. farmeri* (dříve *C. amalonaticus* biogroup 1), *C. youngae*, *C. braakii*, *C. werkmanii*, *C. sedlakii* – a tři zatím nepojmenované *genomospecies* 9, 10, 11. V roce 1995 Schauer aj. charakterizovali kmeny zařazené do *genomospecies* 9, které byly izolovány pouze od hlodavců a navrhli pro tyto kmeny druhový název *Citrobacter rodentium*.

Cílem práce byla identifikace citrobakterů izolovaných ze syroviny a potravin a zjištění výskytu nově popsaných druhů v těchto zdrojích.

MATERIÁL A METODY

Testováno bylo 59 kmenů citrobakterů izolovaných ze syrového mléka (22), stěrů ze zařízení mléčnice (4), napájecí vody (1), obsahu bachoru (1), díla pro salám /typ Poličan/ (9), syrových brambor (1), sýru /typ Eidam/ (1), mražených polotovarů (3), cukrářských výrobků (8), studené kuchyně (9). Mezi mraženými polotovary byly brambory, mrkev, zeleninové řízečky, mezi cukrářskými výrobky byly různé typy zákusků, zmrzliny, šlehačka, sušený bílek. Studená kuchyně zahrnovala

Brno) a dle dichotomického identifikačního klíče (O'Hara aj., 1995)

VÝSLEDKY

Výsledky identifikace 59 citrobakterů programem TNW jsou uvedeny v tab. I. Při použití výsledků komerčního setu ENTEROtest 16, včetně OXI a ONPtestu bylo správně druhově zařazeno jen 20 kmenů (33,9 %). Pouze rodově nebo jako intermediární kmen (jejich identifikační skóre a T-index byly na nízké hladině) bylo zařazeno 38 kmenů (64,4 %) a neidentifikován zůstal jeden kmen. Po doplnění výsledků pěti dodatkových konvenčních testů (DUL, AMG, RAF, MEL, ARG) k výsledkům ENTEROtestu 16 bylo správně identifikováno 56 kmenů (94,9 %) a to především na základě velmi dobré a výborné identifikace, převážně jako typické kmeny. Jeden kmen byl určen jako rodová identifikace a dva kmeny nebyly identifikovány.

Výsledky identifikace testovaných citrobakterů pomocí dichotomického identifikačního klíče (DIK) jsou uvedeny v tab. II. Zařazení bylo provedeno na základě kombinace testů z ENTEROtestu 16 a dvou dodatkových testů (DUL a MEL), které jsou v tomto klíči použity. Správně bylo zařazeno 49 kmenů (83,1 %). Dichotomickým klíčem bylo nesprávně zařazeno 10 kme-

I. Identifikace 59 citrobakterů programem TNW – Identification of 59 Citrobacters by TNW program

Identifikace ¹	ENTEROtest 16		ENTEROtest 16 + dodatkové testy ⁵	
	počet ⁶	%	počet ⁶	%
Správná druhová ²	20	33,9	56	94,9
Rodová a intermediární kmen ³	38	64,4	1	1,7
Neidentifikováno ⁴	1	1,7	2	3,4

¹identification, ²correct specific, ³genus identification and intermediary strain, ⁴not identified, ⁵additional tests, ⁶number

la převážně různé druhy salátů (bramborový, jarní, vajíčkový, rybí apod.) a šunkovou pěnu.

Diferenciace bakteriálních kmenů byla provedena komerčními testy: ENTEROtest 16, OXItest a ONPtest (Lachema a.s., Brno). Diagnostický set ENTEROtest zahrnuje 16 biochemických reakcí: sirovodík (H_2S), lyzin dekarboxyláza (LYS), indol (IND), ornithin dekarboxyláza (ORN), ureáza (URE), fenylalanin deamináza (PHE), eskulin (ESL), Simmons citrát (SCI), malonát (MAL), inositol (INO), adonitol (ADO), celobióza (CEL), sacharóza (SUC), sorbitol (SOR), trehalóza (TRE), manitol (MAN). Dále bylo použito pět dodatkových konvenčních testů: dulcitol (DUL), alfa-methyl-glukosid (AMG), rafinóza (RAF), melibióza (MEL), arginin dihydroláza (ARG).

