

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

5

VOLUME 43
PRAHA
MAY 1998
CS ISSN 0375-8427

Mezinárodní vědecký časopis vydávaný z pověření Ministerstva zemědělství České republiky a pod gescí České akademie zemědělských věd

An international journal published under the authorization by the Ministry of Agriculture and under the direction of the Czech Academy of Agricultural Sciences

Editorial Board – Redakční rada

Chairman – Předseda

Prof. MVDr. Karel Hruška, CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Members – Členové

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

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

Dr. Milan Fránek, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

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

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

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 Kovářů, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. Dr. Jozef Laurinčík, DrSc., Institute of Genetics and Experimental Biology, RIAP, Nitra, Slovak 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

World Wide Web (URL): <http://www.clark.cz/vri/casopis.htm>

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

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

Periodicita: Časopis vychází měsíčně (12x ročně), ročník 43 vychází v roce 1998.

Přijímání rukopisů: Rukopisy ve třech 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: editor@login.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 1998 je 624 Kč.

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

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

Periodicity: The journal is published monthly (12 issues per year), Volume 43 appearing in 1998.

Acceptance of manuscripts: Three 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: editor@login.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 1998 is 145 USD (Europe), 152 USD (overseas).

OCCURRENCE OF ANTIBODIES TO THE SPERMS IN BLOOD SERA OF BULLS AND BOARS

VÝSKYT PROTILÁTEK PROTI SPERMIÍM V KREVNÍM SÉRU BÝKŮ A KANCŮ

Z. Zralý, J. Bendová, M. Šišák, I. Diblíková, D. Švecová, A. Zajícová, Z. Věžník

Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: Blood sera obtained from 2 064 bulls randomly selected in artificial insemination stations and bull rearing stations were examined for the presence of autoantibodies to the sperms (AbS) using the developed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). At serum dilution 1 : 40 the incidence of positive bulls was 26.7%. In individual investigation periods the incidence of AbS ranged between 9 and 39.7%. In a set of 586 bulls the presence of antibodies to *Chlamydia* sp. was detected in blood sera in 32.1% by a micromethod of complement binding. The possibility of involving genital infection as one of several factors taking part at the development of AbS is discussed. Examination of blood sera of 981 boars for the presence of AbS by ELISA method revealed positivity only in 7.74%.

bull; boar; autoantibodies to the sperms; enzyme-immunoanalytical method

ABSTRAKT: Krevní séra získaná od 2 064 býků náhodně vybraných z inseminačních stanic a odchoven plemenných býků byla vyšetřena na přítomnost autoprotilátek proti spermiím (AbS) vyvinutou enzymoimunoanalytickou metodou (ELISA). Výskyt pozitivních býků při ředění séra 1 : 40 činil 26,7 %. V jednotlivých obdobích sledování se incidence AbS pohybovala mezi 9 až 39,7 %. U souboru 586 býků byla zjištěna v krevním séru přítomnost protilátek proti *Chlamydia* sp. mikrometodou vazby komplementu v 32,1 %. Je diskutována možnost uplatnění genitální infekce jako jednoho z mnoha faktorů při vzniku AbS. Vyšetřením krevního séra 981 kanců ELISA metodou na přítomnost AbS byla zjištěna pozitivita pouze v 7,74 % případů.

býk; kanec; autoprotilátky proti spermiím; enzymoimunoanalytická metoda

INTRODUCTION

The development of artificial insemination (AI) underlined the role of breeding males in animal husbandry as the carriers of both positive and negative characters. For these reasons it is necessary that the breeding male guarantees not only high performance but also good health, stability of internal milieu, regular reproduction and good adaptability (Věžník and Švecová, 1992). The problems concerning spermatology and andrology require an increasing attention, as stated by Rodrigues-Martinez et al. (1996) who lay the emphasis on the need of quality prediction of ejaculates prior their use for long-term preservation, and in AI practice. Evaluation of functional level of the breeding male made so far consisted of the evaluation of spermogenic and endocrine activity of testicular parenchyma. Examinations should include also the assessment of selected immunological indices which might have a negative impact, as a complex evaluation of all the indices is a prerequisite of an effective assessment of breeder's quality for its further use.

One of the immunological factors are antibodies to the sperms (AbS). Sperms and their precursors show relatively strong antigenic traits. Under physiologic conditions the antigenic structures of sperms and their precursors are divided from immunocompetent cells by a hematogenous barrier (Johnson, 1973). Changes in the barrier functions or increased activity of the immune system are essential factors involved in the formation of AbS.

In human medicine formation of AbS is one of the most carefully examined problems of reproductive immunology taking part at the fertilization process (Benet-Rubin et al., 1991; Nouza et al., 1992 and others). Immunity response can be either local, reduced to a certain part of the genitals, or general which includes blood-circulating antibodies. In this respect most of the published research concerning immunological impacts on fertility have been performed in humans and on laboratory animals. Papers on the importance of AbS in relation to infertility of farm animals are sporadic (Fayemi et al., 1992). Objective of the study was to develop and test the method of AbS

diagnostics in blood sera of bulls and boars so that it could be used in animals kept in artificial insemination stations of bulls and boars, and rearing stations of bulls.

MATERIAL AND METHODS

Experimental animals

Incidence of AbS has been monitored in the total of 2 064 bulls (12 to 72 months old) randomly selected in bull rearing stations and artificial insemination stations in the period 1994–1997. Blood sera of 433 bulls from 14 locations, of 526 bulls from 5 locations, of 515 bulls from 8 locations, and 590 bulls from 8 locations have been examined in 1994–1997, respectively. Incidence of AbS in blood sera has been assessed only at serum dilution 1 : 40 in 1994 and 1995, in the following two years differentiation of titre levels has been done. In 590 bulls a simultaneous examination for the detection of antibodies to *Chlamydia* sp. has been performed in 1997. A set of 981 breeding boars (10–55 months old) from 20 different artificial insemination has been examined for the incidence of AbS as well as for the presence of antibodies to *Chlamydia* sp. The obtained sera had been kept at -18°C until further use.

Preparation of bull sperm antigen

Bull's ejaculate of a desired quality (minimum concentration 1.2 mil/mm^3 sperms, motility 60%, 80% normal sperms) was centrifuged at 500 G for 5 min to separate the sperms from seminal plasma. One ml of resuspended sperms was in a phosphate buffer (PBS, pH 7.2) diluted with 9 ml PBS, shaken and centrifuged under the same conditions as above. After the final decantation the sperms were resuspended in 4 ml of PBS and stored shortly at 4°C . For antigen extraction a 1 ml sample of washed sperms diluted with 9 ml PBS was used. The sample was exposed to an ultrasound of frequency 20 kHz, in a bath WG 160/320 TA (Tesla, Czech Republic) for 5 min. Then the suspension was centrifuged at 500 G for 10 min. Basic dilution of the antigen was obtained by addition of 0.5 supernatant into 4.5 ml of binding buffer (5 g NaHCO_3 /l distilled water, pH 8.6).

Binding of antigen on the microtitre plate wall

The obtained antigen was diluted with a binding buffer 1 : 50, then 50 μl was pipetted into the wells of microtitre plate P for ELISA tests (Gama, Czech Republic) and incubated at 37°C for 2 h. Unbound antigen was sucked out and the plates were left to dry. The plates with bound antigen were kept at 4°C until analysing.

Determination of AbS in bull's blood sera by ELISA

The plates with bound antigen were twice washed with a washing solution (0.5 g Tween 20/l working

solution PBS). Working solution was prepared by dilution of 50 ml stock solution PBS with 950 ml of distilled water. Stock solution consists of 80 g NaCl, 29 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$, 2 g KH_2PO_4 , 2 g KCl into 500 ml distilled water.

200 μl of a thinning solution (0.5 g lactate albumin hydrolyzate/100 ml washing solution) were pipetted into the row A of a microtitre plate, and 100 μl into the other ones. Then 5 μl of the examined serum was pipetted into the row A of the plate in the following sequence: into the column 1 only thinning solution for the detection of nonspecific reactions, into the column 2 negative control sera, into the column 3 positive control sera followed by unknown samples. From this basic dilution 1 : 40 gradual dilutions 1 : 80, 1 : 160 and 1 : 320 were obtained by transfer of 100 μl into another row. Incubation of the diluted samples was performed in a humid chamber at the laboratory temperature for 90 min. Negative sera were obtained from young bulls and heifers up the age of 6 months. Positive sera were obtained from bulls and heifers immunized with bull sperms.

After incubation the plate was washed three times in a rinsing solution and was reincubated with 100 μl /well of swine immunoglobulines against bovine ones labelled with peroxidase (SwAB x Px, dilution 1 : 1200, Sevac, Czech Republic) in a humid chamber at the laboratory temperature for 60 min.

Into the well, washed three times, 100 μl /well of substrate – 38 mg of 5-aminosalicylic acid (Fluka)/10 ml of distilled water with 1 ml 0.07% hydrogen peroxide was pipetted. Substrate solution was prepared immediately prior the use. Incubation was done at the laboratory temperature for 45 min.

Absorbance measurement

Colour intensity of individual wells was measured after finishing the incubation using a photometer iEMS reader MF (Labsystems, Finland) at wave length 492 nm and evaluation was done by means of a computer program Genesis.

Interpretation of the results

As positive reactions were considered the samples of examined sera in which the absorbance values were more than two-fold higher compared with negative control sera. Intraassay variation coefficient was obtained by repeated examination (11x) in different dilutions of positive and negative sera. Interassay variation coefficient was obtained from 5 examination series of positive and negative samples in different dilutions performed within one week. Variation coefficients were calculated using the program STAT Plus (Matoušková et al., 1993). Reproducibility of the determination expresses the level of repeatability for the method (100% minus variation coefficient).

ELISA method for the detection of AbS in blood sera of boars

Development and testing the method was similar to that in ELISA for the detection of AbS in blood sera of bulls. Boar's sperms from ejaculates of a desired quality (minimum concentration 300,000/mm³; 70% normal sperms, motility 60%) were used as an antigen. Further procedures were the same as above except the conjugate used. In this case rabbit anti-swine immunoglobulines labelled with peroxidase (RASw x Px, dilution 1 : 1200; Sevac, Czech Republic) were used.

Immunoperoxidase assay (IPAMA)

The basis and method of the assay is the same as ELISA method except some differences. The sperms (200 000/mm³) as an antigen were, following a smear, fixed on a slide using frozen solution methanol - acetone (1 : 1). Incubation periods are shorter than in ELISA: 30 min for a serum, 45 min for a conjugate and from 5 to 60 min for a substrate. Diaminobenzidine (Lachema, Czech Republic) was used as a substrate at a dose 8 mg/20 ml of a working solution PBS, prior to use of the solution 20 µl of concentrated hydrogen peroxide was added. All washing procedures are the same as in ELISA. The brown colour of acrosome or other sperm parts in the patch of the tested serum is compared with the positive and negative controls using light microscopy. Regarding a limited applicability, the IPAMA assay was used only for the visualisation of the AbS reaction with sperms using scanning electron microscopy (SEM). Conventional methods of fixation, dehydration, drying in a critical point with liquid nitrogen and gold plating (Polaron Equipment Ltd., England) were used. Assessment of the reactions was done by a scanning electron microscope (Tesla BS 300, Czech Republic).

Detection of antibodies to *Chlamydia* sp.

With regard to a large number of the examined sera a micromethod of complement binding (RVK) was chosen based on the described techniques (Sever, 1962). A genus specific antigen *Chlamydia psittaci* for RVK (Bioveta, Ivanovice na Hané, Czech Republic)

was used. Blood serum dilution 1 : 20 was regarded as a positive finding.

Evaluation of the results

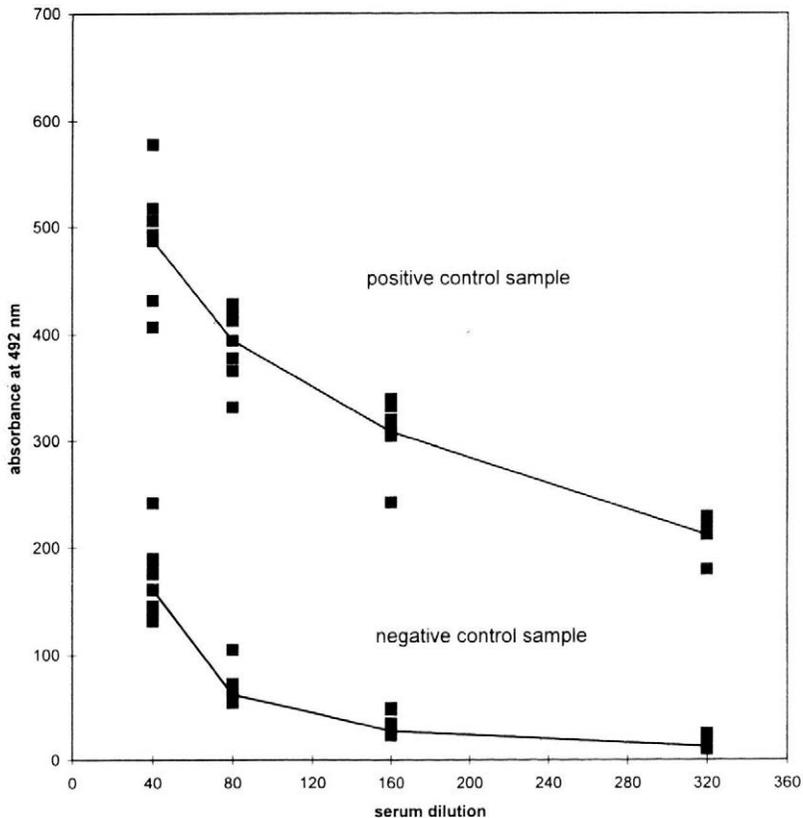
Basic statistical characteristics were set up from the obtained data. To evaluate the significance of differences in the examined indices, current statistical methods as Chi-squared test and the difference test of two relative values were used by means of a computer program STAT Plus v.1.10 (Matoušková et al., 1993).

RESULTS AND DISCUSSION

Two enzymeanalytical methods (ELISA) for the detection of antibodies to the sperms (AbS) in blood sera of bulls and boars have been developed in the course of the investigation. The method is based on a sandwich titration of AbS present in the tested serum, which react with an antigen obtained from the suspension of washed sperms, bound on the wall of a microtitre plate. Following incubation and washing, the bound antibodies were detected with labelled antiglobulines and a substrate. Reaction intensity was measured by a photometer. At the repeated examinations of positive and negative bovine control sera the following parameters of the method have been obtained (Fig. 1). The values of intraassay variation coefficients, after dilution of the negative sera, ranged between 7.27 and 20.3%, and between 5.96 and 11.8% in positive sera, which guaranteed the reproducibility of the results from 79.7 to 94.04%. Interassay variation coefficients ranged between 11.2 and 23.5% and 8.43 and 11.5% for negative and positive sera, respectively (Tab. I). In ELISA determination of AbS in blood sera of boars the intraassay reproducibility was 80.76 to 96.21% for negative and positive sera, and interassay reproducibility ranged between 75.5 and 88.39%. The obtained results revealed that the developed ELISA method for the detection of AbS in blood sera of bulls and boars offered a sufficient reproducibility and was comparable with other methods mentioned by Wolff and Schill (1985), Fayemi et al. (1990), who used the second antibody labelled either by alkaline phosphatase or biotin and streptavidin peroxidase and the corresponding substrates.

I. Reproducibility of the results of AbS determination in blood sera of bulls using ELISA method

Titre	Positive serum				Negative serum			
	Intraassay variation coefficient (%)	Reproducibility (%)	Interassay variation coefficient (%)	Reproducibility (%)	Intraassay variation coefficient (%)	Reproducibility (%)	Interassay variation coefficient (%)	Reproducibility (%)
1 : 40	11.80	88.20	11.50	88.50	7.27	92.73	15.80	84.20
1 : 80	8.56	91.44	9.27	90.73	9.06	90.94	11.20	88.80
1 : 160	5.96	94.04	10.40	89.60	10.24	89.76	15.90	84.10
1 : 320	9.60	90.40	8.43	91.57	20.30	79.70	23.50	76.50

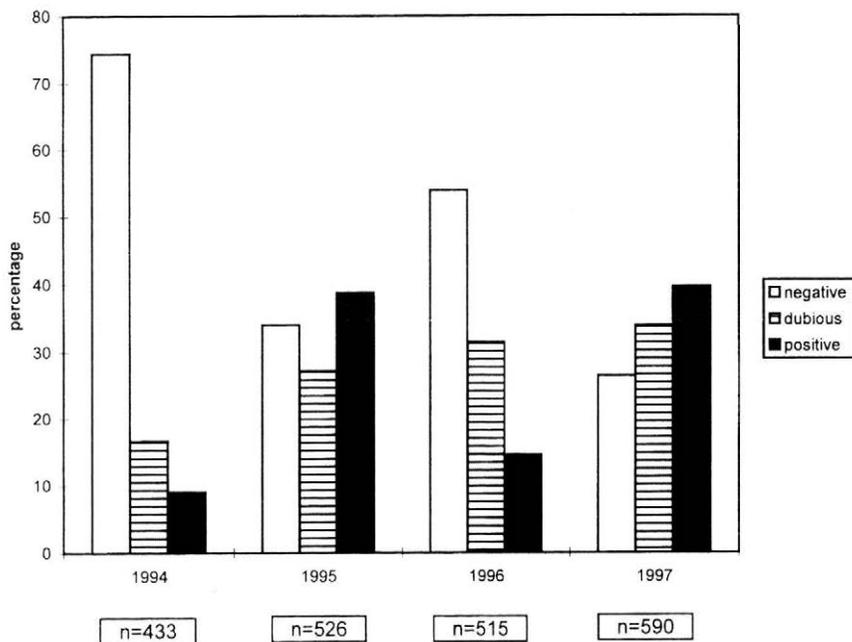


1. Results of the repeated determination of AbS in blood sera of bulls using ELISA method

In the period of four years ELISA method was used for examination for 2 064 bull's blood sera of which 552 (26.7%) were positive at serum dilution 1 : 40. Incidence of antibodies to the sperms in individual years of the investigation is shown in Fig. 2 and Tab. II. The findings of positive titres ranged between 9.01 and 39.66% over the investigated period. Regarding the fact that there are only scarce information in the literature on the incidence of antibodies in bulls, data on the frequency of these antibodies in boar's population (Fayemi et al., 1992) can be used for basic orientation. The authors found out in swine herds 22% of animals positive to AbS in blood sera, and in boars aged more than 13 months 39% of positive animals were found. In our investigations higher incidence of bulls with AbS was found especially in 1995 and 1997. No significant difference was observed in the incidence of positive animals kept in artificial insemination stations and bull rearing stations (25.4 and 28.3%). The analysis of AbS titres performed in a set of animals in 1996 and 1997 revealed that at serum dilution 1 : 40 the findings were 68 and 61.1%, respectively. The titres

1 : 80 were found in 12 and 27.3%, respectively; the titres 1 : 160 in 5.3 and 9.0%, respectively; and the titres 1 : 320 in 14.7 and 2.6%, respectively. Although Husted and Hjort (1975) did not find a strict correlation between blood sera titres and seminal plasma titres, higher titres were always detected in blood serum which supports their assumption that only after obtaining a certain level, the AbS can transudate into the seminal plasma. The binding of AbS on the surface of sperm antigens might result in agglutination of the sperms, inhibition of metabolic processes, reduced motility, disability of sperm penetration into the oocyte, and enhanced embryonal mortality (Bronson et al., 1984). The effect of an antibody depends on its specificity to autoantigenes which are in different sperm parts. Figs. 3 and 4 show the binding of an antibody to the sperm at the immunoperoxidase assay using a scanning electron microscope when in a positive serum the reaction with sperm acrosomes is apparent.

