

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

8

VOLUME 43
PRAHA
AUGUST 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., Reinfeld, Switzerland

Arnost Cepica, 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. MVDr. 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 Věžík, 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: Agri, CAB Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

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

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

EVALUATION OF THE OCCURRENCE OF SOME HARMFUL POLLUTANTS ON CATTLE FARMS*

ZHODNOCENÍ VÝSKYTU VYBRANÝCH RIZIKOVÝCH POLUTANTŮ NA FARMÁCH SKOTU

J. Raszyk¹, V. Gajdůšková¹, R. Ulrich¹, A. Jarošová¹, A. Nápravník², J. Salava³, J. Palác³

¹*Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic*

²*State Veterinary Institute, Brno, Czech Republic*

³*District Veterinary Administration, Hodonín, Czech Republic*

ABSTRACT: Longitudinal investigations made on two cattle farms in Hodonín district from January 1995 to June 1997 included bulk fodder ($n = 11$), feed mixtures ($n = 16$), drinking water ($n = 13$), stable dust ($n = 15$), road surface dust ($n = 7$), soil ($n = 6$), cow hair ($n = 40$), bulk milk samples ($n = 27$), and muscles, liver, kidneys and fat of cows ($n = 21$) at three to four years of age. The samples were examined for contents of six harmful pollutants: mercury, cadmium, lead, gamma-hexachlorocyclohexane (Lindane), DDT sum and polychlorinated biphenyls (PCB – Delor 106). Taking into account sanitary regulations effective in the Czech Republic at the time of our observations, hygienic limits of these pollutants were exceeded: lead in drinking water in one sample (0.0673 mg/l); mercury in milk in one sample (0.003 mg/kg) and lead in milk in one sample (0.110 mg/kg); mercury in muscles in one sample (0.011 mg/kg). Elevated average concentrations of these pollutants were determined on cattle farms in Hodonín district in 1995 to 1997: mercury in muscles (0.0035 mg/kg) and in liver (0.0087 mg/kg); lead in muscles (0.0929 mg/kg), liver (0.1681 mg/kg) and kidneys (0.1981 mg/kg); Lindane in muscles (0.0580 mg/kg fat); DDT sum in milk (0.0630 mg/kg fat) and in muscles (0.0866 mg/kg fat). Harmful pollutants showed decreasing trends. Increasing concentrations of DDT sums (0.0055 mg/kg) and PCB – Delor 106 (0.0080 mg/kg) in bulk fodder and of Lindane (0.0066 mg/kg fat) in milk were recorded in 1997 only. Mercury, lead, Lindane and DDT loads of the examined cows in Hodonín district in 1995 to 1997 were higher than in other regions of the Czech Republic. The values of pollutant concentrations did not mostly exceed the valid hygienic limits. Conclusions: (1) there exists a broad spectrum of pollutants on cattle farms that may negatively influence the health of cows and their tenders; (2) pollutant penetration into the internal environment of cows may cause contamination of products of animal origin (milk, meat, viscera), and consequently consumers' health may be impaired; (3) permanent tasks of veterinary service include monitoring of pollutant spectrum on cattle farms, searching for pollutant sources and proposals of efficient preventive measures; (4) long-term monitoring of pollutant presence on some cattle farms in Hodonín district makes it possible to evaluate the efficiency of proposed preventive measures, and to estimate trends of pollutant occurrence on cattle farms; (5) information on the presence of harmful pollutants in the stable internal environment of cattle farms is usable for preventive and occupational medicine.

cows; feed; drinking water; stable dust; road dust; soil; hair; milk; muscles; liver; kidneys; fat; mercury; cadmium; lead; DDT; Lindane; polychlorinated biphenyls; sources; health risk