Identifikace testovaného souboru citrobakterů byla provedena pomocí numerického identifikačního programu TNW (Česká sbírka mikroorganismů, Píř MU

II. Identifikace 59 citrobakterů identifikačním klíčem – Identification of 59 Citrobacters by identification key

Identifikace ¹	ENTEROtest 16 + dodatkové testy ⁵	
	počet ⁶	%
Správná druhová ²	49	83,1
Nesprávná druhová ³	10	16,9
Neidentifikováno ⁴	0	

¹identification, ²correct specific, ³wrong specific, ⁴not identified, ⁵additional tests, ⁶number

nů (16,9 %) a to především v důsledku falešných výsledků testů v ENTEROtestu 16. Falešné výsledky se vyskytovaly v komerčním setu ojediněle, především u ORN, SCI a MAL, což však jsou, pro rozlišení citrobakterů pomocí DIK, testy prioritní. U ORN byly zaznamenány čtyři falešné negativní výsledky (6,8 %),

III. Nesprávně identifikované kmeny – Wrongly identified strains

Druh ^c 1	TNW ^a		DIK ^b	
	počet ²	identifikován jako ^c 3	počet	identifikován jako ^c
<i>C. freundii</i> (17)	1	<i>C. youngae</i> (1)	3	<i>C. youngae</i> (2) <i>C. werkmanii</i> (1)
<i>C. youngae</i> (6)	1	<i>C. freundii</i> (1)	1	<i>C. freundii</i> (1)
<i>C. braakii</i> (30)	4	<i>C. youngae</i> (4)	5	<i>C. youngae</i> (3) <i>C. freundii</i> (2)
<i>C. farmeri</i> (1)			1	<i>C. amalonaticus</i> (1)
<i>Genomospecies</i> 10 (2)	2	<i>C. werkmanii</i> (1) <i>C. youngae</i> (1)		

a – numerický identifikační program TNW – numeric identification program TNW

b – dichotomický identifikační klíč – dichotomic identification key

c – v závorkách je uveden počet kmenů – strain number is given in brackets

¹species, ²number, ³identified as

IV. Zastoupení druhů rodu *Citrobacter* v surovinách a potravinách^a – The presence of species of the genus *Citrobacter* in raw materials and foods

Zdroj ¹	<i>C. freundii</i>	<i>C. koseri</i>	<i>C. amalonaticus</i>	<i>C. farmeri</i>	<i>C. youngae</i>	<i>C. braakii</i>	<i>Genomospecies</i> 10	<i>Citrobacter</i> sp.
Syrové mléko ²	1	1	–	1	2	15	1	1
Stěr mléčnice ³	–	–	–	–	–	3	1	–
Napájecí voda ⁴	–	–	–	–	–	1	–	–
Obsah bacheru ⁵	–	–	1	–	–	–	–	–
Salám dílo ⁶	2	–	–	–	–	7	–	–
Syrové brambory ⁷	–	–	–	–	1	–	–	–
Suroviny ⁸	3 (7,9)	1 (2,6)	1 (2,6)	1 (2,6)	3 (7,9)	26 (68,4)	2 (5,3)	1 (2,6)
Sýr ⁹	1	–	–	–	–	–	–	–
Mražené polotovary ¹⁰	2	–	–	–	1	–	–	–
Cukrářské výrobky ¹¹	4	–	–	–	1	3	–	–
Studená kuchyně ¹²	7	–	–	–	1	1	–	–
Potravin ¹³	14 (66,7)				3 (14,3)	4 (19,0)		
Celkem ¹⁴	17 (28,8)	1 (1,7)	1 (1,7)	1 (1,7)	6 (10,2)	30 (50,8)	2 (3,4)	1 (1,7)

a – v závorkách jsou uvedena procenta – per cent is given in brackets

¹source, ²raw milk, ³milk room smear, ⁴feedwater, ⁵rumen contents, ⁶sausage meat, ⁷raw potatoes, ⁸raw materials, ⁹cheese, ¹⁰frozen oven-ready foods, ¹¹confectionery products, ¹²cold dishes, ¹³foods, ¹⁴total

falešně pozitivní výsledky byly zjištěny u SCI třikrát (5,1 %) a u MAL jednou (1,7 %).