The presence of AbS is a reaction of different immunity response that can lead, in dependence on an isotype, antibody specificity and a titre, to a changed



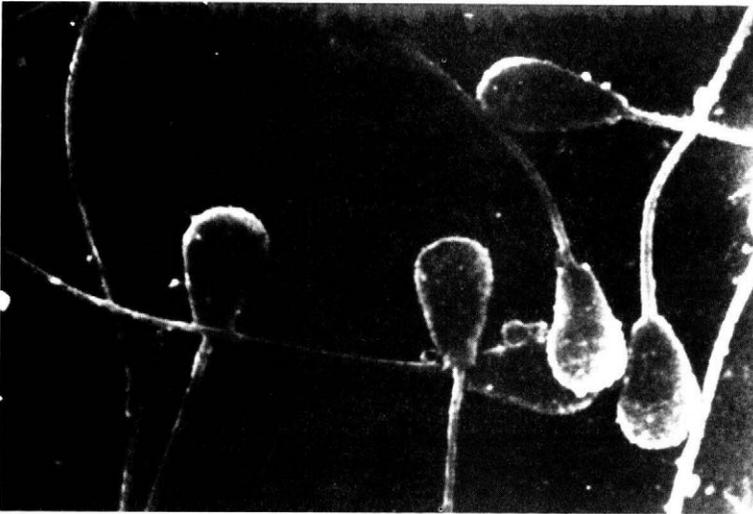
2. Incidence of AbS in blood sera of the investigated bulls

II. Incidence of AbS in blood sera of the investigated bulls

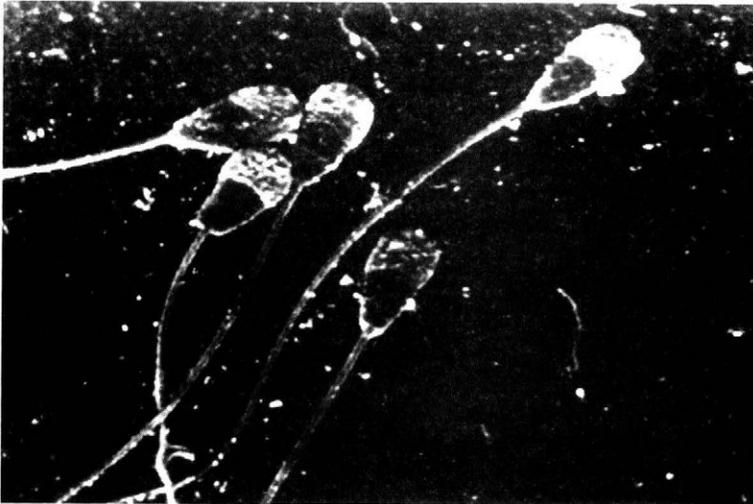
	1994		1995		1996		1997	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Negative	322	74,36	179	34,03	278	53,98	156	26,44
Dubious	72	16,63	143	27,19	162	31,46	200	33,90
Positive	39	9,01	204	38,78	75	14,56	234	39,66
Total	433		526		515		590	

sperm function (Bronson et al., 1984). The sperms are autoimmunogenic especially because their common development is performed behind the haematotesticular barrier and that the development is delayed regarding the creation of tolerance to their own antigens. Johnson (1973) stated that the barrier between blood and testes is created by firm connections in Sertoli's cells which divide the seminiferous tubules into basal and adluminal parts. This barrier is reduced or is missing in rete testis and vasa efferentia (locus minoris resistentiae) from where the antigenic components can come out or the cells of the immunity system can come in. Generally, the autoantibodies are formed at increased immunity reaction of an organism or damage of the above barrier (Haas and Beer, 1986). Primarily AbS can be formed following inflammations of both infection and noninfection origin (high and low temperature, trauma) or secondary by obstruction of testicular efferent ducts.

The mentioned facts revealed that genesis of AbS is of polyfactorial character. Variations in the incidence of AbS in the investigated sets can be due to a series of effects. Retrospective analysis of climatological data in one artificial insemination station of bulls showed in individual years great differences in the average daily air temperature, and in the number of summer and tropical days. Heat stress affects significantly the thermoregulatory mechanisms of testes which results in impaired quality of ejaculate and functional changes of haematotesticular barrier. Different resistance of the breeds and their cross-breeds to thermal stress was determined by Johnson et al. (1963) and others. Another factor could be the change in age and breeding structure of the bull's herd and their including into insemination. Poor nutrition of the breeding animals can also take part in the formation and incidence of AbS. Palan and Naz (1996) found a significant correlation between the concentration of β -carotene in

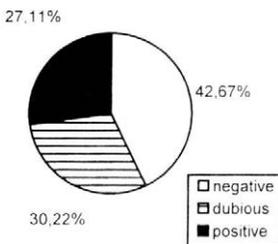


3. Immunoperoxidase assay – negative blood serum (SEM, 2000 x)

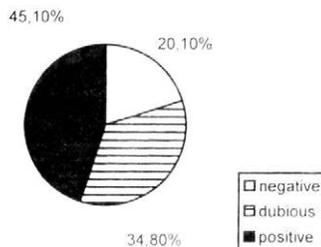


4. Immunoperoxidase assay – positive blood serum (SEM, 2000x)

set of chlamydia negative animals



set of chlamydia positive animals



5. Incidence of AbS in the groups of chlamydia-negative and chlamydia-positive animals

III. Statistical evaluation of AbS incidence in the groups of chlamydia-negative and chlamydia-positive animals

Group of animals	No. of examined	negative		Dubious		Positive	
		No.	%	No.	%	No.	%
Chlamydia-negative	225	96	42.67	68	30.22	61	27.11
Chlamydia-positive	204	41	20.10	71	34.80	92	45.10
Test χ^2		highly significant differences in frequencies		non-significant differences in frequencies		highly significant differences in frequencies	

seminal plasma and the level of AbS titre in men. In our investigations (Zralý et al., 1997) with experimental load of bulls with nitrates, formation of AbS in blood sera has been observed two months after the onset of increased intake.

Fig. 5 shows the results of serological examination of bulls for the detection of antibodies to chlamydia. The titre 1 : 20 was considered as a positive reaction, the incidence of positive findings was 32.1%. In chlamydia-positive bulls 45.1% of AbS positive animals were detected, and in the group of chlamydia-negative bulls 27.1% of AbS positive animals were detected. The differences among the findings are highly significant ($P < 0.01$, Tab. III). The above findings confirm the previous asymptomatic contact of animals with infection agent and suggest a possible involvement of genital infection in AbS formation (Munoz and Witkin, 1995).

ELISA method was used for examination of 981 blood sera of boars from artificial insemination stations, of which 76 animals (7.74%) showed positivity to AbS at dilution 1 : 40, 114 (11.63%) animals were dubious and 791 (80.63%) negative. The frequency and distribution of titres in the whole set were as follows: 1 : 40 – 1.9%, 1 : 80 – 2.3%, 1 : 160 – 1.4% and 1 : 320 – 2.1%. The recorded prevalence of AbS was low compared with the results published by Fayemi et al. (1992). High incidence of AbS is considered by the above authors as a result of impairment of testes by frost during the winter period in the state of Minnesota as many of the boars are housed in a free range. The presence of antibodies to chlamydia was detected in 3.33% of animals and it is assumed that their hypothetical importance in AbS formation is significantly lower compared with bulls.

The assays used so far for AbS detection are not able to distinguish between the binding of clinically significant and insignificant antibodies. However, the above results confirm a possible involvement of immunobiological impacts on the quality of reproduction functions of breeding animals. Further investigation should be oriented to defining the effects of AbS on functional characteristics of ejaculate and a consequent fertility.

Acknowledgement

The authors want to thank Mr. J. Kudrna for his perfect technical assistance.

REFERENCES

BENET-RUBINAT, J. M. – MARTINEZ, P. – LEPP, W. A. – EGOZCUE, J. – ANDOLZ, P. – BIELSA, M. A. (1991): Detection of induced anti-sperm antibodies by an improved enzyme-linked immunosorbent assay. *Int. J. Fertil.*, 36, 48–56.

BRONSON, R. – COOPER, G. – ROSENFELD, D. (1984): Sperm antibodies: Their role in infertility. *Fertil. Steril.*, 42, 506–512.

FAYEMI, O. E. – JOO, H. S. – CRABO, B. G. (1990): Effect of immunization with sperm or seminal plasma on spermatozoal quality in boars. *Anim.Reprod.Sci.*, 23, 245–251.

FAYEMI, O. E. – MORRISON, R. B. – JOO, H. S. (1992): Seroprevalence of sperm antibody in selected Minnesota swine breeding herds. *Anim. Reprod. Sci.*, 27, 341–345.

HAAS, G. G. – BEER, A. E. (1986): Immunology influences on reproductive biology: sperm gametogenesis and maturation in the male and female genital tracts. *Fertil. Steril.*, 46, 753–765.

HUSTED, S. – HJORT, T. (1975): Sperm antibodies in serum and seminal plasma. *Int. J. Fertil.*, 20, 97–105.

JOHNSON, M. H. (1973): Physiological mechanism for the immunological isolation of spermatozoa. *Adv. Reprod. Physiol.*, 6, 279–324.

JOHNSTON, J. E. – NAELAPAA, H. – FRYE, J. B. Jr. (1963): Physiological responses Holstein, Brown Swiss and Red Sindhi crossbred bulls exposed to high temperature and humidities. *J. Anim. Sci.*, 22, 432–436.

MATOUŠKOVÁ, O. – CHALUPA, J. – CÍGLER, M. – HRUŠKA, K. (1993): Statistický a grafický systém STAT Plus, verze 1.10. Brno. Výzkumný ústav veterinárního lékařství.

MUNOZ, M. G. – WITKIN, S. S. (1995): Autoimmunity to spermatozoa, asymptomatic *Chlamydia trachomatis* genital tract infection and gamma delta T lymphocytes in seminal fluid from the male partners of couples with unexplained infertility. *Hum. Reprod.*, 10, 1070–1074.

NOUZA, K. – KINSKY, R. – DIMITROV, D. (1992): Immunology and immunopathology of reproduction. *Folia Biol. (Praha)*, 38, 170–194.

PALAN, P. – NAZ, R. (1996): Changes in various antioxidant levels in human seminal plasma related to immunoinfertility. *Arch. Androl.*, 36, 139–143.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. – LARSSON, B. – ZHANG, B. R. – SÖDERQUIST, L. (1996): Assessment of bull sperm fertilizing ability. *Reprod. Dom. Anim.*, 31, 515–517.

SEVER, J. L. (1962): Application to microtechnique to viral serological investigations. *J. Immunol.*, 88, 320–328.

VĚŽNÍK, Z. – ŠVECOVÁ, D. (1992): Soubor metod k hodnocení pohlavních funkcí býků. Pardubice, Ústav veterinární osvěty. 184 s.
WOLFF, H. – SCHILL, W. B. (1985): A modified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antisperm antibodies. *Andrologia*, 17, 426–439.

ZRALÝ, Z. – BENDO VÁ, J. – ŠVECOVÁ, D. – FALDÍKOVÁ, L. – VĚŽNÍK, Z. – ZAJÍCOVÁ, A. (1997): Effects of oral intake of nitrates on reproductive functions of bulls. *Vet. Med. – Czech.*, 42, 313–321.

Received: 97–12–03

Accepted after corrections: 98–02–26

Contact Address:

MVDr. Zdeněk Zralý, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika
Tel. +420 5 41 32 12 41, fax +420 5 41 32 12 29, e-mail: kahr@vuvet.anet.cz

FOLLICULAR DEVELOPMENT DURING THE PROGESTERONE THERAPY OF OVARIAN ACYCLICITY AND OVARIAN CYSTS IN COWS

FOLIKULÁRNÍ VÝVOJ BĚHEM LÉČBY OVARIÁLNÍ ACYKLIIE A OVARIÁLNÍCH CYST U KRAV PROGESTERONEM

R. Doležel, S. Čech, J. Zajíc

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

ABSTRACT: Follicular development in cows is characterized by the cyclic growth and atresia of antral follicles in 7–10 days interval – follicular waves. Dominant follicle is selected during follicular wave and periodically it undergoes atresia or ovulation. Continual administration of low doses of progestagens commonly used for induction or synchronization of estrus in cows lead to the prolonged growth and maintenance of the dominant follicle. Application of oestradiol supports luteolytic effect of the treatment. Estrus and ovulation occurs 2–4 days after the treatment. It was suggested that progestagen treatment in cows with ovarian dysfunction would have a similar effect and it would prolong the growth and increase maturity of the dominant follicle which could respond to gonadotropin rebound effect and ovulate there after. Twenty cows with ovarian acyclicity (experimental group A) and 25 cows with ovarian cysts (experimental group C) 50–100 days after parturition were included to the experiment. Cows were treated with progesterone intravaginal device (PRID, Sanofi) for 12 days. Ultrasound examination of the ovaries was performed on the day of PRID insertion (day 0), following 3, 6, 9, 12, 15, 17 and 25 days after. Samples of milk were obtained for determination of progesterone by RIA on day 0, 15 and 25. Various changes were found in ovarian cysts during PRID treatment in group C; e.g. cysts persisted without any response or they underwent luteinization, in some cases they became large or smaller and/or disappeared. The number of small follicles (4–6 mm) varied, the number of medium follicles (7–10 mm) decreased while the number of large follicles (> 10 mm) increased in group A as well as group C during treatment (Figs. 1 and 2). The dominant follicles grew slowly and persisted during treatment. Ovulation occurred in 14 (70%) and 16 (64%) cows until day 5 after treatment and *corpus luteum* was found in 12 (60%) and 13 (72%) cows on the day 13 after the treatment in groups A and C. Average concentrations of milk progesterone on day 13 after PRID removal in the groups A and C were 5.6 ± 5.23 and 6.2 ± 7.12 ng/ml (Tabs. I and II). The results confirm our hypothesis that response of the ovarian follicles to progestagen treatment in most of the cows with ovarian dysfunction is comparable with the cyclic cows. Then PRID application for 12 days represents alternative method of the treatment of ovarian acyclicity and ovarian cysts.

cow; ovarian dysfunction; PRID; follicles; ovulation; *corpus luteum*; progesterone

ABSTRAKT: U 20 krav s ovariiální acyklíi (pokusná skupina A) a 25 krav s ovariiálními cystami (pokusná skupina C) 50 až 100 dnů po porodu byl sledován účinek dvanáctidenního ošetření progesteronovým intravaginálním tělískem (PRID) na folikulární vývoj a nástup pohlavního cyklu. Krávy byly sonograficky vyšetřovány v den zavedení PRID (0. den), dále 3., 6., 9., 12., 15., 17. a 25. den po ošetření. Vzorky mléka ke stanovení koncentrace progesteronu RIA metodou byly odebrány v den 0, 15 a 25. Ve skupině C změny na ovariiálních cystách v průběhu ošetření PRID byly značně variabilní. Cysty perzistovaly beze změn nebo podléhaly luteinizaci, v některých případech se zvětšovaly nebo se zmenšovaly a zanikaly. Na vaječných krav obou pokusných skupin v průběhu ošetření počet malých folikulů (4 až 6 mm) kolísal, počet středně velkých folikulů (7 až 10 mm) se snižoval při současném zvyšování počtu folikulů velkých (> 10 mm). Dominantní folikul, který se vyvinul před nebo v průběhu ošetření, perzistoval do konce ošetření. Ovulaci do 5. dne a žluté tělísko 13. den po ošetření vykazalo v pokusné skupině A 14 (70 %) a 12 (60 %) krav, v pokusné skupině C 16 (64 %) a 18 (72 %) krav. Průměrné koncentrace progesteronu 13. den po ošetření v pokusných skupinách A a C byly $5,6 \pm 5,23$ a $6,2 \pm 7,12$ ng/ml. Výsledky ukazují, že odpověď folikulární populace na dvanáctidenní ošetření PRID u velké části krav s ovariiální acyklíi nebo ovariiálními cystami je obdobná jako u jalovic či krav cyklujících. Představuje perzistenci dominantního folikulu po dobu ošetření, jeho ovulaci do 5. dne po ošetření a následnou luteální fázi. Několikadenní ošetření gestageny tak představuje alternativní léčbu ovariiálních dysfunkcí u krav.

kráva; ovariiální dysfunkce; PRID; folikuly; ovulace; žluté tělísko; progesteron

Za fyziologických podmínek folikulární vývoj na vaječnicích pohlavně zralých jalovic a krav představuje neustále se opakující vývoj a zánik několika antrálních folikulů označujících se jako folikulární vlny. Folikulární vlna zahrnuje frontální růst dvou až šesti antrálních folikulů do velikosti 6 až 8 mm, selekci tzv. dominantního folikulu, jeho další vývoj při současně atrezii a zániku folikulů ostatních, tzv. subordinálních. Dominantní folikul obvykle dosahuje průměru 16 až 22 mm a ovuluje nebo atretizuje, zaniká a nastupuje nová folikulární vlna (Pierson a Ginther, 1987; Savio aj., 1988; Sirois a Fortune, 1988; Ginther aj., 1989). Kromě pokročilé březosti folikulární vlny probíhají v 7 až 10denním intervalu po celou reprodukční fázi života zvířete. Tento folikulární vývoj je řízen hypofyzárními gonadotropiny spolu s intraovariálními faktory, které svými endokrinními, parakrinními a autokrinními účinky moduluji vlastní účinek gonadotropinů (Driancourt, 1991; Fortune aj., 1991; Lucy aj., 1992; Ginther aj., 1997). Uvedené dynamické změny ve folikulární populaci tak neustále mění schopnost odpovědi vaječniců na rozličné cíle hormonální zásahy a jsou jednou z příčin nestandardních výsledků indukce či synchronizace říje u jalovic a krav (Kastelic aj., 1990; Savio aj., 1990). Jedním ze zásahů do ovariální funkce s cílem indukce či synchronizace říje bez závislosti na aktuálním stadiu folikulárního vývoje je několikadenní aplikace nízkých dávek gestagenů, v iničiálním stadiu v kombinaci s estrogeny. Toto ošetření prováděné nejčastěji depotními preparáty ve formě intravaginálních tělísek nebo podkožních implantátů synchronizuje nejen pohlavní cyklus, ale i folikulární vlny. Ošetření způsobuje luteolýzu a zastavení nově vzniklé či přetrvávající folikulární vlny ve fázi dominance, v průběhu které perzistuje dominantní folikul až do 2. až 3. dne po ošetření, kdy obvykle ovuluje (Sirois a Fortune, 1990; Savio aj., 1993; Burke aj., 1994; Bo aj., 1995; Hanlon aj., 1997). Změny jsou založeny na luteolytickém účinku estradiolu a inhibici hypofyzární sekrece gonadotropinů aplikovanými steroidy, po které odrazným účinkem následuje výrazné zvýšení jejich sekrece stimulující dozrání perzistujícího dominantního folikulu a jeho ovulaci (Mee aj., 1991; Adams aj., 1992).