ABSTRAKT: V údobí od ledna 1995 do června 1997 bylo na okrese Hodonín ve dvou chovech skotu průběžně vyšetřováno objemné krmivo ($n = 11$), krmné směsi ($n = 16$), napájecí voda ($n = 13$), stájový prach ($n = 15$), vozovkový prach ($n = 7$), půda ($n = 6$), srst krav ($n = 40$), bazénové vzorky mléka ($n = 27$) a svalovina, játra, ledviny a tuk krav ($n = 21$) ve věku tří až čtyři roky. Výše uvedené vzorky byly vyšetřeny na obsah šesti vybraných rizikových polutantů: rtuť, kadmium, olovo, gama hexachlorocyclohexan (lindan), suma DDT a polychlorované bifenyls (PCB – Delor 106). Dle hygienických předpisů, platných v České republice v době našeho sledování, byly překročeny hygienické limity: v napájecí vodě u olova u jednoho vzorku (0,0673 mg/l); v mléce u rtuti u jednoho vzorku (0,003 mg/kg) a u olova u jednoho vzorku (0,110 mg/kg); ve svalovině u rtuti u jednoho vzorku (0,011 mg/kg). V chovech skotu na okrese Hodonín byly v údobí 1995 až 1997 zjištěny vyšší průměrné hladiny: rtuti ve svalovině (0,0035 mg/kg) a játrech (0,0087 mg/kg); olova ve svalovině (0,0929 mg/kg), játrech (0,1681 mg/kg) a ledvinách (0,1981 mg/kg); lindanu ve svalovině (0,0580 mg/kg tuku); sumy DDT mléce (0,0630 mg/kg tuku) a ve svalovině (0,0866 mg/kg tuku). Rizikové polutanty měly klesající tendenci. Jen v roce 1997 jsme zaznamenali zvyšující se hladiny sumy DDT (0,0055 mg/kg) i PCB – Delor 106 (0,0080 mg/kg) v objemných krmivech a lindanu

* Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Project RE 5564), Ministry of the Environment of the Czech Republic (Project GA/1650/93) and the Grant Agency of the Czech Republic (Grant No. 525/96/0924).

(0,0066 mg/kg tuku) v mléce. Vyšetřené krávy na okrese Hodonín byly v letech 1995 až 1997 více zatíženy rtuť, olovem, lindanem a DDT než v jiných regionech České republiky. Naměřené hodnoty polutantů ve velké většině nepřesahovaly platné hygienické limity. Závěry: (1) na farmách skotu se nachází široké spektrum polutantů, které mohou negativně ovlivňovat zdraví krav i jejich ošetřovatelů; (2) tím, že polutanty pronikají do vnitřního tělního prostředí krav může docházet ke kontaminaci surovin živočišného původu (mléko, maso, orgány) polutanty a následně k ohrožení zdraví spotřebitelů; (3) trvalým úkolem veterinární služby zůstává monitorovat spektrum polutantů na farmách skotu, vyhledávat jejich zdroje a navrhovat účinná preventivní opatření; (4) dlouhodobé sledování dynamiky polutantů na vybraných farmách skotu okresu Hodonín nám umožňuje vyhodnocovat účinnost navržených preventivních opatření a dále pak posuzovat trendy výskytu polutantů na farmách skotu; (5) poznatky o výskytu rizikových polutantů ve vnitřním stájovém prostředí farem skotu jsou využitelné i v preventivním a pracovním lékařství.

krávy; krmivo; napájecí voda; stájový prach; vozovkový prach; půda; srst; mléko; svalovina; játra; ledviny; tuk; rtuť; kadmium; olovo; DDT; lindan; polychlorované bifenylly; zdroje; zdravotní riziko

ÚVOD

Dynamiku rizikových polutantů v životním prostředí a potravním řetězci sledujeme na okrese Hodonín více než 10 let. Část okresu Hodonín (oblast kolem města Hodonína) patří mezi 17 oblastí s nejvíce narušeným životním prostředím v České republice. V poslední době jsme zhodnotili poznatky o výskytu rizikových polutantů na farmách prasat (Raszyk aj., 1996) a ve výrobních krmných směsích (Raszyk aj., 1997). Poté jsme zveřejnili údaje o obsahu karcinogenních polycyklických aromatických uhlovodíků (Raszyk aj., 1998a) a esterů kyseliny ftalové (Raszyk aj., 1998b) na farmách skotu a prasat. Souhrnné údaje o kontaminaci potravních řetězců cizorodými látkami v České republice jsou pravidelně publikovány Státní veterinární správou České republiky (Drápal a Valcl, 1995, 1996, 1997).