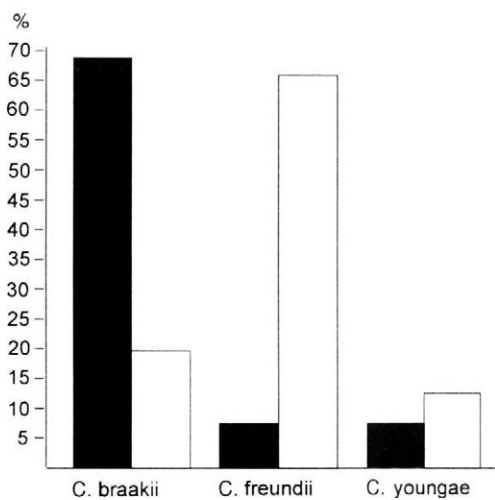
Oba identifikační systémy tedy měly určité procento nesprávně zařazených kmenů. Jejich přehled je uveden v tab. III. Program TNW nemá v sobě prozatím zahrnutou specifikaci pro *genomospecies* 10 a 11, proto dva námi určené kmeny *genomospecies* 10 zařadil k jinému druhu. Také námi nespecifikovaný druh (jeden kmen – *Citrobacter* sp.) nebylo možno pro slabou diskriminaci exaktně zařadit.

Tab. IV uvádí celkové zastoupení citrobakterů v testovaném souboru a porovnání výskytu jednotlivých druhů v surovinách a potravinách. V testovaném souboru 59 citrobakterů byly zastoupeny druhy: *C. braakii* (30 kmenů), *C. freundii* (17 kmenů), *C. youngae* (6 kmenů), *genomospecies* 10 (2 kmeny) a po jednom

kmeni druhy *C. koseri*, *C. amalonaticus* a *C. farmeri*. Jeden kmen nebyl zařazen do druhu (*Citrobacter* sp.). V surovinách byl nejčastěji zastoupen *C. braakii* (26 kmenů, 68,4 %), *C. freundii* (3 kmeny, 7,9 %) a *C. youngae* (3 kmeny, 7,9 %). V potravinách byly zastoupeny pouze tyto tři druhy: *C. freundii* (14 kmenů, 66,7 %), *C. braakii* (4 kmeny, 19,0 %) a *C. youngae* (3 kmeny, 14,3 %). Procentuální zastoupení tří nejfrekvencovanějších druhů v surovinách se výrazně liší od jejich zastoupení v potravinách (obr. 1).

DISKUSE

Specifikace nových druhů rodu *Citrobacter* proběhla na základě hybridizace DNA (Brenner aj., 1993;



1. Výskyt tří nejčastěji izolovaných druhů citrobakterů v surovinách a potravinách – Presence of the three most frequently isolated species of *Citrobacter* in raw materials and foods

■ surovina – raw material
□ potravina – food

Schauer aj., 1995). Bylo rozlišeno 11 genomospecies, tedy skupin DNA-příbuzných kmenů, jejichž fenotypické znaky umožňují rozlišení devíti druhů a dvou genomospecies. V testovaném souboru 59 kmenů citrobakterů, které byly z větší části izolovány v předchozích letech a zařazeny do tehdy tří platných druhů *C. freundii*, *C. diversus*, *C. amalonaticus*, jsme nyní identifikovaly sedm různých druhů citrobakterů. Všechny tyto druhy lze dle Brennera aj. (1993) izolovat ze zvířat, potravin a vody.

Úspěšnost zařazení kmenů citrobakterů do nově uznaných druhů komerčními diagnostickými systémy závisí jednak na rozsahu a skladbě biochemických testů v těchto soupravách, a jednak na tom, zda je charakteristika nových druhů zahrnuta do databáze identifikačních systémů. V práci jsme použily novou verzi komerčního setu – ENTEROtest 16 a dva identifikační systémy (TNW a DIK). V databázi systému TNW jsou zařazeny nově pojmenované druhy rodu *Citrobacter*, ne však nepojmenované *genomospecies 10 a 11 a C. rodentium*. DIK je orientační identifikační klíč (O'Hara aj., 1995) zahrnující všechny platné druhy citrobakterů, včetně genomospecies. Při použití ENTEROtestu 16 (včetně OXI a ONP) bylo správně druhově zařazeno programem TNW jen 20 kmenů. Rodově nebo jako intermediární kmen bylo zařazeno 38 kmenů, z nichž však u 30 kmenů odpovídalo první přidělené druhové jméno, programem TNW, správné identifikaci. Osm nesprávně zařazených kmenů je uvedeno v tab. III. Rozšíření počtu biochemických testů komerčního kitu ENTEROtest 16 o pět konvenčních testů přispělo významně ke zvýšení správné druhové identifikace

(tab. I), a to na 94,5 %, převážně se slovním vyjádřením velmi dobrá a výborná identifikace.