Poněvadž v případech ovariální acyklie i ovariálních cyst u krav lze sonografickým vyšetřením běžně prokázat folikulární populaci v rozličném stadiu vývoje, rozhodli jsme se ověřit, zda lze aplikací exogenního progesteronu obdobným mechanismem ovlivnit ovariální aktivitu i v případech těchto ovariálních dysfunkcí. Konkrétním cílem naší práce bylo sledování dynamiky folikulárního vývoje v průběhu ošetření progesteronovým intravaginálním tělískem s hodnocením ovulace a následující luteální fáze pohlavního cyklu u krav s ovariální acyklií a ovariálními cystami.

První pokusnou skupinu zvířat tvořilo 20 krav (křížěnky českého strakatého skotu se skotem holštýnským) s ovariální acyklií 60 až 100 dnů po porodu. Sedmáct z nich vykazovalo při sonografickém vyšetření vaječniců příznaky průběhu folikulárních vln (přítomnost několika folikulů nad 4 mm v průměru, ze kterých minimálně jeden přesáhl 7 mm), u třech byly vaječnický zcela klinicky neaktivní (stabilní přítomnost několika folikulů nepřesahujících 4 mm v průměru). Druhá pokusná skupina zahrnovala 25 krav obdobného plemene 50 až 100 dnů po porodu s ovariálními cystami různého charakteru (perzistující anechogenní struktury s různě silnou stěnou a více jak 25 mm v průměru). Krávy byly ustájeny na čtyřech komerčních mléčných farmách a dvakrát denně byly kontrolovány na příznaky říje.

Po úvodním klinickým vyšetření byly krávy ošetřeny intravaginálním progesteronovým tělískem (PRID, Sanofi), obsahujícím 1,55 g progesteronu a kapsli s 10 mg estradiol benzoátu, po dobu 12 dní. Změny na vaječnicích byly sledovány transrektální sonografií za použití 5 MHz rektální sondy (Aloca 500) před ošetřením v den zavedení PRID (den 0) a dále 3., 6., 9., 12., 15., 17. a 25. den po ošetření. Při hodnocení jsme rozdělili folikulární populaci na folikuly malé (4 až 6 mm), střední (7 až 10 mm) a velké (> 10 mm). Za dominantní byl považován folikul přesahující 8 mm v průměru (Laurinčík aj., 1991), který byl minimálně o 2 mm větší než folikuly ostatní. Ve druhé experimentální skupině byly navíc hodnoceny změny na ovariálních cystách. U krav po ošetření byly dvakrát denně zjišťovány příznaky říje. Vzorky mléka ke stanovení koncentrace progesteronu RIA metodou byly odebrány 0., 15. a 25. den. Šest krav z první a sedm krav ze druhé pokusné skupiny se zřetelnými příznaky říje do 5. dne po ošetření bylo inseminováno. Diagnostika březosti byla provedena sonograficky 23. až 30. den po inseminaci.

VÝSLEDKY

Pokusná skupina A

U acyklických krav dominantní folikuly, které se na vaječnicích objevily před nebo v průběhu ošetření PRID, perzistovaly, pomalu rostly a u 14 (70 %) z 20 acyklických krav ovulovaly do 5. dne od vybavení PRID. U dvou krav v tomto termínu k ovulaci nedošlo. Zastoupení folikulů různých velikostních skupin v průběhu ošetření PRID ukazuje obr. 1. Zřetelné příznaky říje do 5. dne po ošetření byly zaznamenány u osmi sledovaných krav. Po ovulaci typickou luteální fází pohlavního cyklu se zvýšenou koncentrací progesteronu a výskytem žlutého tělíska 13. den po ošetření vykazovalo 12 (60 %) krav. Ze šesti inseminovaných krav se zřetelnými příznaky říje do pěti dnů po ošetření zabřezly dvě krávy. Průměrná koncentrace progesteronu

v mléce 0., 15. a 25. den sledování jsou uvedeny v tab. I.

I. Průměrná koncentrace progesteronu v mléce (ng/ml) před a po ošetření PRID u acyklických krav ($n = 20$) – Average progesterone in milk (ng/ml) before and after the treatment with PRID in acyclic cows ($n = 20$)

Před ošetřením ¹	3 dny po ošetření ²	13 dní po ošetření ³
0,5 ± 0,78	0,4 ± 0,55	5,6 ± 5,23

¹before treatment, ²3 days after treatment, ³13 days after treatment

Ze tří krav nevykazujících příznaky průběhu folikulárních vln před ošetřením nebyl dominantní folikul prokázán u jedné, u dalších dvou během ošetření se vyvinul, avšak záhy zatretizoval. U žádné z těchto krav nebyla zjištěna ovulace do 5. dne, ani přítomnost luteální struktury nebo zvýšení koncentrace progesteronu u 13. den po ošetření.

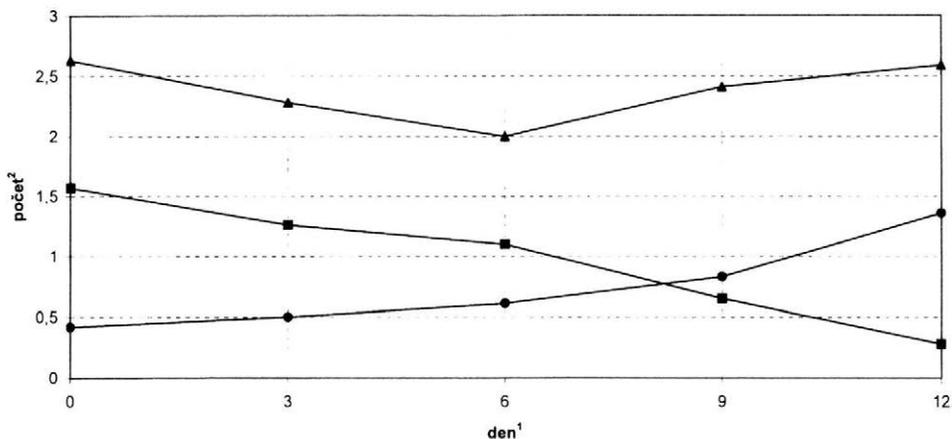
Pokusná skupina C

Změny na ovariálních cystách během ošetření vykazovaly značnou variabilitu. Cysty perzistovaly beze změn nebo podléhaly luteinizaci, v některých případech se zvětšovaly nebo zmenšovaly a zanikaly. Výskyt folikulů rozličných velikostních skupin během ošetření ukazuje obr. 2. Do 5. dne po ošetření ovulace proběhla u 16 z 25 (64 %) sledovaných krav. Zřetelné příznaky říje do 5. dne po ošetření byly zjištěny u 13 krav. Nicméně 13. den po ošetření jsme prokázali

výrazně zvýšenou koncentraci progesteronu v mléce u 22 krav (88 %), z nichž 18 vykazovalo v sonografickém zobrazení typické žluté tělísko a čtyři výrazně luteinizovanou cystu. V přítomnosti žlutého tělíska cysty perzistovaly ve třech případech. Po inseminaci sedmi zřetelně se říjejících krav zabřezly dvě. Tab. II ukazuje průměrné koncentrace progesteronu v mléce krav s ovariálními cystami 0., 15. a 25. den sledování.

DISKUSE

Naše šetření ukazuje, že ve většině případů ovariální acyklie i ovariálních cyst na vaječnicích krav jsou přítomny folikuly, které mají schopnost reagovat na několikadenní ošetření progesteronovým intravaginálním tělískem. Počet malých folikulů se výrazně nemění a počet středně velkých folikulů se snižuje současně se zvýšením počtu folikulů velkých. Tyto výsledky ukazují na zastavení folikulárních vln a pomalý vývoj dominantních folikulů přecházejících ze střední velikosti (7 až 10 mm) do velikosti přesahující 10 mm v průměru a perzistenci těchto velkých folikulů. Tento poznatek je srovnatelný s našimi výsledky z dřívějších prací zabývajících se folikulárním vývojem během ošetření CIDR nebo PRID v časném poporodním období (Doležel aj., 1993; Doležel, 1995) i s výsledky dalších autorů, kteří sledovali dynamiku folikulárního vývoje během ošetření progesterageny v časném poporodním období (Lucy aj., 1990; Stevenson a Pursley, 1994) nebo u cyklujících jalovic a krav (Sirois a Fortune, 1990; Savio aj., 1993; Burke aj., 1994; Bo aj., 1995).



I. Průměrný počet malých (4 až 6 mm), středních (7 až 10 mm) a velkých (>10 mm) folikulů během ošetření PRID u acyklických krav – Average number of small (4–6 mm), medium (7–10 mm) and large (>10 mm) follicles during treatment with PRID in acyclic cows

● velké – large
 ■ střední – medium
 ▲ malé – small
¹day, ²number

II. Průměrná koncentrace progesteronu v mléce (ng/ml) před a po ošetření PRID u cystických krav ($n = 25$) – Average concentration of progesterone in milk (ng/ml) before and after the treatment with PRID in cystic cows ($n = 25$)

Před ošetřením ¹	3 dny po ošetření ²	13 dní po ošetření ³
0,7 ± 0,52	0,5 ± 0,62	6,2 ± 7,12

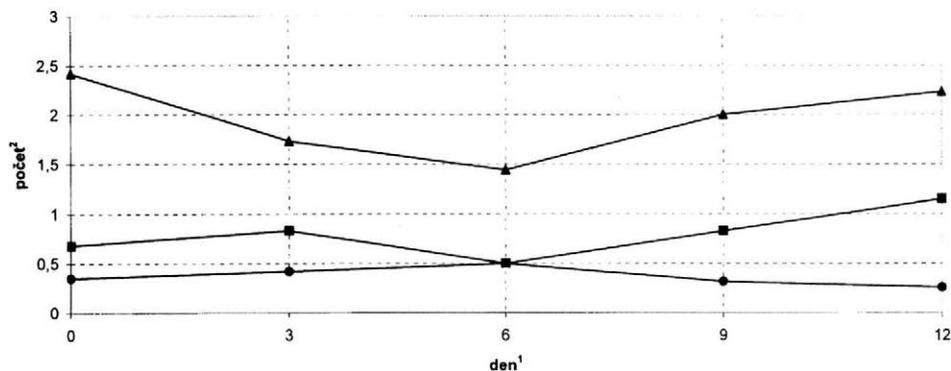
¹before treatment, ²3 days after treatment, ³13 days after treatment

Někteří autoři poukazují na zánik probíhající folikulární vlny a nástup vlny nové 3. až 5. den po začátku ošetření gestageny s estradiolem v závislosti na aktuálním stadiu folikulárního vývoje (Bo aj., 1994, 1995; Garcia a Salaheddine, 1997). Za ukončení probíhající folikulární vlny a tak nástup vlny nové je zodpovědný účinek estradiolu (Burke aj., 1996). I když v našem šetření použitý PRID obsahoval kapsli s 10 mg estradiol benzoátu, uvedený poznatek jsme potvrdili jenom částečně, poněvadž ve většině případů dominantní folikuly zjištěné již před ošetřením perzistovaly až do jejich ovulace po ošetření. I když je pravděpodobné, že námi prováděné sonografické vyšetření v intervalech tři dnů na základě lokalizace a logické následnosti ve velikosti je dostačující k průkazu perzistence dominantního folikulu, nelze ve všech případech jednoznačně vyloučit možnost záměny dominantních folikulů především na začátku ošetření.

Změny na ovariálních cystách v průběhu léčby jsou značně variabilní. Na tuto variabilitu jsme již poukázali v dřívějším sledování (Čech aj., 1996). V případě ovariálních cyst z hlediska terapeutického efektu je tak pravděpodobně významnější schopnost odpovědi přítomných folikulů než samotných cyst. Inkrečně funkční cysty tuto folikulární reakci mohou ovlivňovat svoji sekrecí steroidů.

Podmínkou uvedeného účinku exogenního progesteronu na folikulární populaci je přetrvávající mírně zvýšená (kolem 2 ng/ml) koncentrace progesteronu, a tedy absence vysokých hladin exogenního nebo endogenního progesteronu a funkčního žlutého tělíska (Robertson aj., 1989; Cupp aj., 1992; Kojima aj., 1992; Bergfeld aj., 1996). Koncentrace progesteronu v případech luteálních cyst je značně variabilní (Carroll aj., 1990), nicméně může být příčinou nestandardní folikulární odezvy na ošetření progestageny. I když estradiol potencuje progesteronem navozenou inhibici sekrece LH (Stumpf aj., 1993) a vykazuje anti-luteotropní nebo luteolytický účinek (Tatcher aj., 1986; Macmillan aj., 1991), v případech předpokládané luteální cysty lze doporučit ošetření doplnit o aplikaci PGF₂α a zajistit tak luteolýzu, poněvadž luteolytický účinek samotné kombinace progestagenů s estradiolem není stoprocentní (Burns aj., 1993; Macmillan a Peterson, 1993; Kesler aj., 1997).

I když řízený folikulární vývoj v průběhu ošetření PRID zakončený ovulací do pěti dnů po ošetření proběhl u 70 % krav s ovariální acyklií a u 64 % krav s ovariálními cystami, typické příznaky říje vykazovalo jen asi 50 % sledovaných krav v obou skupinách. Tyto výsledky jsou částečně v rozporu s údaji, že indukovaná říje po ošetření gestageny v časném poporodním období je ve srovnání se spontánní říjí kvalitnější, s vyšší koncentrací estradiolu a výraznější LH vlnou (Garcia-Winder aj., 1987; Mee aj., 1991). Při terénním hodnocení terapeutického efektu PRID u krav s ovariální acyklií a ovariálními cystami Arbeiter a Pohl (1986) zjistili říjí u 77 % krav. Určení přesného termínu ovulace u jednotlivých krav metodika našeho sledování neumožnila. Do 3. dne po ošetření ovulovalo



2. Průměrný počet malých (4 až 6 mm), středních (7 až 10 mm) a velkých (>10 mm) folikulů během ošetření PRID u cystických krav – Average number of small (4–6 mm), medium (7–10 mm) and large (>10 mm) follicles during treatment with PRID in cystic cows

● velké – large
 ■ střední – medium
 ▲ malé – small
¹day, ²number

sedm krav z každé pokusné skupiny. Jako nejčastěji výše uvedenými autory uváděné termíny ovulace po indukci či synchronizaci říje gestageny jsou dva až čtyři dny po ošetření. Dodatečná aplikace estradiolu na začátku ošetření urychluje a sjednocuje termín nástupu LH vlny i ovulace, která u většiny krav probíhá již 2. den po ošetření (Tribulo aj., 1995; Hanlon aj., 1997).

Výrazně zvýšená průměrná koncentrace progesteronu v mléce 13. den po odstranění PRID ve srovnání s koncentrací na začátku ošetření a 3. den po jeho ukončení v obou pokusných skupinách je dokladem přítomnosti žlutého tělíska, případně výrazně luteinované ovariální cysty. Sonograficky jsme žluté tělísko v tomto termínu prokázali u 60 % a 72 % ze všech sledovaných krav v první a druhé pokusné skupině. Pozitivní vliv ošetření gestageny na kvalitu následující luteální fáze je prokázán (Troxel a Kesler, 1984; Smith aj., 1987; Mee aj., 1991). Další průběh pohlavních cyklů již nebyl v naší práci sledován. Nicméně navozená typická luteální fáze dává možnost k druhé indukci říje prostaglandiny, kterou lze doporučit k inseminaci z níže uvedených důvodů.

Přesto, že hodnocení plodnosti krav v indukovaných říjích po ošetření PRID nebylo hlavním cílem této práce, vybrané krávy s výraznými příznaky říje byly inseminovány. Úroveň zabřezávání však byla velmi nízká v první i druhé pokusné skupině (2/6, 2/7). Nízkou úroveň koncepce po několikadenním ošetření gestageny uvádí řada autorů (Sanchez aj., 1993; Savio aj., 1993; Wehrman aj., 1993; Mihm aj., 1994; Ahmad aj., 1995). Za možnou příčinu uvádějí narušenou funkci vejcovodu nebo narušený oocyt asynchronním jaderným a cytoplazmatickým zráním z důvodu dlouhodobého účinku vysoké koncentrace estradiolu z perzistujícího dominantního folikulu. V našem sledování se mohly na snížené koncepční schopnosti navíc uplatnit strukturálně-funkční změny v endometriu, které nastupují při déle trvajících ovariálních dysfunkcích (Kummer aj., 1996).