Cílem předkládané práce bylo zhodnotit výskyt vybraných polutantů (těžké kovy, chlorované pesticidy, polychlorované bifenylly) ve stájovém i mimostájovém prostředí farem skotu a ve vnitřním tělním prostředí (svalovina, játra, ledviny, tuk) či produktech (mléko) krav chovaných na okrese Hodonín v průběhu let 1995 až 1997. Hlavní důraz je kladen na objasňování zdrojů a cest přenosu polutantů na farmy skotu.

MATERIÁL A METODY

Výskyt rizikových polutantů byl sledován v údobí leden 1995 až červen 1997 ve dvou farmách skotu na okrese Hodonín.

Stručná charakteristika sledovaných chovů

V chovu skotu Na. je průměrně chováno 340 krav (kříženko červenostrakatého a černostrakatého plemene). Stáje mají plechový plášť, volné ustájení, pouze v porodnách vazné. Větrání je přetlakové. Je používána kruhová dojírna DZ 15 Agro Prostějov. Krmnou dávku pro krávy tvoří kukuřičná siláž, zelená vojtěška (v zimě vojtěškové seno), ječná sláma (v zimě řepné skrojky)

a krmné směsi pro dojnice. Voda k napájení krav pochází z veřejného zdroje, používají se miskovité napáječky. V areálu farmy je kotelná na černém uhlí. Průměrná laktace na dojnici činí 4 000 kg mléka za rok. Úroveň reprodukce krav je následující: březost po 1. inseminaci 65 %, service perioda 116 dní a inseminační index 1,2 až 1,5. Za rok průměrně uhynou tři krávy a nutně je odporazeno asi 50 krav. Nejčastější příčinou vyřazení krav na nutnou porážku jsou poruchy pohybového ústrojí a poporodní komplikace.

V chovu skotu Ne. je průměrně chováno 270 krav (kříženko červenostrakatého a černostrakatého plemene). Stáje jsou sestaveny z montovaných prefabrikátů. Jde o volné ustájení s nastlaným ložem. Je používána rybinová dojírna SAC Clauhan (Nizozemsko). Krmnou dávku pro krávy tvoří kukuřičná siláž, zelená vojtěška (v zimě vojtěškové seno), pšeničné otruby, ovesné slupky a krmné směsi pro dojnice. Voda k napájení krav pochází z veřejného zdroje, používají se miskovité napáječky. K vytápění farmy se používá elektrická energie. Průměrná laktace na dojnici činí 5 000 kg mléka za rok. Úroveň reprodukce krav je následující: březost po 1. inseminaci 55 %, service perioda 118 dní, inseminační index 1,6. Za rok průměrně uhynou tři krávy a nutně je odporazeno 30 krav. Nejčastější příčiny vyřazení krav na nutnou porážku jsou poruchy pohybového ústrojí, onemocnění trávicího ústrojí a poporodní komplikace.

Odběry vzorků

Vzorky objemných krmiv ($n = 11$) a krmných směsí ($n = 16$) byly odebírány přímo z krmných žlabů. Vzorky napájecí vody ($n = 13$) z napáječek přímo ve stájích.

Vzorky stájového sedimentovaného prachu ($n = 15$) byly odebírány elektrickým vysavačem z vnitřního zařízení stáje. Získaný stájový prach jsme přesívali přes síto o velikosti oka 0,7 mm. K analýze byly používány prachové částice menší než 0,7 mm.

Vzorky prachu usazeného na vozovkách ($n = 7$) byly odebírány z vozovek v areálech sledovaných farem skotu. Vozovkový prach byl získáván a zpracováván stejným způsobem jako stájový prach.

Vzorky půdy ($n = 6$) byly odebírány uvnitř areálu sledovaných farem skotu, a to ve vzdálenosti 10 až 15 m od stáji z hloubky 15 cm pod povrchem.

Srst krav byla odebírána elektrickým strojkem v krajině mezi rohy. Získaná srst byla 48 hodin propírána v 1% roztoku saponátového prostředku, opláchnuta pod tekoucí vodou, promyta v destilované vodě a vysušena při laboratorní teplotě.