O'Hara aj. (1995) ověřovali pět komerčních systémů (API 20E, Biolog, Rapid onE, Vitek GNI, Walk/Away Rapid Neg ID2), pro jejich schopnost identifikovat nové druhy citrobakterů. Vzhledem k tomu, že databáze těchto identifikačních systémů neobsahovaly nové druhy, jejich identifikace byla neúspěšná a testované kmeny zařadily buď jako citrobaktery tří původních druhů (*C. freundii*, *C. koseri*, *C. amalonaticus*) nebo jako jiné druhy čeledi *Enterobacteriaceae*. K obdobným výsledkům vedlo i ověřování nového identifikačního systému pro gramnegativní bakterie (Crystal Enteric/Non-Fermenter) publikované autory Wauters aj. (1995).

Pro rychlou orientační identifikaci citrobakterů v rutinních diagnostických laboratořích doporučují O'Hara aj. (1995) jednoduchý dichotomický klíč, založený na sedmi konvenčních testech s vysokou diskriminační schopností. V naší práci jsme použily DIK na základě výsledků pěti testů z komerčního setu ENTEROtest 16 (ORN, MAL, IND, URE, SCI) a dvou konvenčních dodatkových testů (DUL, MEL) k úspěšnému druhovému zařazení 49 (83,1 %) námi testovaných kmenů. Nesprávně bylo zařazeno 10 kmenů (16,9 %) – tab. III. DIK tedy můžeme doporučit pro orientační identifikaci citrobakterů ze surovin a potravin.

Z hlediska hygieny potravin je významnou částí naší práce stanovení poměrů v zastoupení jednotlivých druhů rodu *Citrobacter* v surovinách a potravinách. Z tab. IV a obr. 1 jsou patrné výrazné rozdíly v zastoupení jednotlivých druhů citrobakterů v námi testovaných komoditách. Ze surovin jsme izolovali rozmanité druhy citrobakterů, kdežto z potravin jen tři druhy (*C. freundii*, *C. braakii*, *C. youngae*), z čehož vyplývá, že ve veterinární oblasti, nebo v prvovýrobě potravin se můžeme setkávat s větší druhovou rozmanitostí, než v hotových potravinách. V surovinách nejčetněji zastoupený druh *C. braakii* (26 kmenů) tvořil 68,4 % všech izolátů, zatímco v potravinách byl jeho podíl jen 19 %. Naopak *C. freundii* zastoupený v surovinách pouze třemi kmeny (7,9 %), tvořil v potravinách 66,7 % izolátů. Vysoké procento výskytu *C. freundii* v potravinách připisujeme sekundární kontaminaci. V této domněnce nás podporují práce autorů, kteří izolovali citrobaktery z klinického materiálu, kde převahu měly druhy *C. freundii*, *C. youngae* a *C. koseri* (Brenner aj., 1993; Thurm a Gericke, 1994; Janda aj. 1994). Druh *C. braakii*, který je v naší práci dominantním druhem (50, 8 %), byl v souborech těchto autorů zastoupen v rozmezí 8 až 20 %. Kmeny ostatních druhů se vyskytovaly v klinickém materiálu ojediněle, stejně jako v našem souboru. Druhová rozmanitost, kterou jsme prokázaly v surovinách, byla potravinářskými technologickými postupy výrazně potlačena a převládalo složení citrobakterů blízké klinickému materiálu.