Z našich výsledků lze shrnout, že u většiny krav s ovariální acyklií a ovariálními cystami jsou na vaječnicích přítomné folikuly, které jsou schopné reagovat na dvanáctidenní aplikaci PRID obdobným způsobem jako u krav ve fyziologické acyklii v časném poporodním intervalu nebo u jalovic a krav cyklujících. Dominantní folikuly vyvinuté před či v průběhu ošetření PRID perzistují, pomalu rostou a ve většině případů ovulují do 5. dne po ošetření. Třináctý den po ošetření rovněž většina krav vykazuje typickou luteální fázi pohlavního cyklu.

LITERATURA

ADAMS, G. P. – MATTERI, R. L. – GINTHER, O. J. (1992): Effect of progesterone on ovarian follicle, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *J. Reprod. Fertil.*, 95, 627–640.

AHMAD, N. – SCHRICK, F. N. – BUTCHER, R. L. – INSKEP, E. K. (1995): Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cattle. *Biol. Reprod.*, 52, 1129–1135.

ARBEITER, K. – POHL, W. (1986): Über die Anwendung der PRID-Spirale bei ovariellen Funktionsstörungen des Rindes (Feldversuch II). *Tierärztl. Umsch.*, 41, 664–668.

BERGFELD, E. G. M. – KOJIMA, F. M. – CUPP, A. S. – WEHRMAN, M. E. – PETERS, K. E. – MARISCAL, V. – SANCHEZ, T. – KINDER, J. E. (1996): Changing doses of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 beta-estradiol in bovine females. *Biol. Reprod.*, 54, 546–553.

BO, G. A. – ADAMS, G. P. – PIERSON, R. A. – CACCIA, M. – TRIBULO, H. – MAPLETOFT, R. J. (1994): Follicular wave dynamics after estradiol 17 beta treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology*, 41, 1555–1569.

BO, G. A. – ADAMS, G. P. – CACCIA, M. – MARTINEZ, M. – PIERSON, R. A. – MAPLETOFT, R. J. (1995): Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 39, 193–204.

BURKE, C. R. – MIHM, M. – MACMILLAN, K. L. – ROCHE, J. F. (1994): Some effects of prematurely elevated concentrations of progesterone on luteal and follicular characteristics during the estrous cycle in heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, 35, 27–39.

BURKE, C. R. – MACMILLAN, K. L. – BOLAND, M. P. (1996): Oestradiol potentiates a prolonged progesterone-induced suppression of LH release in ovariectomised cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 45, 13–28.

BURNS, P. D. – SPITZER, J. C. – BRIDGES, W. C. – HENRICKS, D. M. – PLYLER, B. B. (1993): Effects of metestrous administration of a norgestomet implant and injection of norgestomet and estradiol valerate on luteinizing hormone and development and function of corpora lutea in suckled beef cows. *J. Anim. Sci.*, 77, 983–988.

CARROLL, D. J. – PIERSON, R. A. – HAUSER, E. R. – GRUMMER, R. R. – COMBS, D. K. (1990): Variability of ovarian structures and plasma progesterone profiles in dairy cows with ovarian cysts. *Theriogenology*, 34, 349–370.

CUPP, A. S. – GARCIA-WINDER, M. – ZAMUDIO, A. – MARISCAL, V. – WEHRMAN, M. – KOJIMA, N. – PETERS, K. – BERGFELD, E. – HERNANDEZ, P. – SANCHEZ, T. – KITTOCK, R. – KINDER, J. (1992): Two concentrations of progesterone (P 4) in circulation have a differential effect on pattern of ovarian follicular development in the cow. *Biol. Reprod.*, 46 (Suppl.1), 106 (Abstr.).

ČECH, S. – DOLEŽEL, R. – ZAJÍC, J. – KUDLÁČ, E. (1996): Changes of ovarian structures during various treatment of cystic cows. *Reprod. Dom. Anim.*, 30, 467 (Abstr.).

DOLEŽEL, R. (1995): Dynamics of the follicular development during PRID treatment and quality of the following sexual cycle in postpartum cows. *Acta Vet. (Brno)*, 64, 187–194.

DOLEŽEL, R. – KARLBERG, K. – ROPSTAD, E. – LANDSVERK, K. (1993): Ultrasound observations of ovarian structures in cows during intravaginal progesterone device application and in the following sexual cycle (preliminary report). *Acta Vet. (Brno)*, 62, 179–185.

- DRIANCOURT, M. A. (1991): Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*, 35, 55–79.
- FORTUNE, J. E. – SIROIS, J. – TURZILLO, A. M. – LA-VOIR, M. (1991): Follicle selection in domestic ruminants. *J. Reprod. Fertil.*, (Suppl.) 43, 187–198.
- GARCIA, A. – SALAHEDDINE, M. (1997): Estrus synchronization in Holstein heifers with estradiol valerate or estradiol 17 beta and progesterone devices. *Theriogenology*, 47, 323 (Abstr.).
- GARCIA-WINDER, M. – LEWIS, P. E. – TOWNSEND, E. C. – INSKEEP, E. K. (1987): Effects of norgestomet on follicular development in postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.*, 64, 1099–1109.
- GINTHER, O. J. – KASTELIC, J. P. – KNOPF, L. (1989): Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.*, 20, 187–200.
- GINTHER, O. J. – KOT, K. – KULICK, L. J. – WILTBANK, M. C. (1997): Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*, 48, 75–87.
- HANLON, D. W. – WILLIAMSON, N. B. – WICHEL, J. J. – STEFFERT, I. J. – CRAIGIE, A. L. – PFEIFFER, D. U. (1997): Ovulatory responses and plasma luteinizing hormone concentrations in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone and estradiol benzoate. *Theriogenology*, 47, 963–975.
- KASTELIC, J. P. – KNOPF, L. – GINTHER, O. J. (1990): Effect of dyo of prostaglandin F₂α treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, 23, 169–180.
- KESLER, D. J. – DYSON, T. S. – SUMMERS, R. N. – STECKLER, T. L. – NASH, T. G. (1997): Effect of prostaglandin F₂α treatment before norgestomet and estradiol valerate treatment on regression, formation, and function of *corpus lutea* in beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, 47, 281–289.
- KOJIMA, L. – STUMPF, T. T. – CUPP, A. S. – WERTH, L. A. – ROBERSON, M. S. – WOLFE, M. W. – KITTOK, R. J. – KINDER, J. E. (1992): Exogenous progesterone and progestins as used in estrous synchrony regimens do not mimic the *corpus luteum* in regulation of LH and 17 beta-estradiol in circulation of cows. *Biol. Reprod.*, 47, 1009–1017.
- KUMMER, V. – MAŠKOVÁ, J. – ZRALÝ, Z. – ČANDERLE, J. – VĚŽNÍK, Z. (1996): Dynamika funkčních a histopatologických změn na děložní sliznici při persistenci ovariálních cyst u krav s definovaným hormonálním profilem. In: VIII. Příblyvny dny. Brno, VÚVEL, s. 10–16.
- LAURINČÍK, J. – PÍCHA, J. – PÍCHOVÁ, D. – OBERFRANC, M. (1991): Timing of laparoscopic aspiration of preovulatory oocytes in heifers. *Theriogenology*, 35, 415–423.
- LUCY, M. C. – THATCHER, W. W. – MACMILLAN, K. L. (1990): Ultrasonic identification of follicular populations and return to estrus in early postpartum dairy cows given intravaginal progesterone for 15 days. *Theriogenology*, 34, 325–340.
- LUCY, M. C. – SAVIO, J. D. – BADINGA, L. – DE LA SOTA, R. L. – THATCHER, W. W. (1992): Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci.*, 70, 3615–3626.
- MACMILLAN, K. L. – PETERSON, A. J. (1993): A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrous synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of postpartum anoestrus. *Anim. Reprod. Sci.*, 33, 1–25.
- MACMILLAN, K. L. – TAUFA, V. K. – BARNES, D. R. – DAY, A. M. (1991): Plasma progesterone concentrations in heifers and cows treated with a new intravaginal device. *Anim. Reprod. Sci.*, 26, 25–40.
- MEE, M. O. – STEVENSON, J. S. – MINTON, J. E. (1991): First postpartum luteal function in dairy cows after ovulation by progesterone and gonadotropin-releasing hormone. *J. Dairy Sci.*, 74, 1573–1581.
- MIHM, M. – CURRAN, N. – HYTTTEL, P. – BOLAND, M. P. – ROCHE, J. F. (1994): Resumption of meiosis in cattle oocytes from preovulatory follicles with a short and a long duration of dominance. *J. Reprod. Fertil.*, 36, 14 (Abstr.).
- PIERSON, R. A. – GINTHER, O. J. (1987): Follicular populations during the estrous cycle in heifers. I. Influence of day. *Anim. Reprod. Sci.*, 14, 165–176.
- ROBERTSON, M. S. – WOLFE, M. W. – STUMPF, T. T. – KITTOK, R. J. – KINDER, J. E. (1989): Luteinizing hormone secretion and *corpus luteum* function in cows receiving two levels of progesterone. *Biol. Reprod.*, 41, 997–1003.
- SANCHEZ, T. – WEHRMAN, M. E. – BERGFELD, E. G. – PETERS, K. E. – KOJIMA, F. N. – CUPP, A. S. – MARISCAL, V. – KITTOK, R. J. – RASBY, R. J. – KINDER, J. E. (1993): Pregnancy rate is greater when the *corpus luteum* is present during the period of progestin treatment to synchronize time of estrus in cows and heifers. *Biol. Reprod.*, 49, 1102–1107.
- SAVIO, J. D. – KEENAN, L. – BOLAND, M. P. – ROCHE, J. F. (1988): Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.*, 83, 663–671.
- SAVIO, J. D. – BOLAND, M. P. – HYNES, N. – MATTIACCI, M. R. – ROCHE, J. F. (1990): Will the first dominant follicle of the estrous cycle of heifers ovulate following luteolysis on day 7? *Theriogenology*, 33, 677–687.
- SAVIO, J. D. – THATCHER, W. W. – MORRIS, G. R. – ENTWISTLE, K. – DROST, M. – MATTIACCI, M. R. (1993): Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. *J. Reprod. Fertil.*, 98, 77–84.
- SIROIS, J. – FORTUNE, J. E. (1988): Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.*, 39, 308–317.
- SIROIS, J. – FORTUNE, J. E. (1990): Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology*, 127, 916–925.
- SMITH, V. G. – CHENAULT, J. R. – MC ALLISTER, J. F. – LAUDERDALE, J. W. (1987): Response of postpartum beef cows to exogenous progestogens and gonadotropin releasing hormone. *J. Anim. Sci.*, 64, 540–551.
- STEVENSON, J. S. – PURSLEY, J. R. (1994): Resumption of follicular activity and interval to postpartum ovulation after exogenous progestins. *J. Dairy Sci.*, 77, 725–734.

- STUMPF, T. T. – ROBERSON, M. S. – WOLFE, M. W. – HAMERNIK, D. L. – KITTOK, R. J. – KINDER, J. E. (1993): Progesterone, 17 beta-estradiol, and opioid neuropeptides modulate pattern of luteinizing hormone in circulation of the cow. *Biol. Reprod.*, *49*, 1096–1101.
- THATCHER, W. W. – TERQUI, M. – THIMONIER, J. – MAULEON, P. (1986): Effect of estradiol – 17 β on peripheral plasma concentration of 15-keto-13,14-dihydro PGF $_2\alpha$ and luteolysis in cyclic cattle. *Prostaglandins*, *31*, 745–756.
- TRIBULO, H. – BO, G. A. – KASTELIC, J. P. – PAWLISHYN, V. – BARTH, A. D. – MAPLETOFT, R. J. (1995): Estrus synchronization in cattle with estradiol-17 beta and CIDR-B vaginal devices. *Theriogenology*, *43*, 340 (Abstr.).
- TROXEL, T. R. – KESLER, D. J. (1984): The effect of progestin and GnRH treatment on ovarian function and reproductive hormone secretions of anestrous postpartum suckled beef cows. *Theriogenology*, *21*, 699–711.
- WEHRMAN, M. E. – ROBERSON, M. S. – CUPP, A. S. – KOJIMA, F. N. – STUMPF, T. T. – WERTH, L. A. – WOLFE, M. W. – KITTOK, R. J. – KINDER, J. E. (1993): Increasing exogenous progesterone during synchronization of estrus decreases endogenous 17 beta-estradiol and increases conception in cows. *Biol. Reprod.*, *49*, 214–220.

Received: 98-02-09

Kontaktní adresa:

Doc. MVDr. Radovan Doležel, CSc., Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1–3, 612 42 Brno, Česká republika
Tel. +420 5 41 56 11 11, fax +420 5 74 88 41

70 let činnosti Ústřední zemědělské a lesnické knihovny

Před 70 lety byla **18. března 1928** v „Domě zemědělské osvěty“ na Vinohradech v Praze **slavnostně otevřena Ústřední zemědělská a lesnická knihovna (ÚZLK)**. Po předchozím dvouletém období systematických příprav byly služby knihovny nabídnuty nejširší československé zemědělské veřejnosti. Statutárně byla knihovna založena Československou akademií zemědělskou (ČAZ) již v roce 1926. V prvních dvou letech její existence však fungovala jen čítárna, a to především pro pracovníky ČAZ. Po celou tuto dobu bylo veškeré úsilí soustředěno na vybudování dostatečného základního knihovního fondu a potřebného provozního knihovního zázemí. Cílem organizátorů bylo co nejdříve otevřít tuto knihovnu jako „**Ústřední slovanskou zemědělskou knihovnu**“, která bude sloužit nejen nejširší veřejnosti, ale současně bude plnit i funkci ústřední zemědělské knihovny pro všechny slovanské státy.

K slavnostnímu otevření knihovny došlo při výročním valném shromáždění ČAZ za účasti mnoha vzácných hostů. Hlavní projev přednesl tehdejší prezident ČAZ dr. Milan Hodža. Velkého lesku dodala tomuto slavnostnímu shromáždění přítomnost vyslanců několika slovanských zemí. Přítomni byli také zástupci četných centrálních státních úřadů, vědeckých institucí, výzkumných úřadů a vysokých škol. Zúčastnili se i významní představitelé československého knihovnictví, např. dr. Z. Tobolka a další. Ministr zemědělství dr. O. Srdínko, který se nemohl slavnosti zúčastnit osobně, poslal valnému shromáždění pozdravný dopis, ve kterém vřelými slovy uvítal „...dnešní otevření Ústřední slovanské zemědělské knihovny, jež ... bude jednou z největších knihoven vůbec“. Tento nový oficiální název knihovny byl pak užíván až do prvních válečných let.

I vývoj v příštích 70 letech dosvědčuje, že knihovna opravdu dostala slovům tehdejšího ministra zemědělství. V současné době se ÚZLK řadí nejen velikostí svých knihovních fondů mezi největší odborné zemědělské knihovny na světě. V knihovně je k dispozici více než milion svazků odborné literatury. ÚZLK poskytuje nejširší škálu výpůjčních, informačních a reprodukčních služeb. V rámci mezinárodní sítě AGLINET spolupracuje i s partnerskými knihovnami v zahraničí. Slouží jako veřejná knihovna nejen jejím přímým návštěvníkům, ale prostřednictvím meziknihovních služeb i všem ostatním potenciálním uživatelům.

70leté výročí otevření ÚZLK si pracovníci knihovny a její příznivci připomenou na slavnostním shromáždění, které se bude konat 25. května 1998 ve velkém sále budovy ÚZPI v Praze 2, Slezská 7.

K této příležitosti bude vydána komentovaná bibliografie „Historie Ústřední zemědělské a lesnické knihovny ve světle literárních pramenů“.