Vzorky mléka byly odebírány jako bazénové vzorky v mléčnicích. Vzorky tělesných orgánů byly odebírány při porážce krav (ve věku tři až čtyři roky). Vzorky svaloviny byly odebírány z kaudální skupiny stehenních svalů pravé pánevní končetiny, vzorky jater z pravého jaterního laloku, vzorky ledvin z pravé ledviny a vzorky tuku z tukového pouzdra pravé ledviny.

Použité metody

Kadmium a olovo byly stanoveny atomovou absorpční spektrometrií (AAS) v plameni acetylen-vzduch na přístroji Perkin Elmer 3100 (Perkin Elmer, USA). Rtut na automatickém analyzátoru rtuti AMA (Altec, ČR) s využitím techniky generace par kovové rtuti s následným zachycením a obohacením v amalgamátu. Citlivost a reprodukovatelnost použitých metod jsou tyto: mez detekce – rtuť 0,1 ng/g, kadmium 1,0 ng/ml, olovo 10,0 ng/ml; reprodukovatelnost – rtuť 1,5 %, kadmium a olovo méně než 10,0 %.

Stanovení chlorovaných pesticidů a polychlorovaných bifenylů (PCB) bylo prováděno po extrakci organickými rozpouštědly a separaci koextraktů adsorpční sloupcovou chromatografií na koloně aktivního Florisilu vysoce rozlišovací kapilární plynovou chromatografií s detektorem ^{63}Ni ECD (Gajdůšková a Ulrich, 1992). Hodnocení analytů bylo prováděno z kalibračních křivek jednotlivých analytických standardů pomocí software Star chromatography Workstation, verze 4.0 ve spojení s plynovým chromatografem Varian Star 3600 CX (Varian, USA). PCB byly hodnoceny jako suma vyjádřená na Delor 106 (výšechlorované bifenylly). Suma DDT zahrnuje izomery o,p'-DDE, p,p'-DDE, o,p'-DDD, p,p'-DDD, o,p'-DDT, p,p'-DDT. Citlivost a reprodukovatelnost použitých metod jsou tyto: mez detekce – PCB 50,0 ng/g, DDT a lindan

10,0 ng/g; reprodukovatelnost – PCB, DDT a lindan méně než 10,0 %.

Hygienické limity ve sledovaných komoditách byly posuzovány dle předpisů platných v době našeho sledování (leden 1995 až červen 1997).

Obsah nežádoucích látek v krmivech se posuzoval dle přílohy k Vyhlášce č. 194/1996 Sb., kterou se provádí Zákon o krmivech č. 91/1996 Sb. Napájecí voda byla posuzována dle ČSN 757111 Pitná voda.

Obsah cizorodých látek v mléce, svalovině a vnitřních orgánech byl hodnocen podle Směrnice Ministerstva zdravotnictví ČR č. 50/1978 Sb. Obsah PCB byl posuzován dle nejvyšší přípustných hodnot PCB v poživatinách, tak jak byly stanoveny rozhodnutím hlavního hygienika ČR ze dne 20. 1. 1994, č. j. HEM-359-20.1.94.

K hodnocení výsledků byl použit program Stat Plus, verze 1.01 (Matoušková aj., 1992). Výsledky v tabulkách jsou vyjádřeny takto: počet vyšetřených vzorků (n), průměr, směrodatná odchylka. K posouzení statistické významnosti byl použit t -test.

VÝSLEDKY

Obsah rtuti, kadmia a olova v krmných směsích, objemných krmivech, napájecí vodě, stájovém prachu a vozovkovém prachu v chovech skotu (Na., Ne.) na okrese Hodonín v letech 1995 až 1997 je uveden v tab. I.

Hygienické limity, platné v době sledování, byly překročeny v napájecí vodě u olova u jednoho vzorku (1996, fa Ne. 0,0673 mg/l).

Obsah rtuti, kadmia a olova v srsti, mléce, svalovině, játrech a ledvinách krav v chovech skotu (Na., Ne.) na okrese Hodonín v letech 1995 až 1997 je uveden v tab. II.