LITERATURA

- BRENNER, D. J. – GRIMONT, P. A. D. – STEIGERWALT, A. G. – FANNING, G. R. – AGERON, E. – RIDDLE, C. F. (1993): Classification of citrobacteria by DNA hybridization: Designation of *Citrobacter farmeri* sp. nov., *Citrobacter youngae* sp. nov., *Citrobacter braakii* sp. nov., *Citrobacter werkmanii* sp. nov., *Citrobacter sedlakii* sp. nov., and three unnamed *Citrobacter* genomospecies. Int. J. Syst. Bact., 43, 645–658.
- GRAHAM, D. R. – ANDERSON, R. L. – ARIEL, F. E. – EHRENKRANZ, N. J. – ROWE, B. – BOER, H. R. – DIXON, R. E. (1981): Epidemic nosocomial meningitis due to *Citrobacter diversus* in neonates. J. Infect. Diseases, 144, 203–209.
- JANDA, J. M. – ABBOTT, S. L. – CHEUNG, W. K. W. – HANSON, D. F. (1994): Biochemical identification of citrobacteria in the clinical laboratory. J. Clin. Microbiol., 32, 1850–1854.
- O'HARA, C. M. – ROMAN, S. B. – MILLER, J. M. (1995): Ability of commercial identification systems to identify newly recognised species of *Citrobacter*. J. Clin. Microbiol., 33, 242–245.
- RAMANI, A. – KUNDAJE, G. N. – RAO, M. S. – SHIVANANDA, P. G. – RAMANI, R. (1988): *Citrobacter* as a frequent urinary pathogen in hospitalised patients. Indian J. Med. Res., 88, 23–25.
- SCHAUER, D. B. – ZABEL, B. A. – PEDRAZA, I. F. – O'HARA, C. M. – STEIGERWALT, A. G. – BRENNER, D. J. (1995): Genetics and biochemical characterization of *Citrobacter rodentium* sp. nov. J. Clin. Microbiol., 33, 2064–2068.
- THURM, V. – GERICKE, B. (1994): Identification of infant food as a vehicle in a nosocomial outbreak of *Citrobacter freundii*: Epidemiological subtyping by allozyme, whole-cell protein and antibiotic resistance. J. Appl. Bact., 76, 553–558.
- TORANZO, A. E. – CUTRÍN, J. M. – ROBERSON, B. S. – NÚÑEZ, S. – ABELL, J. M. – HETRICK, F. M. – BAYA, A. M. (1994): Comparison of the taxonomy, serology, drug resistance transfer, and virulence of *Citrobacter freundii* strains from mammals and poikilothermic hosts. Appl. Environ. Microbiol., 60, 1789–1797.
- ULLMANN, U. (1986): Bakterielle Infektionserreger bei hospitalisierten Patienten. Zentbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg., B 183, 103–113.
- WAUTERS, G. – BOEL, A. – VOORN, G. P. – VERHAEGEN, J. – MEUNIER, F. – JANSSENS, M. – VERBIST, L. (1995): Evaluation of a new identification system, Crystal Enteric/Non-Fermenter, for gram-negative bacilli. J. Clin. Microbiol., 33, 845–849.

Received: 96-06-18

Accepted: 96-09-04

Kontaktní adresa:

RNDr. Eva Urbanová, CSc., Česká sbírka mikroorganismů, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Tvrdeho 14, 602 00 Brno, Česká republika,
Tel.: 05/33 72 31, fax 05/41 21 12 14

GOOD NEWS

SCI Journal Citation Reports 1995 present the last survey of impact factors. Just the fact of including our journal *Veterinary Medicine – Czech* into the database of the Institute of Scientific Information is a good sign of acknowledgment of the level of the journal. National journals cannot be simply compared with the international ones with a long tradition, issued fully in English, with large circulation and available nearly in every library. In the section Veterinary Sciences there are 94 journals. Specialized journals *Theriogenology*, *Animal Genetics* and *Domestic Animal Endocrinology* have the highest impact factor. *Veterinary Medicine – Czech* has reached 59th position with an impact factor 0.250. The result of 1995 is the best one ever since. The authors of our journal could contribute further to this success by high professional level of their papers, by publishing in English, and by distributing the reprints to other colleagues who are working in the same field. There is still much to do for further improvement. However, the result of 1995 presents an encouraging message.