Kontakt:

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna
Slezská 7, 120 56 Praha 2 – pošt. schr. 39

Tel.: 02/24 25 50 74 – PhDr. I. Hoch, vedoucí ÚZLK
02/24 25 79 39, l. 415 – půjčovna
02/25 90 96 – referenční služby
02/24 25 66 10 – časopisecké služby

Fax: 02/24 25 39 38, e-mail: ref@uzpi.cz

THE COURSE AND CONTROL OF PARASITOSE IN MIXED GRAZING OF SHEEP AND CATTLE*

PRŮBĚH A TLUMENÍ PARAZITÓZ PŘI SPOLEČNÉ PASTVĚ OVČÍ A SKOTU

K. Chroust¹, F. Horák², J. Žižlavský², S. Žižlavská²

¹ Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

² Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: Studies on the occurrence of parasitoses in the course of mixed grazing of sheep and cattle were carried out in the years 1995–1997 in a herd of cows, heifers and calves of beef breed and their crosses (28 head) and a flock of ewes, yearlings and lambs of meat type breeds (50 to 70 heads). Excrements were sampled in monthly intervals from 80 to 90% of animals, after sampling, the excrements were subjected to an ovsoscopic and larvososcopic analysis and to a quantitative evaluation. Results obtained in individual years demonstrated an abrupt increase in cases of infestation with gastrointestinal nematodes (GIN) and *Moniezia* spp. tapeworms in lambs, yearlings and ewes as early as in the first month of grazing. To suppress these infestations, dehelminthization was performed to the end of the second month of pasture and in the autumn. Ewes were treated also prior to the beginning of grazing period. In lambs, the maximum values of GIN infestations were EPG 550 in 1995 and they decreased to 180 in 1997. The corresponding findings in ewes and yearlings were EPG 200 and 90, resp. In lambs, the values of prevalence of *Moniezia* spp. decreased from 59% in 1995 to 25% in 1997 and in ewes and yearlings from 25% to 7% in 1997, resp. In cattle, the maximum EPG values in GIN were 75 and decreased to 30 in 1997. In the course of three years, an infestation of cattle with *Moniezia* spp. was observed only in 2 animals. The dehelminthization of cattle was performed only before and after the housing. Basing on a comparison of results obtained during the separate grazing of sheep and cattle it is possible to conclude that the mixed grazing decreases the intensity and prevalence of gastrointestinal helminthoses. However, a mixed pasture of sheep and cattle is rather important for a better use of grass stand and for an increase in daily weight gains.

sheep; cattle; mixed grazing; gastrointestinal nematodes; *Moniezia* spp.; anthelmintic treatment

ABSTRAKT: Sledování parazitóz při společné pastvě ovčí a skotu bylo prováděno v letech 1995 až 1997 u stáda krav, jalovic a telat masných plemen a jejich kříženců (28 kusů) a stáda bahnic, jehnic a jehňat se zaměřením rovněž na masnou produkci (50 až 70 kusů). Vzorky trusu byly odebrány v pravidelných měsíčních intervalech od 80 až 90 % zvířat a podrobny ovoskopické a larvoskopické analýze a kvantitativnímu vyhodnocení. Výsledky vyšetřování v jednotlivých letech prokázaly prudký nárůst infekce gastrointestinálními nematody (GIN) a tasemnicemi *Moniezia* spp. u jehňat, jehnic i bahnic již od prvního měsíce pastvy. Za účelem tlumení těchto infekcí byla prováděna dehelmintizace koncem druhého měsíce pastvy a na podzim a u bahnic rovněž před před vyhnáním na pastvu. Maximální hodnoty GIN u jehňat v roce 1995 dosahovaly EPG 550 a do roku 1997 poklesly na 180, u bahnic a jehnic pokleslo EPG z 200 na 90. Rovněž hodnoty prevalence *Moniezia* spp., které u jehňat v roce 1995 dosáhly maxima 59 %, poklesly v roce 1997 na 25 %, u bahnic a jehnic z 25 na 7 %. U skotu dosahovaly v roce 1995 hodnoty EPG u GIN maxima 75 a do roku 1997 poklesly na EPG 30. *Moniezia* spp. byla u skotu zjištěna v průběhu tří let pouze u dvou kusů. Dehelmintizace skotu byla prováděna pouze před a po ustájení. Na základě srovnání dosavadních výsledků při sledování ovčí a skotu při samostatné pastvě je možno konstatovat, že při společné pastvě se intenzita i prevalence gastrointestinálních helmintóz snižuje. Společná pastva ovčí a skotu má značný význam pro lepší využití porostů a zvýšení přírůstků.

ovce; skot; společná pastva; gastrointestinální nematoda; *Moniezia* spp.; anthelmintická léčba

ÚVOD

Pro současnou etapu našeho zemědělství je systém společné pastvy jednou z významných alternativ nale-

zení vhodného způsobu hospodaření v tzv. marginálních oblastech. Jedná se o využití pastevních a lučních porostů ve výše položených příhraničních oblastech, příp. i některých lokalitách méně vhodných k intenziv-

* Supported by the Grant Agency of the Czech republic (Grant No. 507/95/1284).

ni produkci ve vnitrozemí. Největší uplatnění při tomto systému najde pravděpodobně u nás netradiční chov skotu bez tržní produkce mléka, jehož četná plemena jsou k nám z různých zemí od roku 1991 ve zvýšeném počtu importována. Ovce jsou využívány především k dopásání porostů a pastevní technika se zakládá na co nejdelším pobytu zvířat na pastvě. V zahraničí jsou tyto systémy hodnoceny jako vysoce efektivní jak po stránce uživatelské, tak i využitelnosti porostů (Walker, 1994). V našich podmínkách je tato problematika výzkumně řešena autory Žilavský aj. (1996) a Horák aj. (1997), rovněž s pozitivním dopadem pro efektivní využití pastevních porostů.

Parazitózy při společné pastvě ovcí a skotu nebyly dosud v podmínkách České republiky sledovány. Především výsledky studia této problematiky započaté v roce 1995 publikovali Chroust aj. (1997a, b). Ze zahraničí jsou známy práce, které prokazují pozitivní vliv společné pastvy ovcí a skotu na výskyt parazitóz. Již v 70. letech byl v Anglii doporučen pro společnou pastvu systém tzv. čisté pastviny. Ten vycházel z následné pastvy ve dvouletých cyklech tak, že jeden druh se pase na pastvině první rok a druhý druh následující rok. V pastevní sezoně se provádí nejprve pastva mladých zvířat (telata, jehňata) před zvířaty dospělými (Speedy a Gibson, 1983). Helle (1981) uvádí, že střídání pastvy skotu s ovci je výhodné pro skot, protože snižuje jeho promořenost parazity. Donald aj. (1987) prokazují, že společná pastva jehňat a skotu dala lepší výsledky než samostatná pastva ovcí. Nedošlo k úhynům a snížení uživatelské v důsledku infekce gastrointestinálními nematody rodu *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus* a *Nematodirus*. Jordan aj. (1988) v USA rovněž zjistili, že u jehňat pasených společně se svými matkami a skotem byl nižší výskyt helmintů než u skupiny jehňat pasených samostatně. Naopak u telat pasených společně s kravami a ovci pozorovali silnější promoření než u skupiny telat pasených pouze s matkami. Rovněž tak Nolan a Connolly (1990) prokazovali nižší výskyt endoparazitů při společné pastvě skotu s ovci než při pastvě jednodruhové. Quintana aj. (1987) zjistili v podmínkách Uruguaye nižší zamoření jehňat helminty v době kdy se pásala na pastvině následně po skotu, oproti skupině pasoucí se společně s bahnicemi a mladým skotem. Hintz (1991) prokázal, že při společné pastvě skotu, ovcí a koz dochází ke snížení výskytu parazitóz, avšak infekce druhem *Trichostrongylus axei* u koní se může podstatně zvýšit při společné pastvě koní, skotu, ovcí a koz. Komplexně se problematikou společné pastvy různých druhů hospodářských zvířat zabývá Nowakowski (1996).

MATERIÁL A METODY

Pokusy byly prováděny na Školním zemědělském podniku MZLU Brno v Žabčicích. Zde byl již v roce 1994 založen experiment, který umožňoval sledovat

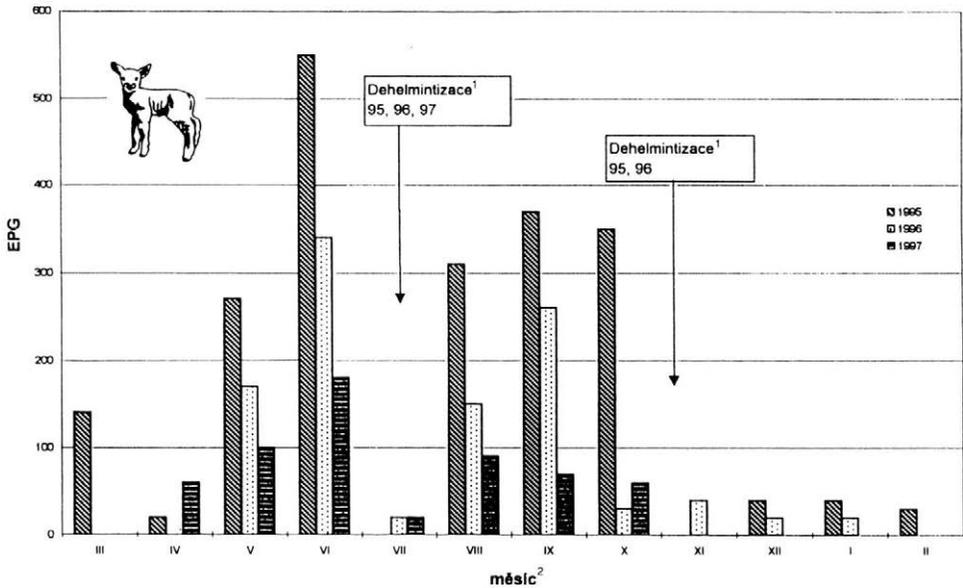
a vyhodnocovat mezidruhovou kompatibilitu, využívání a ovlivňování porostů, užitkové vlastnosti a zdravotní stav zvířat v podmínkách společné pastvy ovcí a skotu. Pastevní areál byl založen na vojtěškotravním porostu s elektrickým oplocením. Do pokusu bylo zařazeno 28 krav, jalovic a telat masných plemen a jejich kříženců a 50 až 70 bahnic, jehnic a jehňat zaměřených rovněž na masnou produkci. Početní stavy skotu a ovcí se pohybovaly v závislosti na odstavu jehňat v poměru 1 : 2,5 až 1 : 3. V roce 1995 byla pastva zahájena 19. 4. a výměra pastviny činila 7,65 ha; v roce 1996 byla pastva zahájena 27. 4. na výměře 10,69 ha a v roce 1997 pak 5. 4. na výměře 13,06 ha.

Vzorky trusu k parazitologickému vyšetření byly odebrány individuálně v pravidelných měsíčních intervalech (29. až 31. každého měsíce) při vážení zvířat, a to v průměru od 80 až 90 % ovcí a skotu. Sledování bylo prováděno v průběhu pastevního období i zimního ustájení v letech 1995 až 1997; první odběr byl uskutečněn 24. 3. 1995, poslední odběr 29. 10. 1997. Vlastní vyšetření vzorků bylo prováděno individuálně, a to metodou flotační, sedimentační a larvoskopickou a dále kvantitativně, tj. stanovením počtu vajíček gastrointestinálních nematodů (GIN) v 1 g trusu (EPG) pomocí počítací komůrky typu McMaster v modifikaci podle Chrousta (1970). Ze vzorků trusu byla dále prováděna kultivace infekčních larev GIN (La III) za účelem jejich druhové, resp. rodové diagnostiky. Bylo použito metody podle Chrousta a Hulínské (1970) a určování larev bylo prováděno podle klíče, který uvádí Hulínská (1969). Sledován byl i výskyt oocyst kokcií rodu *Eimeria* a *Cryptosporidium* a dále cyst *Giardia* sp. Vlastní laboratorní vyšetření bylo prováděno na Ústavu parazitologie FVL VFU Brno.

K dehelmintizaci v průběhu pokusů byl použit jedním Ivomec (ivermectin v dávce 0,2 mg/kg ž. h. u skotu) a Vermital (2,5% susp., resp. Aldifal 2,5% susp. (albendazol v dávce 5 mg/kg ž. h. u ovcí a 7,5 mg/kg ž. h. u skotu). Termíny dehelmintizací v jednotlivých letech byly stanoveny na základě výsledků sledování dynamiky helmintóz v průběhu pastevní sezony a zimního ustájení. V grafech jsou vyznačeny svislými šipkami.

VÝSLEDKY

Výsledky vyšetřování vzorků trusu u ovcí v prvních dvou letech prokazovaly poměrně vysokou intenzitu i prevalence infekce gastrointestinálními nematody a tasemnicemi zejména u jehňat, nižší u jehnic a bahnic. Dynamika kvantitativních nálezů vajíček GIN v průběhu let 1995 až 1997 u jehňat je znázorněna na obr. 1. EPG i prevalence těmito nematody vykazují u jehňat poměrně velmi prudký nárůst v prvních dvou měsících pastvy a koncem června 1995 a 1996 dosáhly maximálních hodnot 550, resp. 340 a prevalence 68 %, resp. 61 %. V roce 1997 se EPG snížilo na 180 a prevalence dosahovala 53 %. Dehelmintizace albendazo-



1. Dynamika ovoskopických nálezů gastrointestinálních nematodů (EPG) u jehňat v letech 1995 až 1997 – Dynamics of ovoscopic findings of gastrointestinal nematodes (EPG) in lambs in seasons 1995–1997

¹dehelminthization, ²month

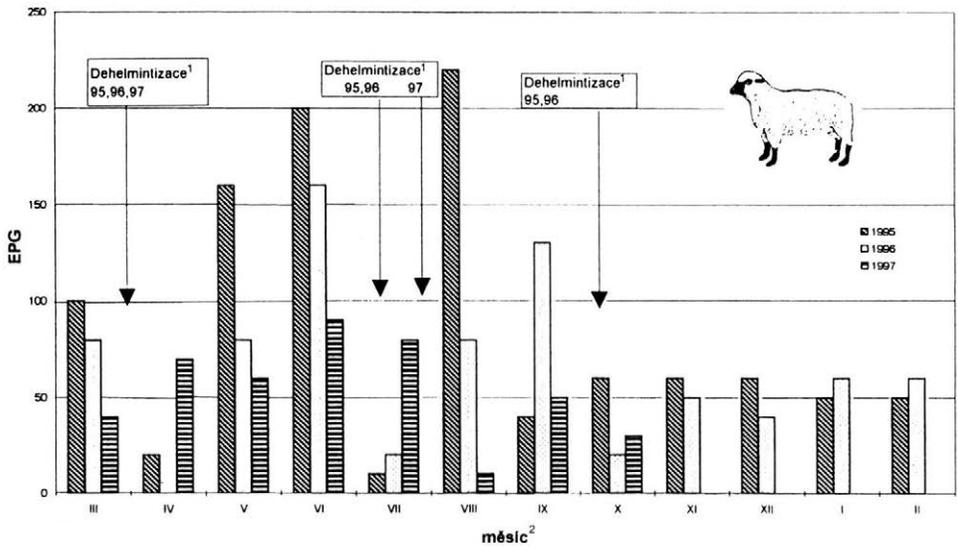
lem prováděná ve všech třech pastevních sezónách začátkem července byla vysoce účinná a snížila EPG i prevalenci téměř na nulové hodnoty. Opětný nárůst infekce GIN pokračoval u jehňat v letních měsících a v roce 1995 dosahovalo EPG maxima 370, v roce 1996 260 a v roce 1997 pouze 90. Rovněž tak prevalence byla v roce 1995 a 1996 vysoká (více než 60 %) a v roce 1997 poklesla na 28 %.

Velmi obdobnou dynamiku měly ve sledovaných letech kvantitativní nálezy a hodnoty prevalence u jehnic a bahnic (obr. 2). Maximální hodnoty EPG na konci druhého měsíce pastvy v roce 1995 dosahovaly 200, v roce 1996 pak 160 a v roce 1997 poklesly na 90. Významný byl i pokles prevalence z původních hodnot v roce 1995 kolem 50 % na 25 % v roce 1997. Také letní maxima byla u jehnic a bahnic nižší a dosahovala v roce 1995 EPG 220, v roce 1996 EPG 130 a v roce 1997 pouze 50. Hodnoty prevalence byly v těchto letech 44, 31 a 8 %. Prováděná podzimní odčervení albendazolem měla také vysokou účinnost, takže hodnoty EPG i prevalence jak u jehňat, tak u jehnic a bahnic byly v průběhu zimního ustájení minimální. Ovoskopické a kultivační nálezy ve vzorcích trusu jehňat, jehnic a bahnic prokazovaly v průběhu celého období vyšetřování přítomnost celkem 10 druhů, resp. rodů gastrointestinálních nematodů, a sice obligátně *Nematodirus*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus* *Chabertia* a ojedinele i *Oesophagostomum*, *Bunostomum*, *Cooperia*, *Haemonchus*, *Trichocephalus* a *Strongyloides*.

U tasemnic rodu *Moniezia* spp. byla dynamika infekce v prvních dvou letech obdobná jako u GIN. U jehňat (obr. 3) dosahovala jarní a letní maxima prevalence 59 % resp. 46 % v roce 1995, v následujících letech byl pozorován výrazný pokles, a sice v roce 1997 na 19 % resp. 25 %. U jehnic a bahnic (obr. 4) dosahovala prevalence tasemnicemi nejvyšších hodnot v prvním roce vyšetřování (25 %), v dalších letech se pak jarní a letní maxima pohybovala pouze v rozmezí 5 až 11 %. V průběhu zimního ustájení byly hodnoty prevalence velmi nízké (0 až 5 %).

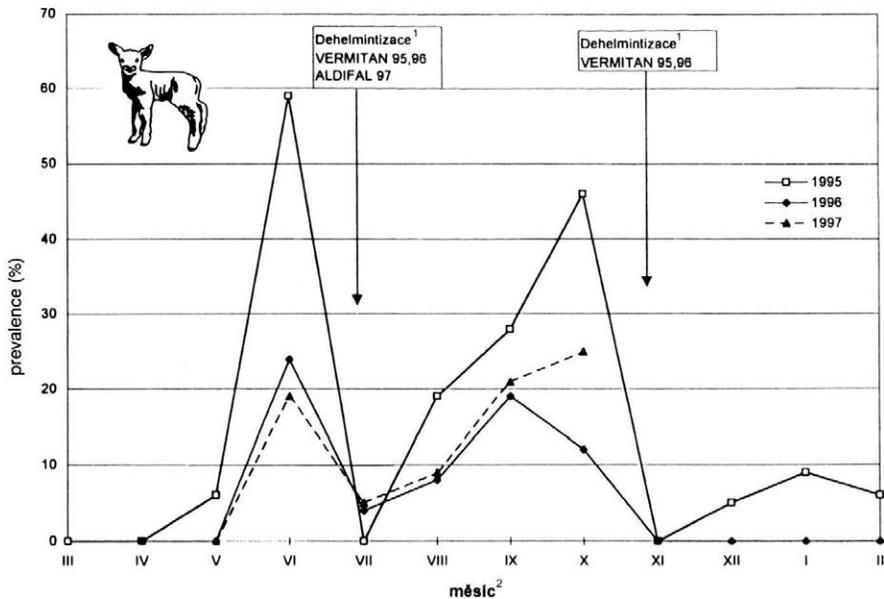
U skotu (obr. 5) měla křivka dynamiky GIN odlišný průběh než u ovcí. Odčervení bylo prováděno v letech 1995 a 1996 před a po skončení pastvy a v grafu je vyznačeno šipkami. Intenzita nálezů se postupně zvyšovala po celé pastevní období, avšak dosahovala výrazně nižších maximálních hodnot EPG než u ovcí a sice 75 v roce 1995, 35 v roce 1996 a 30 v roce 1997. Dominantními druhy u skotu byly *Ostertagia ostertagi*, *Cooperia oncophora* a *Oesophagostomum radiatum*, ojedinele i *Trichostrongylus* spp. a *Bunostomum phlebotomum*. Nálezy vajíček tasemnic *Moniezia* spp. byly u skotu zjištěny v roce 1995 a 1996, a to vždy pouze u jedné jalovce (prevalence 3,5 %).

Výsledky vyšetřování ovcí i skotu metodou sedimentační na přítomnost vajíček motolic *Fasciola hepatica* a *Dicrocoelium dendriticum* a metodou larvoskopickou na larvy plicnívek byly po celou dobu sledování negativní.