Hygienické limity, platné v době sledování, byly překročeny v mléce u rtuti u jednoho vzorku (1995, fa Ne. 0,003 mg/kg) a u olova u jednoho vzorku (1996, fa Na. 0,110 mg/kg); ve svalovině u rtuti u jednoho vzorku (1995, fa Na. 0,011 mg/kg).

Obsah vybraných chlorovaných pesticidů a polychlorovaných bifenylů v krmných směsích, objemných krmivech, napájecí vodě, stájovém prachu, vozovko-

I. Obsah rtuti, kadmia a olova v krmných směsích, objemných krmivech, napájecí vodě, stájovém prachu a vozovkovém prachu v chovech skotu (Na., Ne.) v okrese Hodonín v letech 1995 až 1997 (průměr $\pm$ směrodatná odchylka) – Contents of mercury, cadmium and lead in feed mixtures, bulk fodders, drinking water, stable dust and road dust on cattle farms (Na., Ne.) in Hodonín district in 1995 to 1997 (mean $\pm$ standard deviation)

Vzorky ¹	n	Rtuť ²	Kadmium ³	Olovo ⁴
Krmná směs ⁵ (mg/kg)	16	0,0025 $\pm$ 0,0014	0,0508 $\pm$ 0,0232	0,2566 $\pm$ 0,1482
Objemné krmivo ⁶ (mg/kg)	11	0,0115 $\pm$ 0,0093	0,0437 $\pm$ 0,0321	0,4745 $\pm$ 0,4260
Napájecí voda ⁷ (mg/l)	13	<0,0001	0,0012 $\pm$ 0,0004	0,0093 $\pm$ 0,0178
Stájový prach ⁸ (mg/kg)	15	0,0290 $\pm$ 0,0183	0,2239 $\pm$ 0,4363	27,4953 $\pm$ 55,9149
Vozovkový prach ⁹ (mg/kg)	7	0,0517 $\pm$ 0,0271	0,5823 $\pm$ 0,6496	18,9854 $\pm$ 8,9913

¹ samples, ² mercury, ³ cadmium, ⁴ lead, ⁵ feed mixture, ⁶ bulk fodder, ⁷ drinking water, ⁸ stable dust, ⁹ road dust

II. Obsah rtuti, kadmia a olova v srsti, mléce, svalovině, játrech a ledvinách krav v chovech skotu (Na., Ne.) v okrese Hodonín v letech 1995 až 1997 (průměr ± směrodatná odchylka) – Contents of mercury, cadmium and lead in the hair, milk, muscles, liver and kidneys of cows on cattle farms (Na., Ne.) in Hodonín district in 1995 to 1997 (mean ± standard deviation)

Vzorky ¹	<i>n</i>	Rtut ²	Kadmium ³	Olovo ⁴
Srst ⁵ (kg/mg)	40	0,0165 ± 0,0114	0,0295 ± 0,0333	0,8183 ± 0,8862
Mléko ⁶ (kg/mg)	27	0,0009 ± 0,0006	0,0015 ± 0,0011	0,0228 ± 0,0204
Svalovina ⁷ (kg/mg)	21	0,0035 ± 0,0029	0,0102 ± 0,0055	0,0929 ± 0,0315
Játro ⁸ (kg/mg)	21	0,0087 ± 0,0116	0,0773 ± 0,0434	0,1681 ± 0,0954
Ledviny ⁹ (kg/mg)	21	0,0121 ± 0,0072	0,2976 ± 0,2157	0,1981 ± 0,1055

For 1 to 4 see Tab. I; ⁵hair, ⁶milk, ⁷muscles, ⁸liver, ⁹kidneys

III. Obsah vybraných chlorovaných pesticidů a polychlorovaných bifenylů v krmných směsích, objemných krmivech, napájecí vodě, stájovém prachu, vozovkovém prachu a půdě v chovech skotu (Na., Ne.) v okrese Hodonín v letech 1995 až 1997 (průměr ± směrodatná odchylka) – Contents of some chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in feed mixtures, bulk fodders, drinking water, stable dust, road dust and soil on cattle farms (Na., Ne.) in Hodonín district in 1995 to 1997 (mean ± standard deviation)