Impact factors of the journal *Vet. Med.-Czech*

1988	0.060
1989	0.090
1990	0.080
1991	0.112
1992	0.028
1993	0.078
1994	0.088
1995	0.250

Veterinary Sciences (94 journals), impact factor 1995

1. <i>Theriogenology</i>	1.395
2. <i>Anim Genet</i>	1.354
3. <i>Domest Anim Endocrin</i>	1.254
59. <i>Vet Med-Czech</i>	0.250
62. <i>Wien Tierarztl Monat</i>	0.243
63. <i>Berl Munch Tierarztl</i>	0.234
64. <i>Deut Tierarztl Woch</i>	0.231
69. <i>Acta Vet Hung</i>	0.172
76. <i>Monatsh Veterinarmed</i>	0.122
79. <i>Arch Vet Med</i>	0.111
83. <i>Vet Med-US</i>	0.085
84. <i>Acta Vet Brno</i>	0.079
86. <i>Tijdschr Diergeneesk</i>	0.060
91. <i>Magy Allatorvosok</i>	0.023

DOBRÁ ZPRÁVA

SCI Journal Citation Reports 1995 vyjadřuje význam časopisů impakt faktorem, vypočítaným podle počtu citací prací, které v nich byly uveřejněny. Již zařazení mezi sledované časopisy a uvádění jejich obsahu v databázích Institute of Scientific Information, jako například v *Current Contents*, je uznáním významu časopisu. České, ale i jiné národní časopisy se nemohou srovnávat s mezinárodními časopisy s velkou tradicí, vycházejícími v angličtině a ve vysokých nákladech a nechybějícími v žádné odborné knihovně. Ve skupině veterinárních věd jsou uváděny 94 časopisy. Nejvyšší impakt faktor mají tematicky vyhraněné časopisy *Theriogenology*, *Animal Genetics* a *Domestic Animal Endocrinology*. Veterinární medicína se umístila na 59. místě s impakt faktorem 0.250, což je dosud jejím nejlepším hodnocením. Při velmi malém nákladu našeho časopisu a při jeho minimální dostupnosti v zahraničních knihovnách mohou autoři publikací ve Veterinární medicíně přispět k dalšímu zvýšení významu časopisu především vysokou odbornou úrovní svých příspěvků, jejich uveřejňováním v angličtině a zasíláním separátů svým partnernům, kteří pracují a publikují ve stejném oboru i bez jejich vyžádání. Je třeba vyvinout ještě mnoho úsilí a vytrvalosti k dalšímu zlepšení a udržení dobrého hodnocení. Výsledek roku 1995 však považujeme za dobrou zprávu.

Karel Hruška

POKYNY PRO AUTORY

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

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

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

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

Rukopis má být napsán na papíře formátu A4 (30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, mezi řádky dvojitě mezery). K rukopisu je vhodné přiložit disketu s textem práce, popř. s grafickou dokumentací pořízenou na PC s uvedením použitého programu. Tabulky, grafy a fotografie se dodávají zvlášť, nepodlepují se. Na všechny přílohy musí být odkazy v textu.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CONTENTS

Faixová Z., Várady J.: Amino acid uptake by the sheep rumen epithelium	61
Chroust K.: Control of gastrointestinal helminth infections in lamb pasture rearing	67
Benda P., Vyleťlová M.: Testing of TKT medium for <i>Streptococcus agalactiae</i> screening in bulk milk samples	71
Pipová M., Turek P., Laciaková A., Ivanová M., Plachá I.: Changes in microbial parameters during the production of fine poultry salami	81
Urbanová E., Páčová Z.: Identification of species of the genus <i>Citrobacter</i> and their presence in raw materials and foods	87
INFORMATION	
Suchý P.: Iodine deficit in farm animals	86
Hruška K.: Good news	92

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 42, č. 3, Březen 1997

OBSAH

Faixová Z., Várady J.: Zadržanie aminokyseliny v bachorovom epiteli oviec	61
Chroust K.: Tlumení gastrointestinálních helmintů při pastevním odchovu jehňat	67
Benda P., Vyleťlová M.: Ověření TKT média pro screening <i>Streptococcus agalactiae</i> v bazénových vzorcích mléka	71
Pipová M., Turek P., Laciaková A., Ivanová M., Plachá I.: Zmeny mikrobiálneho obrazu v priebehu technologického procesu výroby jemnej hydinovej salámy	81
Urbanová E., Páčová Z.: Identifikace druhů rodu <i>Citrobacter</i> a jejich výskyt v surovinách a potravinách	87
INFORMACE	
Suchý P.: Deficit jodu u hospodářských zvířat	86
Hruška K.: Dobrá zpráva	92