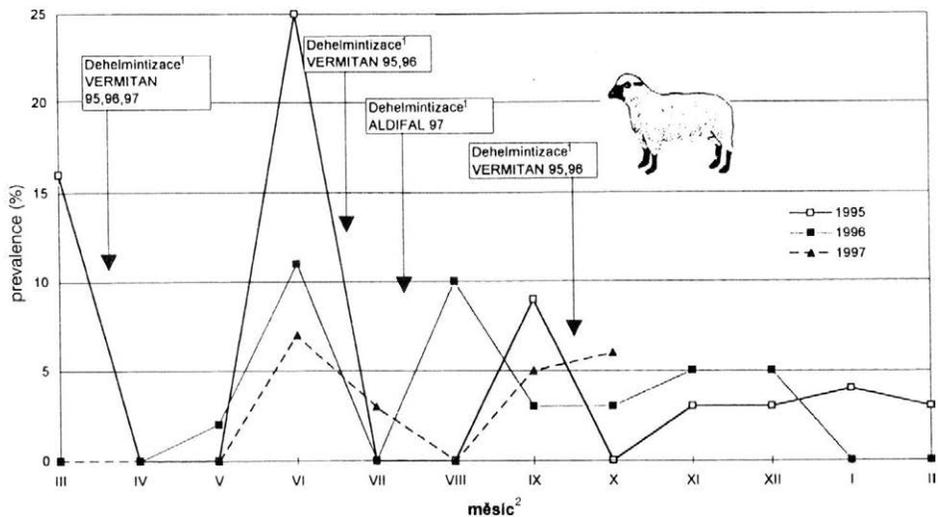
2. Dynamika ovoskopických nálezů gastrointestinálních nematodů (EPG) u bahnic a jehnic v letech 1995 až 1997 – Dynamics of ovoscopic findings of gastrointestinal nematodes (EPG) in ewes and yearlings in seasons 1995–1997

¹dehelminthization, ²month



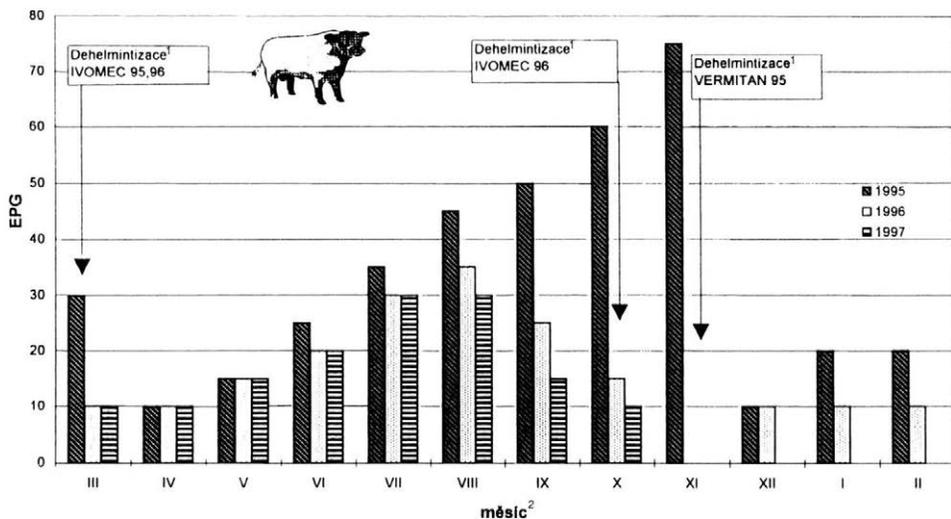
3. Dynamika prevalence *Moniezia* spp. u jehňat v letech 1995 až 1997 – Dynamics of prevalence of *Moniezia* spp. in lambs, seasons 1995–1997

¹dehelminthization, ²month



4. Dynamika prevalence *Moniezia* spp. u bahnic a jehnic v letech 1995 až 1997 – Dynamics of prevalence of *Moniezia* spp. in ewes and yearlings, seasons 1995–1997

¹dehelminthization, ²month



5. Dynamika ovoskopických nálezů gastrointestinálních nematodů (EPG) u skotu v letech 1995 až 1997 – Dynamics of ovoscopic findings of gastrointestinal nematodes (EPG) in cattle in seasons 1995–1997

¹dehelminthization, ²month

Kocidie rodu *Eimeria* byly obligátními nálezy v době ustájení u jehňat i bahnic (prevalence 98 %, resp. 74 %). Druhové zastoupení oocyst bylo v pořadí *E. ovina*, *E. ovinoidalis*, *E. parva*, *E. intricata*, *E. faurei* a *E. crandalis*. Po vyhnání zvířat na pastvu se však prevalence i intenzita vylučování oocyst rychle snižovaly a byly během celého pastevního období minimální. Nálezy oocyst rodu *Cryptosporidium* se vyskytovaly ojediněle u jehňat v prvním měsíci věku a cysty *Giardia* sp. rovněž u jehňat do dvou měsíců věku. U skotu byly zjišťovány ojedinělé nálezy *E. bovis*, *E. auburnensis* a *E. zuernii*.

DISKUSE

Tříleté sledování společné pastvy ovcí a skotu a podrobné laboratorní ovoskopické, larvoskopické a kvantitativní analýzy vzorků trusu odebraných v pravidelných měsíčních intervalech prokázaly u ovcí vysokou prevalenci vesměs čtyřmi až šesti druhy, resp. rody gastrointestinálních nematodů a tasemnicemi *Moniezia* spp., u skotu zpravidla dvěma až třemi druhy GIN. Vysoká intenzita a prevalence nálezu jak u GIN, tak u *Moniezia* spp., zjištěná na začátku našich sledování v březnu 1995 u všech věkových kategorií sledovaných zvířat, byla způsobena nesystematickou a málo účinnou dehelmintizací v předcházejícím období. Ještě v průběhu roku 1996 byla intenzita nálezu EPG u GIN poměrně vysoká především u jehňat, nižší u bahnic a jehnic, u skotu byla po celou dobu poměrně nízká. Tyto výsledky potvrzují naše dřívější vyšetřování prováděná u ovcí a skotu při jednodruhové pastvě (Chroust, 1975, 1976, 1995, 1997), že vylučování vajíček má v průběhu roku výrazně dynamický charakter. Rápidní zvyšování kvantitativních hodnot (EPG) i křivky prevalence v prvních dvou měsících pastvy rovněž potvrzuje naše dosavadní poznatky a ukazuje na rychlé promořování pastevního areálu a vysokou vnímavost jehňat (koncem června 1995 byly maximální hodnoty EPG u GIN 550 a prevalence 68 %, maximální hodnoty prevalence u *Moniezia* spp. 59 %) než u bahnic (v roce 1995 byly maximální hodnoty EPG u GIN 200, prevalence 50 % a u *Moniezia* spp. 25 %). Dehelmintizace ovcí prováděná s cílem tlumit vrcholy infekce v průběhu i po skončení pastvy prokázala vysokou účinnost albendazolu (Vermidan susp. 2,5 %, Aldifal susp. 2,5 %) v dávce 5 mg/kg ž. h. jak proti GIN, tak i proti tasemnicím. Jak je patrné z grafů, docházelo v dalších letech k postupnému snižování intenzity infekce i prevalence GIN a tasemnic, takže maximální hodnoty GIN u jehňat v roce 1997 dosahovaly EPG 180 a prevalence 53 %, u tasemnic 25 %; u jehnic a bahnic dosahovaly EPG 90 a prevalence u GIN 25 %, u tasemnic 7 %.

U skotu bylo první odčervování provedeno před zahájením pastvy v roce 1995 Ivomecem inj. na základě odhadu živé hmotnosti a nemělo dostatečnou účinnost. Po ukončení pastvy byl s dobrými výsledky použit al-

bendazol. Další dehelmintizace byly u skotu prováděny Ivomecem inj., avšak již na základě individuálního vážení. Vzhledem k velmi nízkým ovoskopickým nálezům nebylo nutné na začátku roku 1997 provádět odčervení u skotu.

Výsledky získané v této práci prokazují, že problematika gastrointestinálních helmintůz u ovcí a skotu představuje významný zdravotní problém a vyžaduje provádění cílené dehelmintizace. V souladu s našimi dřívějšími pokusy je možno konstatovat, že optimální termín pro dehelmintizaci bahnic je před vyhnáním na pastvu (do poloviny dubna). Další dehelmintizaci za účelem tlumení maxima infekce GIN a *Moniezia* spp. je nutné provádět u všech věkových skupin ovcí nejpozději začátkem července a další po ukončení pastvy na podzim. Podzimní dehelmintizace zajišťuje minimální promořenost zvířat v průběhu zimního ustájení. U skotu při společné pastvě s ovci v našich pokusech postačovala dehelmintizace prováděná vždy před vyhnáním na pastvu a po ustájení, dále pak individuálně v případě nálezu tasemnic *Moniezia* spp.

Při porovnání našich nálezu u ovcí a skotu při jednodruhové pastvě prováděné přibližně ve shodných podmínkách systému chovu (Chroust, 1995 a 1997) je možno konstatovat, že prevalence i intenzita gastrointestinálních helmintůz je při společné pastvě nižší. Tyto závěry jsou v souladu i s nálezy autorů, kteří prováděli parazitologická vyšetření ovcí a skotu při společné pastvě (Donald aj., 1987; Quintana aj., 1987; Jordan aj., 1988; Nolan a Connolly, 1990; Hintz, 1991). Společná pastva má značný význam i pro lepší využití pastevních porostů a zajišťuje dobré hmotnostní přírůstky zvířat.

LITERATURA

- DONALD, A. D. – MORLEY, F. H. W. – AXELSEN, A. – DONNELLY, J. R. – WALTER, P. J. (1987): Temperate pastures: their production, use and management. CSIRO, 567–569.
- HELLE, O. (1981): The significance of the winter survival of free-living stages on the epidemiology of nematodiasis: Its effect in connection with set-stocking and alternative grazing with sheep and cattle. *Curr. Trop. Vet. Med. Anim. Sci.*, 287–293.
- HINTZ, H. F. (1991): Mixed grazing. *Equine Pract.*, 13, 5–6.
- HORÁK, F. – ŽIŽLAVSKÝ, J. – ŽIŽLAVSKÁ, S. (1997): Possibilities of joint grazing of cattle and sheep in Lowland Regions. In: *Book of Abstracts of the 48th Annual Meeting of the European Association for Animal Production Vienna, Austria 25–28 August 1997*, p. 198.
- HULÍNSKÁ, I. (1969): Die Determinationsmerkmale der Invasionlarven bei Schafhelminthen. *Acta Sci. Nat. Acad. Sci. Bohem. (Brno)*, III, 1–25.
- CHROUST, K. (1970): Kvantitativní metoda pro stanovení počtu vajíček gastroenterohelmintů (oocyst kocidii) v trusu přežvýkavců a koní. *Metodiky ÚSVÚ Praha*, 312–313.

- CHROUST, K. (1975): Výzkum rozšíření, dynamiky invazí, patogenity a tlumení gastrointestinálních helmintůz u ovci a skotu. [Závěrečná zpráva.] Brno, VÚ, VŠV. 49 s.
- CHROUST, K. (1976): Economical aspects of treatment by Nilverm of sheep infested with gastrointestinal nematodes and lungworms. *Acta Vet. (Brno)*, 45, 251–262.
- CHROUST, K. (1995): Dynamic of gastrointestinal helminth infection in two systems of lamb rearing. *Acta Vet. (Brno)*, 64, 171–177.
- CHROUST, K. (1997): Tlumení gastrointestinálních helmintůz při pastevním odchovu jehňat. *Vet. Med. – Czech.*, 42 (3), 67–70.
- CHROUST, K. – HULÍNSKÁ, I. (1970): Metoda koprokultury pro diagnostiku invazních larev (LA III) gastrointestinálních nematodů přežvýkavců a koní. *Metodiky ÚSVÚ Praha*, 313–314.
- CHROUST, K. – HORÁK, F. – ŽIŽLAVSKÁ, S. (1997a): Dynamika gastrointestinálních helmintůz při permanentní pastvě ovcí a skotu. *Veterinářství*, 2, 60–62.
- CHROUST, K. – HORÁK, F. – ŽIŽLAVSKÝ, J. – ŽIŽLAVSKÁ, S. (1997b): Problems of parasitoses in joint grazing of cattle and sheep. In: *Book of Abstracts of the 48th Annual Meeting of the European Association for Animal Production*. Vienna, Austria 25–28 August 1997, p. 198.
- JORDAN, H. E. – PHILLIPS, W. A. – MORRISON, R. D. – DOYLE, J. J. – MCKENZIE, K. (1988): A three-year study of continuous mixed grazing of cattle and sheep: parasitism of offspring. *Int. J. Parasitol.*, 8, 779–784.
- NOLAN, T. – CONNOLLY, J. (1990): Effect of mixed grazing on establishment and maintenance of clover in a sown regrass with clover sward. *Soil grassland animal relationships*. In: *Proc. 13th General Meeting of the European Grassland Federation*. Banská Bystrica, Czechoslovakia, 25–29 June, p. 134.
- NOWAKOWSKI, P. (1996): Technical and ecological considerations on mixed grazing: a review. *Zesz. Nauk. Akad. Roln. Wrocław*, Nr. 291, 159–170.
- QUINTANA, S. – PEPE, C. – IBARBURI, A. – ZABALA, E. – NARI, A. – MARMOL, E. – FABREGAS, B. (1987): Helminth control in weaned on natural pasture. I. Alternative grazing with cattle in area of superficial basalt. *Veterinary Uruguay*, 23, 6–14.
- SPEEDY, A. W. – GIBSON, A. (1983): Sheep production. In: *HARESING, W. (ed.) London, Butterworths*, pp. 335–350.
- WALKER, J. W. (1994): The Ecological Advantage. *Sheep Research Journal (Special Issue)*, 52–64.
- ŽIŽLAVSKÝ, J. – HORÁK, F. – ŽIŽLAVSKÁ, S. (1996): Rearing beef cattle in lowland regions on joint pasture with sheep. *Zesz. Nauk. Akad. Roln. Wrocław*, Nr. 291, 53–62.

Received: 97–12–22

Accepted after corrections: 98–02–04

Kontaktní adresa:

Prof. MVDr. Karel Chroust, DrSc., Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1, 612 42 Brno, Česká republika
Tel. +420 5 41 56 22 62, fax +420 5 41 56 22 66

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna (ÚZLK)

Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38

Máte zájem o pravidelné sledování nejčerstvějších informací ze zahraničních odborných časopisů?

Tento požadavek Vám rádi splníme, objednáte-li si naši informační reprografickou službu „**Obsahy zahraničních časopisů a články**“ typu „**Current Contents**“.

Vyberete-li si z každoročně aktualizovaného **Seznamu časopisů objednaných do fondu ÚZLK** sledování nejzajímavějších časopisů z Vašeho oboru, zašleme Vám nejprve kopie obsahů nejčerstvějších čísel časopisů a na základě výběru kopie požadovaných článků.

Chtěli bychom Vás také upozornit na další reprografickou službu ÚZLK, a to na poskytování kopií článků z knih a časopisů, které jsou ve fondu ÚZLK. Požadavky na tyto kopie můžete uplatňovat v průběhu celého roku na formulářích „Objednávka reprografické práce“, které si můžete objednat v Technickém ústředí knihoven, Solniční 12, 601 74 Brno, pod katalog. č. TÚK 138-0.

Veškeré další informace a objednávky na reprografické služby včetně Vašich připomínek Vám poskytneme na adrese:

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna – ÚZPI
Odd. reproslužeb
Slezská 7, 120 56 Praha 2
Poštovní schránka 39
Telefonické dotazy: 02/24 25 79 39, linka 329, 421 nebo 306

ACCELERATION OF THE PENETRATION OF RABIES VIRUS VACCINATION STRAIN VNUKOVO-32 BY DEAE-DEXTRAN AT ORAL ADMINISTRATION TO SUCKLING MICE

URÝCHLENIE PENETRÁCIE VAKCINAČNÉHO KMEŇA VNUKOVO-32 DEAE-DEXTRANOM PRI ORÁLNEJ APLIKÁCII CICAJÚCIM MYŠIAM

R. Ondrejka, Š. Švrček, Z. Beníšek, A. Ďurove, J. Süliová

University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: The influence of DEAE-dextran on acceleration of the penetration of Vnukovo-32 vaccination strain was investigated in oral application experiments on suckling mice. The method of cryostat sections of organs and sections stained by the direct immunofluorescence method for detection of rabies antigen was used. The results of experiments confirmed that DEAE-dextran has an accelerating effect on the penetration of attenuated vaccination strain of rabies virus. Conditions for utilization of this knowledge for oral antirabies vaccination have been created.

penetration of virus; rabies; DEAE-dextran

ABSTRAKT: V porovnávacích pokusoch na cicajúcich myšiach bol študovaný vplyv prídania DEAE-dextranu pre potencovanie penetrácie vakcinačného kmeňa Vnukovo-32 pri orálnej aplikácii. Bola použitá metóda kryostatových rezov orgánov a tkanív farbených priamou metódou imunofluorescencie pre detekciu rabického antigénu. Výsledky pokusov potvrdili, že DEAE-dextran potencuje (akceleruje) penetráciu atenuovaného vakcinačného kmeňa rabického vírusu. Bolí vytvorené predpoklady pre využitie poznatkov pri orálnej antirabickej vakcinácii.

penetrácia vírusu; besnota; DEAE-dextran

ÚVOD

Adjuvantný efekt derivovaného polysacharidu DEAE-dextranu ako prví popísali Wittman a i. (1970, 1975); skúšali DEAE-dextran ako adjuvans inkorporovaný do vakcíny proti slintačke a krívačke.

Zvýšenie účinnosti – imunogénnej a antigénnej aktivity vakcíny po pridaní DEAE-dextranu ako adjuvansu bolo zaznamenané aj pri vakcínach proti ďalším infekčným chorobám: pri Aujeszkého chorobe (Goncalves a i., 1994), Newcastelskej chorobe (Rehmani a Spradbrow, 1995) a koronavírusových infekciách (Gaertner a i., 1993). Petrova a i. (1992) tiež vykonali úspešný terénny pokus s experimentálnou vakcínou proti infekčnej bovinnej rinotracheitíde s použitím DEAE-dextranu. Vplyv DEAE-dextranu na penetráciu vírusu *in vitro* v konečnej koncentrácii 25 mg/ml sa potvrdil pri izolácii vírusu besnoty na neuro-blastómovej myšej bunkovej línii (NA-C1300) – Webster a i. (1996).