Vzorky ¹	<i>n</i>	Lindan ²	Suma DDT ³	PCB-Delor 106
Krmná směs ⁵ (mg/kg)	16	0,0035 ± 0,0058	0,0024 ± 0,0017	0,0050 ± 0,0081
Objemné krmivo ⁶ (mg/kg)	11	0,0092 ± 0,0123	0,0034 ± 0,0024	0,0054 ± 0,0039
Napájecí voda ⁷ (mg/kg)	15	11,5567 ± 17,4125	5,0700 ± 4,5060	13,4347 ± 11,8870
Stájový prach ⁸ (mg/kg)	15	0,0358 ± 0,0504	0,0226 ± 0,0206	0,0350 ± 0,0249
Vozovkový prach ⁹ (mg/kg)	7	0,0201 ± 0,0137	0,0406 ± 0,0364	0,1795 ± 0,1743
Půda ¹⁰ (mg/kg)	6	0,0041 ± 0,0053	0,0570 ± 0,0558	0,3075 ± 0,6525

¹samples, ²Lindane, ³DDT sum; for 5 to 9 see Tab. I; ¹⁰soil

IV. Obsah vybraných chlorovaných pesticidů a polychlorovaných bifenylů v mléce, svalovině a tuku krav v chovech skotu (Na., Ne.) v okrese Hodonín v letech 1995 až 1997 (průměr ± směrodatná odchylka) – Contents of some chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in milk, muscles and fat of cows on cattle farms (Na., Ne.) in Hodonín district in 1995 to 1997 (mean ± standard deviation)

Vzorky ¹	<i>n</i>	Lindan ²	Suma DDT ³	PCB-Delor 106
Mléko ⁴ (mg/kg tuku) ⁷	27	0,0055 ± 0,0053	0,0630 ± 0,0310	0,0431 ± 0,0265
Svalovina ⁵ (mg/kg tuku) ⁷	21	0,0580 ± 0,0645	0,0866 ± 0,1028	0,1237 ± 0,1420
Tuk ⁶ (mg/kg tuku) ⁷	21	0,0340 ± 0,1024	0,0765 ± 0,0866	0,1204 ± 0,1843

For 1 to 3 see Tab. III; ⁴milk, ⁵muscles, ⁶fat, ⁷(mg/kg fat)

vém prachu a půdě v chovech skotu (Na., Ne.) na okrese Hodonín v letech 1995 až 1997 je uveden v tab. III.

Hygienické limity, platné v době sledování, nebyly překročeny ani u jednoho vzorku.

Obsah vybraných chlorovaných pesticidů a polychlorovaných bifenylů v mléce, svalovině a tuku krav v chovech skotu (Na., Ne.) na okrese Hodonín v letech 1995 až 1997 je uveden v tab. IV.

Hygienické limity, platné v době sledování, nebyly překročeny ani u jednoho vzorku.

DISKUSE

Výrazně vyšší obsah rtuti ($P < 0,01$) v objemných krmivech (0,0115 mg/kg), než v krmných směsích (0,0025 mg/kg) pro skot je pravděpodobně způsoben atmosférickým spadem rtuti na rostliny (objemná krmiva) v období vegetace. Mezi hlavní zdroje rtuti v ovzduší jsou zařazovány: spalování fosilních paliv, spa-

lovny odpadů, různé průmyslové aktivity a výroba cementu (Sang a Louris, 1997).

Zvýšené hladiny olova byly zjištěny ve stájovém prachu z kravinů (27,5 mg/kg) a ve vozovkovém prachu na farmách skotu (19,0 mg/kg). Mezi hlavní zdroje olova ve stájovém prostředí lze zařadit nátěrové hmoty s obsahem olova, minerální komponenty krmných směsí kontaminované olovem, staré olověné akumulátory odložené někdy ve stájích a poolověné vodící lišty Niedax (používané k rozvodu elektrického vedení ve stájích). Hlavním zdrojem olova ve vozovkovém prachu jsou emise z provozu automobilů (olovnaté benziny) a půda v okolí vozovek.

Cibulka aj. (1989) sledovali obsah rtuti, kadmia a olova v srsti novorozenech telat ve třech regionech České republiky. Hladiny těžkých kovů v srsti telat se pohybovaly v rozsahu (mg/kg): rtuť 0,07 až 0,77, kadmium 0,009 až 0,074 a olovo 0,11 až 0,55. Milhaud a Mehennaoui (1988) zjistili u krav chovaných v oblasti kontaminované olovem průměrnou hladinu

olova v srsti 10 mg/kg. U krav na okrese hodonín byla průměrná hladina olova v srsti (0,8 mg/kg) 12krát nižší.

V humánní medicíně se vyšetření vlasů na obsah těžkých kovů využívá i k odhadu expozice lidí těžkými kovy (Bencík aj., 1995). Vyšetření obsahu jednotlivých těžkých kovů v lidských vlasech má rozdílnou vypovídací schopnost (Wilhelm a Idel, 1996). Nejvyšší vypovídací schopnost má vyšetření metylrtuti (organická rtuť) ve vlasech. Jde o optimální biomarker expozice jednotlivce metylrtutí. Vyšetření obsahu olova ve vlasech je doporučováno jako spolehlivá metoda screeningu pro malé skupiny (zvláště děti), zatím co stanovení koncentrace kadmia ve vlasech lze použít pouze jako orientační screeningovou metodu pro velké skupiny obyvatelstva.

Významným zjištěním jsou zvýšené hladiny lindanu v objemných krmivech (0,009 mg/kg) pro krávy. Průměrná hladina lindanu v objemných krmivech v České republice v roce 1995 činila 0,006 mg/kg (Drápal a Valcl, 1996). Na okrese Hodonín se od roku 1990 několikanásobně zvýšily osevní plochy řepky olejné. K postřiku řepky olejné proti škůdci krytonosci zelnému se používají dva přípravky obsahující lindan, a to Lindram WP 80 a Lindan 50/35 WP. Lze tedy předpokládat, že kolikrát se zvýšily osevní plochy řepky olejné na okrese Hodonín, tolikrát se zvýšilo použití lindanu v tomto regionu.

Ze sledovaných organických polutantů (lindan, DDT, PCB) dominují ve vozovkovém prachu a v půdě polychlorované bifenyls (vozovkový prach: 0,18 mg/kg; půda: 0,31 mg/kg). Na farmách skotu jsou tři hlavní zdroje PCB, a to staré nátery, transformátory a kondenzátory.

Významným zdrojem PCB může být i půda, ze které se PCB odpařují do ovzduší. Přitom v letních měsících je odpařování PCB z půdy pětikrát vyšší, než v zimních měsících (Kaupp aj., 1996). Šišák aj. (1995) použili RIA metodu ke screeningovému vyšetření PCB v mléce krav v České republice. Dle jejich zjištění byl okres Hodonín posouzen jako region více kontaminovaný PCB.

Relativně vysoké hladiny DDT byly zjištěny v kravském mléce (0,063 mg/kg tuku), a to zejména vzhledem k obsahu DDT ve svalovině (0,087 mg/kg tuku) a v tuku ledvinového pouzdra (0,076 mg/kg tuku) krav, což dokládá vysoké vylučování DDT mlékem krav. Vzhledem ke skutečnosti, že některým izomerům DDT (např. o,p'-DDT) se přisuzuje významná role v patogenezi rakoviny prsu u žen (Zava aj., 1997; Dees aj., 1997), považujeme tyto nálezy za varovné. Použití DDT v zemědělství v České republice bylo zakázáno již v roce 1974, do té doby však byly přípravky DDT intenzivně využívány. Tento fakt potvrzují nálezy DDT v půdě v okolí kravin (0,057 mg/kg). Bylo doloženo, že rezidua DDT přetrvávají v půdě více než 30 let (Diamond a Owen, 1996). Aktuálním zdrojem DDT mohou být komponenty krmných směsí (soja, rybí moučka) dovážené ze zemí, kde se doposud DDT plně využívá v programu tlumení malárie či hubení

mouchy tse-tse (Rivero Rodriguez aj., 1997). Tomu nasvědčují i vysoké hladiny DDT (0,03 mg/kg) v sedimentovaném prachu odebraném z vnitřního zařízení dvou výroben krmných směsí na okrese Hodonín (Raszyk aj., 1997). Dovozové komponenty tvoří 10 až 17 % zde vyráběných krmných směsí.