Watanabe a i. (1994) v porovnávacích pokusoch na bunkových kultúrach taktiež zistili penetračný účinok DEAE-dextranu. Gaertner a i. (1993) vo svojich pokusoch s koronavírusmi a Hirano a i. (1996) s orbivirusmi využili DEAE-dextran na zvýšenie penet-

rácie vírusu v bunkovej kultúre BHK-21, čo sa prejavilo následne zvýšením tvorby plakov.

MATERIÁL A METÓDA

Pokusné zvieratá

K pokusom sme použili inbredné cicajúce myši vo veku dvoch až troch dní z chovu Výskumnej chovnej stanice laboratórnych zvierat SAV Dobrá Voda pri Trnave; k predpokusom (pre intracerebrálnu titráciu) myši rovnakého pôvodu o ž. hm. 6 až 8 g.

Vakcinačný kmeň

Bol použitý vakcinačný kmeň Vnukovo-32 na úrovni 107. sériovej pasáže na primárnej bunkovej kultúre obličiek sýrskych chrčkov (Aksenova a i., 1969). Podrobný popis jeho biologických vlastností, zvlášť zbytkovej virulencie, je uvedený v našej práci (Švrček a i., 1995). Vírus bol pomnožený na pasážovateľnej bunkovej línii obličiek sýrskych chrčkov BHK-21, klon S13. Ako udržiavacie médium sme použili bazálne Eaglovo médium (ÚSOL Praha) s prídáním 0,4% bo-

vinného sérumalbumínu. Infekčné médium až do jeho použitia k pokusom sme udržovali v zmrazenom stave pri teplote -70°C . Vakcinačný kmeň Vnukovo-32/107 sa už niekoľko rokov používa na prípravu vakcinačných návnad pre orálnu antirabickú vakcináciu líšok obyčajných na Slovensku (Švrček a i., 1995; Duróve a i., 1996; Ondrejka a i., 1997). Pred použitím vírusu k vlastným pokusom sme vykonali intracerebrálnu titráciu na myšiach o ž. hm. 6 až 8 g; objem inokula 0,03 ml. Nami použitá vírusová suspenzia kmeňa Vnukovo-32 mala titer $\log 10^{4,5}$ MICLD₅₀/0,03 ml.

Z takto vopred vytitrovaného vakcinačného vírusu sme pripravili tri varianty orálnej vakcíny, pričom k druhému a tretiemu variantu sme pridali DEAE-dextran (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden).

Imunizácia (infekcia) zvierat

K pokusom sme použili 2 až 3dňové inbredné cicajúce myši, ktoré sme rozdelili do troch skupín.

Do prvej skupiny boli zaradené zvieratá, ktorým sme orálne aplikovali 0,01 ml vakcinačného vírusu kmeň Vnukovo-32 bez prídania DEAE-dextranu.

V druhej skupine boli zvieratá, ktorým sme aplikovali orálne 0,01 ml vakcinačného vírusu, s prídanim 125 $\mu\text{g/ml}$ DEAE-dextranu.

V tretej skupine boli zvieratá, ktorým bolo aplikované orálne 0,01 ml vakcinačného vírusu s prídanim 250 $\mu\text{g/ml}$ DEAE-dextranu.

Množstvo pokusných zvierat sme zvolili tak, aby sme mohli vo vopred určených intervaloch (10 min, 2, 24, 48, 72, 96, 102, 108, 114, 126, 132, 138, 144, 168 h až do 264 h) po orálnej aplikácii – infekcii z každej skupiny usmrtiť éterom po päť myši.

Usmrtené myši sme zmrazili v tekutom propán-butáne a na drevené bločky pomocou arabskej gummy prilepili časti hlavy tak, aby sme mohli urobiť priečne rezy

zo sliznice dutiny ústnej a z mozgu na úrovni Ammonových rohov.

Takto pripravené bločky sme vložili do kryostatu (KL-120/30, Frigera, Kolín) pri teplote okolo -18°C , kde sme nechali vychladnúť tiež podložné sklíčka, na ktorých bola jemná vrstva glycerínu. Na takto pripravené sklíčka sme mikrotomom (Reichert, Vienna, Austria) narezali z jednotlivých častí hlavy myši 10 až 12 μm hrubé rezy. Po vysušení rezov pri izbovej teplote sme tieto fixovali v acetóne po dobu 4 h pri teplote -20°C a farbili priamou metódou imunofluorescencie (Goldwasser a Kissling, 1958; Hronovský, 1972; Dean a Abelseth, 1973) komerčným antirabickým konjugátom (Biovet Ivanovice na Hané). K prehladaniu preparátov sme použili fluorescenčný mikroskop (Nikon, Japonsko). Pri posudzovaní preparátov sme sa zamerali na tvar, charakter, množstvo a lokalizáciu antigénu rabického vírusu fluoreskujúcich útvarov.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky pokusov zameraných na štúdium možnosti potencovania penetrácie vakcinačného vírusu kmeňa Vnukovo-32 na úrovni 107. sériovej pasáže pri orálnej aplikácii na cicajúcich myšiach prídanim DEAE-dextranu sú uvedené v tab. I.

Výsledky pokusov svedčia, že DEAE-dextran potencuje (akceleruje) penetráciu rabického vírusu, keď sa aplikuje orálne spoločne s vírusom.

Preparáty, ktoré boli pripravené z orálne infikovaných cicajúcich myši v prvých časových intervaloch (po 10 min, po 2, 24, 48, 72, 96 a 102 h) od aplikácie vírusu boli negatívne.

108 h po orálnej aplikácii vakcinačného vírusu, sa v preparátov pripravených z druhej a tretej skupiny

I. Urýchlenie penetrácie vakcinačného vírusu kmeň Vnukovo-32 na úrovni 107. pasáže pri perorálnej aplikácii prídanim DEAE-dextranu v pokuse na cicajúcich myšiach – Acceleration of the penetration of vaccination virus Vnukovo-32 strain at the level of 107th passage at peroral application by DEAE-dextran administration in an experiment on suckling mice

Skupina zvierat ¹	Orgán ²	Doba vyšetrenia ⁶										
		10 min. až 96 h	102 h	108 h	114 h	120 h	126 h	132 h	138 h	144 h	168 h	192 až 264 h
Vírus bez prídania DEAE-dextranu ²	DU	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	M	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Vírus s prídanim 125 $\mu\text{g/ml}$ DEAE-dextranu ³	DU	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	M	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Vírus s prídanim 250 $\mu\text{g/ml}$ DEAE-dextranu ⁴	DU	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	M	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda – Legend:

DU = sliznica dutiny ústnej – oral cavity mucous membrane

M = mozog na úrovni Ammonových rohov – brain at the *cornu ammonis* level

PMIF = priama metóda imunofluorescencie – direct immunofluorescence method

+

- = negatívny nález pri PMIF – negative finding by PMIF

¹group of animals, ²virus without DEAE-dextran addition, ³virus with 125 $\mu\text{g/ml}$ DEAE-dextran addition, ⁴virus with 250 $\mu\text{g/ml}$ DEAE-dextran addition, ⁵body organ, ⁶time of examination

myši (kde bolo pridané 125 µg/ml, resp. 250 µg/ml DEAE-dextranu), objavila špecifická fluorescencia v rezoch, ktoré boli urobené na úrovni Ammonových rohov. Tak isto pozitívna detekcia rabického antigénu bola zistená aj v preparátoch, ktoré boli pripravené zo sliznice dutiny ústnej. Z prvej skupiny myši, kde sme k orálnej infekcii použili vakcinačný vírus bez prídania DEAE-dextranu, preparáty z obidvoch častí (sliznica dutiny ústnej, mozog) sme aj po 126 h hodnotili ako negatívne. Špecifická fluorescencia v preparátoch pripravených z prvej skupiny myši (bez prídania DEAE-dextranu) sa objavila po 138 h po aplikácii.

Preparáty sme robili a hodnotili až do 11. dňa od začiatku pokusu. Charakter fluorescencie sa v podstate nezmenil oproti preparátom pripraveným po 108, resp. 138 h po infekcii. Na základe priebežných pozorovaní je však možné súdiť o čiastočnom znížení počtu fluoreskujúcich útvarov počínajúc 10. dňom.

V našich pokusoch sme zistili, že DEAE-dextran potencuje (akceleruje) penetráciu vysoko atenuovaného vakcinačného kmeňa rabického vírusu Vnukovo-32/107.

Využitie potencionovania penetrácie prídanim DEAE-dextranu pri orálnom podaní vakcinačného kmeňa vírusu besnoty je v spojitosti s mechanizmom orálnej vakcinácie živými vakcínami. Vstupnou bránou pri orálnej antirabickej vakcinácii je sliznica dutiny ústnej. Prídanim DEAE-dextranu do infekčného bunkového média sa zvýšila schopnosť preniknutia vírusu do bukkálnej sliznice, a preto môžeme predpokladať aj potencionovanie imunologickej odpovede organizmu pri orálnej vakcinácii.

LITERATÚRA

AKSENOVA, T. A. – SELIMOV, M. A. (1969): Experimentálneho výrobu a kontrol kultúrnej antirabickej vakcíny Inštitúta poliomyelitidy a vírusnych encefalitov AMN SSSR. *Materialy XVI. naučnoj sessii IPVE AMN SSSR*, Moskva, 13–14.

DEAN, D. J. – ABELSETH, M. K. (1973): The fluorescent antibody test. In: KAPLAN, M. M. – KOPROWSKI, H. H. (eds.): *Laboratory techniques in rabies*. 3rd ed. Geneva, WHO, pp. 73–84.

ĐUROVE, A. – ŠVRČEK, Š. – SOKOL, J. – SŮLIOVÁ, J. – ONDREJKA, R. – BENÍŠEK, Z. – ZÁVADOVÁ, J. – JANUSOVÁ, K. – LOVÁS, B. – BORSUKOVÁ, O. – KUBINEC, J. (1996): Orale Immunisierung freilebender Rotfüchse gegen Tollwut in der Slowakei in Jahre 1994. *Wien. Tierärztl. Mschr.*, 83, 158–163.

GAERTNER, U. – WINOGRAD, D. F. – COMPTON, S. R. – PATURZO, F. X. – SMITH, A. L. (1993): Development and optimization of plaque assays for rat coronaviruses. *J. Virol. Meth.*, 43 (1), 53–64.

GOLDWASSER, R. A. – KISSLING, R. E. (1958): Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 98, 219–223.

GONCALVES, A. R. – VIDOR, T. – VAN DER LAAN, C. W. – SOBESTIANSKY, J. – VAN DER LAAN, C. W. (1994): The efficacy of three inactivated vaccines Aujeszky's disease. *Ciencia-Rural.*, 121–126.

HIRANO, N. – TAWARA, T. – NOMURA, R. – IMAI, A. – ONO, K. – YAMAGUCHI, R. (1996): Sensitive plaque assay and propagation of Chuzan (Kasba) virus, a palyam serogroup orbivirus, in BHK-21 cells. *J. Vet. Med., Series-B*, 43 (6), 333–342.

HRONOVSKÝ, B. (1972): IF reakce v diagnostice vztekliny. In: FRANĚK, J. a kol.: *Imunofluorescenční reakce v rychlé mikrobiologické diagnostice*. Praha, Avicenum, s. 207–218.

ONDREJKA, R. – ĐUROVE, A. – ŠVRČEK, Š. – BENÍŠEK, Z. – SŮLIOVÁ, J. (1997): Isolation and identification of Lyssa virus strains from the area of oral antirabies vaccination in Slovakia. *Vet. Med. – Czech*, 42 (1), 57–60.

PETROVA, I. A. – USMANOVA, G. V. – MURAVLEV, B. N. – BELOV, A. D. (1992): Comparative trial of experimental vaccines against infectious bovine rhinotracheitis, using various adjuvants. *Vopr. Vet. Biol.*, 65–68.

REHMANI, S. F. – SPRADBROW, P. B. (1995): The influence of adjuvants on oral vaccination of chickens against Newcastle disease. *Vet. Microbiol.*, 46, 1–3, 63–68.

ŠVRČEK, Š. – ĐUROVE, A. – ONDREJKA, R. – ZÁVADOVÁ, J. – SŮLIOVÁ, J. – BENÍŠEK, Z. – VRTIAK, O. J., FEKETEHOVÁ, D. – MAĐAR, M. (1995): Immunogenic and antigenic activity of an experimental oral rabies vaccine prepared from the strain Vnukovo-32/107. *Vet. Med. – Czech*, 40 (3), 87–96.

WATANABE, Y. – NOMOTO, H. – TAKEZAWA, R. – MIYOSHI, N. – AKAIKE, T. (1994): Highly efficient transfection into primary cultured mouse hepatocytes by use of cation-liposomes: an application for immunization. *J. Biochem. (Tokyo)*, 116 (6), 1220–1226.

WEBSTER, W. A. – CASEY, G. A. (1996): Virus isolation in neuroblastoma cell culture. In: MESLIN, F. X. – KAPLAN, M. M. – KOPROWSKI, H. (eds.): *Laboratory Techniques in Rabies*. Geneva, WHO, pp. 96–104.

WITTMANN, G. – BAUER, K. – MUSSGAY, M. (1970): Versuche zur Schutzimpfung von Schweiner aus inaktivierter Maul- und Klauenseuche Virus. II. Versuch mit Aethyllyl-äthylenimin-inaktivierten Virus und Diäthylaminoäthyl-Dextran (DEAE-D) als Adjuvants. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 29, 139–159.

WITTMANN, G. – DIETZSCHOLD, B. – BAUER, K. (1975): Some investigations on the adjuvant mechanism of DEAE-dextran. *Arch. Virol.*, 47, 225–235.

Received: 97–10–23

Accepted after corrections: 98–02–02

Kontaktná adresa:

MVDr. Róbert Ondrejka, CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 040 01 Košice, Slovenská republika
Tel. +421 95 622 99 24, fax +421 95 632 36 66

IAMS COMPANY

Award

— 1998 —

THE IAMS COMPANY AWARD FOR THE BEST CLINICAL ARTICLE

Since 1995 The Iams Company has inaugurated the Iams Company Award for the best clinical article published in an European Veterinary Journal by a junior veterinarian. All the Iams Company Awards were met with wide enthusiasm and each year over 30 outstanding articles were submitted to the independent Committee.

The winner of the Iams Company Award 1997, dr. B. Meij from Utrecht University in the Netherlands received his prize at the ESVIM Congress in Lyon in September 1997.

Building on the successes of last three episodes, The Iams Company invites young veterinary authors again to submit their publication(s) to participate in the competition for the Iams Company Award 1998. Nominees are veterinarians under 36 years of age (at the actual time of writing the manuscript), who have published a clinical paper in a peer reviewed European Veterinary Journal (national or international). The articles describe either clinically orientated basic research or a clinical study. Both retrospective and prospective studies as well as high quality review articles in the field of Clinical Companion Animal Medicine and Surgery can be nominated for the Iams Company Award. Articles should be submitted in their language of publication together with a full abstract in English.

The winner of the Iams Company Award 1998 will be announced during the ESVIM Congress in Vienna, 24 - 27 September 1998.

The prize for the winner of the Iams Company Award 1998 includes

1. ECU 2500.00 in cash
2. ECU 1500.00 in travel vouchers to attend the *ESVIM Congress*
3. free subscription to the *ESVIM Congress*
4. free subscription to specialist seminars during the *ESVIM Congress*
5. free participation to the social evening program of the *ESVIM Congress*
6. reprint of the article in the next issue of the *FECVA Journal*

The award winning manuscript will be selected by an independent committee consisting of three European clinicians eminent in the field of veterinary Medicine and Surgery. Manuscripts or copies of articles on any of the above mentioned subjects published between 1 July 1997 and 1 July 1998 should be submitted in quadruplicate, together with a CV of the first author, to: Dr. K. Jals (1998) - The Iams Company Award Committee, Merck & Co., Iams Pet Food International Inc., Lockhorweg 67, NL-8657 EA, Eindhoven, The Netherlands.

AS DEDICATED TO ANIMAL WELL-BEING AS YOU ARE.



NON-RADIOACTIVE *IN SITU* HYBRIDIZATION OF PORCINE
EMBRYOS: A METHOD TO DETECT AND LOCALIZE
THE EXPRESSION OF EARLY DEVELOPMENTAL GENES*NERADIOAKTIVNÍ HYBRIDIZACE *IN SITU* NA EMBRYÍCH PRASETE:
METODA DETEKCE A LOKALIZACE EXPRESE ČASNÝCH
VÝVOJOVÝCH GENŮT. Modric^{1,3}, F. A. Simmen^{1,2}¹ Department of Physiological Science, College of Veterinary Medicine,² Department of Dairy and Poultry Sciences, University of Florida, Gainesville, U.S.A.³ Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Manitoba, Winnipeg, Canada

ABSTRACT: *In situ* hybridization is a method commonly used for detection and cellular localization of gene transcription in mammalian embryos. During implantation, cells of the blastocyst synthesize paracrine signaling molecules in an appropriate manner, via alterations in trophoblast gene expression. We used a digoxigenin-labeled probe for detection of mRNA encoding the embryo isoform of porcine cytochrome P450 aromatase, the terminal enzyme in the estrogen biosynthetic cascade, to localize the cells in which transcription of this gene occurs in late preimplantation-stage porcine embryos. Trophoblast cells stained positive, indicating that transcription of the embryo aromatase isoform-encoding gene is active in these cells. Similar methods could be used to localize the expression of other early developmental genes in preimplantation porcine embryos.

in situ hybridization; swine; blastocyst; ovum implantation; cytochrome P450 aromatase; steroid synthesis

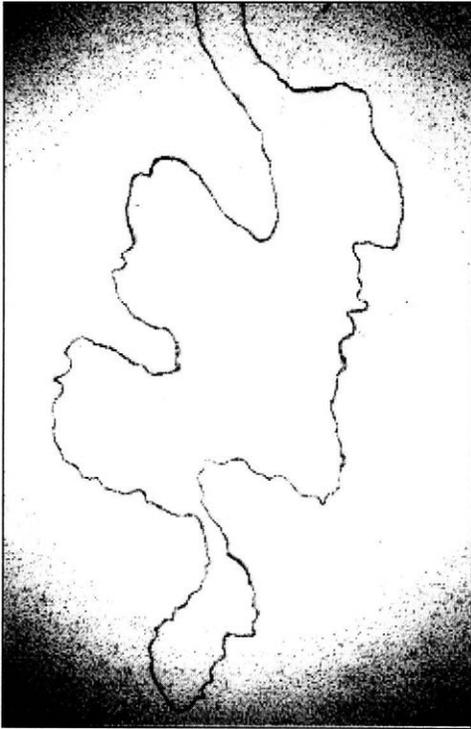
ABSTRAKT: Metoda hybridizace *in situ* se běžně používá k detekci a buněčné lokalizaci transkripce genů v embryích savců. Během implantace syntetizují buňky blastocysty prostřednictvím změn genové exprese v trofoblastu příslušná množství parakrinních signálních molekul. Použili jsme digoxigeninem značenou sonda pro detekci mRNA kódující embryonální izoformu prasečí aromatázy cytochromu P450, která je terminálním enzymem biosyntetické kaskády estrogenů. Pomocí této sondy byly lokalizovány buňky, ve kterých dochází k transkripci genu pro aromatázu v pozdním preimplantačním stadiu prasečích embryí. Buňky trofektodermy se barvily pozitivně, což ukazuje, že v těchto buňkách dochází k transkripci genu kódujícího embryonální izoformu aromatázy. Podobné metody mohou být použity k lokalizaci exprese dalších časných vývojových genů v preimplantačních embryích prasat.

hybridizace *in situ*; prase; blastocysta; implantace vajíček; cytochrom P450; syntéza steroidů

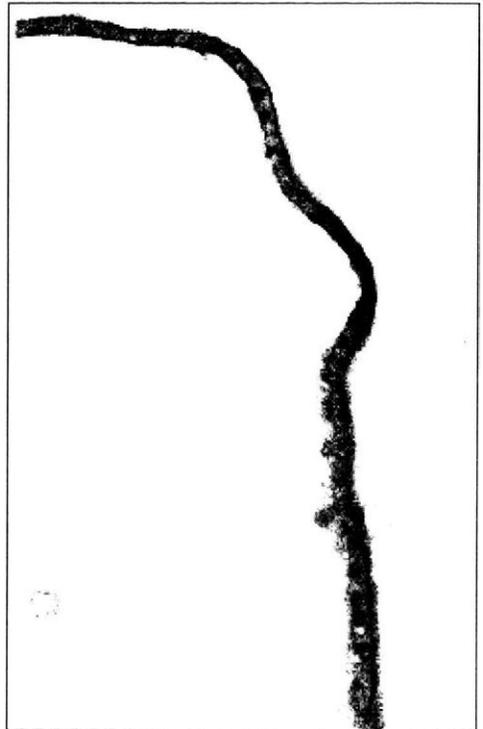
Blastocyst implantation, a critical event in porcine reproduction, is orchestrated by a host of molecular signals, released from the ovaries, the blastocyst and the uterus (Simmen et al., 1995). One implantation signal, released by the porcine blastocyst, is estrogen, the secretion of which peaks between days 11 and 12

post estrus (p.e.) (Bazer and Thatcher, 1977). The final reaction in estrogen biosynthesis is aromatization of androgens into estrogens, a process catalyzed by the enzyme cytochrome P450 aromatase (Miller, 1988). The presence of this enzyme has previously been detected in trophoblast and endodermal cells

* This work was supported by USDA Grants 93-37205-9172 and 95-37206-2317. This is Journal Series No. R-06181 from the University of Florida Agricultural Experiment Station.



1. Section of a day 12 porcine conceptus stained with hematoxylin and eosin; 40x

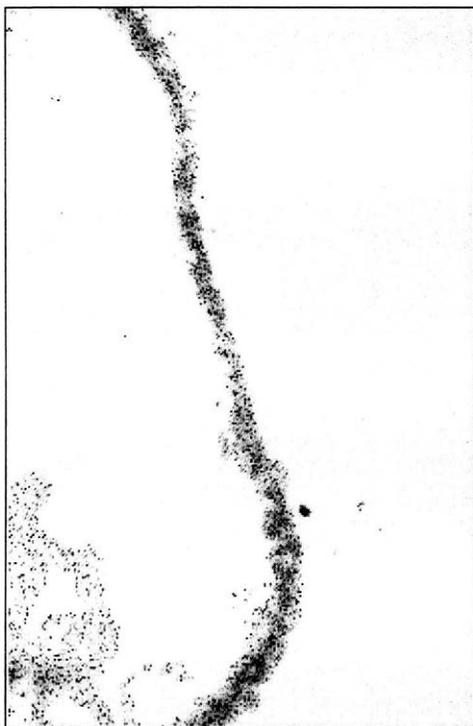


2. Section of a day 12 porcine conceptus stained with hematoxylin and eosin; 1000x

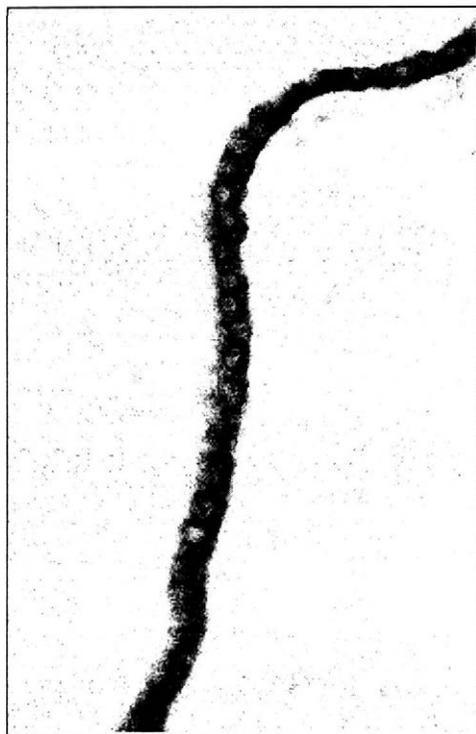
of the preimplantation porcine blastocyst (Conley et al., 1994; Ko et al., 1994). In the pig blastocyst, expression of the aromatase isoform type III mRNA (Choi et al., 1997b) coincides with this enzyme's expression, while in the placenta, aromatase isoform type II mRNA is predominant (Choi et al., 1997a). However, it is not known whether the mRNA expression of the type III aromatase gene encoding the embryonic isoform of aromatase, is restricted to particular cell types of the embryo.

In this study, we analyzed day 12 porcine blastocysts by *in situ* hybridization (ISH), in order to localize the site of type III aromatase transcription at this developmental stage. Prepubertal crossbred gilts were obtained and mated on their second estrus. Gilts were slaughtered at the university abattoir on day 12 *p.e.* Blastocysts were flushed in 20 ml of sterile phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2 and recovered into a sterile culture dish. Blastocysts were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS overnight, dehydrated in ethanol, cleared in xylene and embedded in paraffin. Five μm thin sections were mounted on Superfrost Plus (Fisher Scientific) microscope slides. Digoxigenin-labeled antisense and sense riboprobes were generated by *in vitro* transcription from the linearized PCR II plasmid (In-

vitrogen), containing the 500 bp fragment of porcine cDNA (exons 7–9), using the DIG RNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim). Transcription by T7 and SP6 RNA polymerase provided sense and antisense riboprobes, respectively. The antisense riboprobe was used for detection of type III aromatase transcripts, whereas the sense riboprobe was used as the negative control. Probes were alkaline-hydrolyzed to yield RNA fragments of approximately 100 nucleotides. The slides were heated to 80 °C for 10 minutes. After removal of paraffin, rehydration and equilibration in PBS, sections were placed sequentially in 0.2 N HCl (20 min), PBS (2 min), 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K in TE buffer (30 min), 0.3% Triton X-100 in PBS (15 min), 4% paraformaldehyde in PBS (10 min), 0.25% acetic anhydride/0.1 M triethanolamine (10 min) and PBS (2 min). The sections were prehybridized in a humidified chamber at 50 °C for 3 hours in 50% formamide, 5X SSC, 5X Denhardt's solution, 0.25 mg/ml yeast tRNA, 4 mM EDTA, 0.5% sodium dodecyl sulfate (3 h at 50 °C). Hybridization was in the same solution, with the addition of 10 ng/ml digoxigenin probe at 50 °C overnight. Following hybridization, the slides were rinsed twice in 2X SSC (15 min each), incubated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A in the same buffer (37 °C for



3. Section of a day 12 porcine conceptus subjected to ISH using digoxigenin-labeled positive strand of type III aromatase mRNA (negative control); 1000x



4. Section of a day 12 porcine conceptus subjected to ISH using digoxigenin-labeled negative strand of type III aromatase mRNA; 1000x. Cytoplasm of trophoblastic cells was stained, whereas cytoplasm of endodermal cells was unstained

30 min) and then washed in 0.1X SSC twice at 50 °C for 20 min and once at room temperature for 30 min. Hybridization was visualized by immunological detection of digoxigenin, using the DIG Nucleic Acid Detection kit (Boehringer Mannheim), according to the manufacturer's protocol.

Figs. 1 and 2 are representative images of day 12 porcine blastocysts stained with hematoxylin. Figs. 3 and 4 are representative images of porcine blastocysts subjected to ISH using the probe for type III aromatase. In Fig. 3, the positive strand was used to synthesize the probe, which served as control for nonspecific signal. It is essential to use such a control, since any probe may hybridize non-specifically at lower stringency conditions. Fig. 4 is the result of hybridization with the negative strand probe. The staining of trophoblast, but not endoderm layer, indicates that trophoblast, the most abundant cell layer at this developmental stage, is the major or only site of type III aromatase transcription. The finding that day 12 porcine trophoblast cells express the type III aromatase mRNA is consistent with findings by Conley et al. (1994) and Ko et al. (1994), who detected cytochrome P450 aro-

matase protein by immunohistochemistry, primarily in trophoblast of preimplantation porcine blastocysts. Taken together, these results indicate that transcription of the type III aromatase gene is coincident with translation of functional embryonic aromatase protein.

To the best of our knowledge, this is the first reported non-radioactive ISH study on preimplantation porcine blastocysts. The results demonstrate that ISH is a feasible method for characterization of gene expression in pre-implantation porcine blastocysts and that investigation of the expression of other genes in this tissue is possible. Unlike radioactive ISH, the non-radioactive method was found to provide resolution at the cellular level, without compromising sensitivity (Schad et al., 1996). Together with the fact that no radioactive waste is produced and that exposure to radioactive substances is eliminated, non-radioactive ISH can be considered a method of choice for localization of gene transcription in pig blastocysts. This study provides a modified protocol for ISH to detect the mRNA encoding the embryonic isoform of aromatase. Further studies are needed to investigate the possible coincident cellular expression of other steroidogenic genes, such

as those encoding P450scc, 3 β -HSD and 17 β -HSD, as well as the genes encoding growth factors and cytokines that possibly might serve as regulators of *conceptus steroidogenesis* (Ko et al., 1994). We anticipate that, with slight modification, this method can be used to detect the expression of other genes in porcine or other mammalian blastocysts.

REFERENCES:

BAZER, F. W. – THATCHER, W. W. (1977): Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F₂ alpha by the uterine endometrium. *Prostaglandins*, *14*, 397–400.

CHOI, I. – COLLANTE, W. R. – SIMMEN, R. C. M. – SIMMEN, F. A. (1997a): A developmental switch in expression from blastocyst to endometrial/placental-type cytochrome P450 aromatase genes in the pig and horse. *Biol. Reprod.*, *56*, 688–696.

CHOI, I. – TROYER, D. L. – CORNWELL, D. L. – KIRBY-DOBBELS, K. R. – COLLANTE, W. R. – SIMMEN, F. A. (1997b): Closely related genes encode developmental and tissue isoforms of porcine cytochrome P450 aromatase. *DNA Cell Biol.*, *16*, 769–777.

CONLEY, A. J. – CHRISTENSON, L. K. – FORD, S. P. – CHRISTENSON, R. K. (1994): Immunocytochemical localization of cytochromes P450 17 alpha-hydroxylase and aromatase in embryonic cell layers of elongating porcine blastocysts. *Endocrinology*, *135*, 2248–2254.

KO, Y. – CHOI, I. – GREEN, M. L. – SIMMEN, F. A. – SIMMEN, R. C. M. (1994): Transient expression of the cytochrome P450 aromatase gene in elongating porcine blastocysts is correlated with uterine insulin-like growth factor levels during peri-implantation development. *Mol. Reprod. Dev.*, *37*, 1–11.

MILLER, W. L. (1988): Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrin. Rev.*, *9*, 295–318.

SCHAD, A. – FAHIMI, H. D. – VOLKL, A. – BAUMGART, E. (1996): Nonradioactive *in situ* hybridization for detection of mRNAs encoding for peroxisomal proteins: Heterogeneous hepatic lobular distribution after treatment with a single dose of bezafibrate. *J. Histochem. Cytochem.*, *44*, 825–834.

SIMMEN, R. C. M. – GREEN, M. L. – SIMMEN, F. A. (1995): IGF system in periimplantation uterus and embryonic development. In: DEY, S. K. (ed.): *Molecular and Cellular Aspects of Periimplantation Processes*. New York, Inc., Springer-Verlag.

Received: 98-01-28

Contact Address:

Tomislav Modric, DVM, PhD, Postdoctoral fellow, Department of Physiology, Faculty of Medicine, 770 Bannatyne Avenue, University of Manitoba, Winnipeg, Canada R3E 0W3
e-mail: modric@cc.umanitoba.ca

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 požite- nou na PC s uvedením použitého programu. Tabulky, grafy a fotografie se dodávají zvlášť, nepodlepují se. Na všechny přílohy musí být odkazy v textu.

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

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

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

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

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

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

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

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

Literatura 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 prvních autorů.

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

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

Podrobné pokyny pro autory lze vyžádat v redakci.

Applications for detailed instructions for authors should be sent to the editorial office.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Original scientific papers, short communications, and selectively reviews, that means papers based on the study of technical literature and reviewing recent knowledge in the given field, are published in this journal. Published papers are in Czech, Slovak or English. Each manuscript must contain a short or a longer summary. The journal also publishes readers' views, remarks and comments in form of a text in italics, gloss, letter to the editor, short contribution, review of a major article, etc., and also experience of stays in foreign countries, meetings and conferences.

The authors are fully responsible for the originality of their papers, for its subject and formal correctness. The authors shall make a written declaration that their papers have not been published in any other information source.

The board of editors of this journal will decide on paper publication, with respect to expert opinions, scientific importance, contribution and quality of the paper. The editors accept papers approved to print by the head of the workplace or papers with all the authors' statement they approve it to print.

The extent of original papers shall not exceed ten typescript pages, including tables, figures and graphs.

Manuscript should be typed on standard paper (quarto, 30 lines per page, 60 strokes per line, double-spaced typescript). A PC diskette with the paper text or graphical documentation should be provided with the paper manuscript, indicating the used editor program. Tables, figures and photos shall be enclosed separately. The text must contain references to all these annexes.

The **title** of the paper shall not exceed 85 strokes and it should provide a clear-cut idea of the paper subject. Subtitles of the papers are not allowed either.

Abstract. It must present information selection of the contents and conclusions of the paper, it is not a mere description of the paper. It must present all substantial information contained in the paper. It shall not exceed 170 words. It shall be written in full sentences, not in form of keynotes and comprise base numerical data including statistical data.

Introduction has to present the main reasons why the study was conducted, and the circumstances of the studied problems should be described in a very brief form. This introductory section also provides information why the study has been undertaken.

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

Only original method shall be described, in other cases it is sufficient enough to cite the author of the used method and to mention modifications of this method. This section shall also contain a description of experimental material and the method of result evaluation.

In the section **Results**, which is the core of the paper, figures and graphs should be used rather than tables for presentation of quantitative values. A statistical analysis of recorded values should be summarized in tables. This section should not contain either theoretical conclusions or deductions, but only factual data should be presented here.

Discussion contains an evaluation of the study, potential shortcomings are discussed, and the results of the study are confronted with previously published results (only those authors whose studies are in closer relation with the published paper should be cited). The sections **Results** and **Discussion** may be presented as one section only.

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

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

If any abbreviation is used in the paper, it is necessary to mention its full form at least once to avoid misunderstanding. The abbreviations should not be used in the title of the paper nor in the summary.

The author shall give his full name (and the names of other collaborators), academic, scientific and pedagogic titles, full address of his workplace and postal code, telephone and fax number, or e-mail.

CONTENTS

Zralý Z., Bendová J., Šišák M., Diblíková I., Švecová D., Zajícová A., Věžník Z.: Occurrence of antibodies to the sperms in blood sera of bulls and boars (in English)	137
Doležel R., Čech S., Zajíc J.: Follicular development during the progesterone therapy of ovarian acyclicity and ovarian cysts in cows	145
Chroust K., Horák F., Žižlavský J., Žižlavská S.: The course and control of parasitoses in mixed grazing of sheep and cattle	153
Ondrejka R., Švrček Š., Beníšek Z., Ďurove A., Süliová J.: Acceleration of the penetration of rabies virus vaccination strain Vnukovo-32 by DEAE-dextran at oral administration to suckling mice	161
SHORT COMMUNICATION	
Modric T., Simmen F. A.: Non-radioactive <i>in situ</i> hybridization of porcine embryos: a method to detect and localize the expression of early developmental genes (in English)	165

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 43, č. 5, Květen 1998

OBSAH

Zralý Z., Bendová J., Šišák M., Diblíková I., Švecová D., Zajícová A., Věžník Z.: Výskyt protilátek proti spermiím v krevním séru býků a kanců	137
Doležel R., Čech S., Zajíc J.: Folikulární vývoj během léčby ovariální acyklie a ovariálních cyst u krav progesteronem	145
Chroust K., Horák F., Žižlavský J., Žižlavská S.: Průběh a tlumení parazitóz při společné pastvě ovcí a skotu	153
Ondrejka R., Švrček Š., Beníšek Z., Ďurove A., Süliová J.: Urýchlenie penetrácie vakcinačného kmeňa Vnukovo-32 DEAE-dextranom pri orálnej aplikácii cicajúcim myšiam	161
KRÁTKÉ SDĚLENÍ	
Modric T., Simmen F. A.: Neradioaktivní hybridizace <i>in situ</i> na embryích prasete: metoda detekce a lokalizace exprese časných vývojových genů	165