Na farmách skotu okresu Hodonín jsme zjistili i vysoké hladiny polycyklických aromatických uhlovodíků – PAH (Raszyk aj., 1998a). Z karcinogenních PAH na farmách skotu převládají chrysen, benzo(a)antracen a benzo(b)fluoranten. Mezi významné zdroje PAH na farmách skotu patří: výfukové plyny z traktorů; činnost opravárenských dílen na farmách; použití asfaltu jako izolačního a spárovacího materiálu; vyjetý motorový olej, který prosakuje při netěsnosti motoru, což je zvláště nebezpečné při udusávání siláží pásovým traktozem; odírání povrchu pneumatik o vozovky; produkty spalování uhlí, používaného při vytápění farem; spalování komunálního odpadu na farmách; hoření stohů slámy; provoz motorových silničních vozidel (zejména těch co používají naftu); atmosferický spád PAH (který je vyšší v zimních měsících); dřevoimpregnační látky.

V prostředí farem skotu se vyskytují i estery kyseliny ftalové (ftaláty). Hlavním zdrojem ftalátů na farmách skotu jsou PVC materiály, které mohou obsahovat až 40 % ftalátů. Významným zdrojem ftalátů jsou i komerčně vyráběné krmné směsi (Raszyk aj., 1998b).

Ve srovnání s hodnotami, které byly zjištěny při plánovaných odběrech v chovech skotu v České republice (Drápal a Valcl, 1995, 1996, 1997) byly na okrese Hodonín v údobí 1995 až 1997 zjištěny vyšší průměrné hladiny: rtuti ve svalovině (0,0035 mg/kg) a játrech (0,0087 mg/kg) krav; olova ve svalovině (0,0929 mg/kg), játrech (0,1681 mg/kg) a ledvinách (0,1981 mg/kg) krav; lindanu v objemných krmivech (0,0092 mg/kg) a svalovině (0,0580 mg/kg tuku) krav; sumy DDT v krmných směších (0,0024 mg/kg), mléce (0,0630 mg/kg tuku) a svalovině (0,0866 mg/kg tuku) krav.

Vyšetřené krávy na okrese Hodonín byly v letech 1995 až 1997 více zatíženy rtutí, olovem, lindanem a DDT než v jiných regionech v České republice. Naměřené hodnoty však ve velké většině nepřesahovaly hygienické limity platné do konce roku 1997.

Pozitivně lze hodnotit skutečnost, že na farmách skotu okresu Hodonín (Na., Ne.) měly vybrané rizikové polutanty, sledované v environmentálních vzorcích, klesající tendenci. Jen v roce 1997 jsme zaznamenali zvyšující se hladiny šumy DDT (0,0055 mg/kg), stejně jako PCB – Delor 106 (0,0080 mg/kg) v objemných krmivech a lindanu (0,0066 mg/kg tuku) v mléce.

V prosinci 1997 vstoupilo v platnost posuzování obsahu polutantů v potravinách dle nové Vyhlášky Ministerstva zdravotnictví (Sb. zákon č. 298/1997, částka 99), kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin. Příloha č. 3 k Vyhlášce č. 298/1997 Sb. uvádí tyto hygienické limity: rtuť (mg/kg) – svalovina 0,05; ledviny 0,1; mléko 0,01

kadmium (mg/kg) – svalovina 0,1; ledviny 2,0; mléko 0,01
 olovo (mg/kg) – svalovina 0,1; ledviny 0,7; mléko 0,02
 lindan – svalovina 2,0 mg/kg tuku; mléko 0,01 mg/kg
 suma DDT (suma čtyř izomerů DDT) – svalovina 1,0 mg/kg tuku; mléko 0,05 mg/kg
 suma PCB (suma sedmi indikátorových kongenerů PCB) (mg/kg tuku) – svalovina prasat 0,5; svalovina skotu 0,7; sádlo vepřové 0,5; lůj hovězí 0,7; mléko 0,3.

ZÁVĚR

Na farmách skotu se nachází široké spektrum polutantů, které mohou negativně ovlivňovat zdraví krav i jejich ošetřovatelů.

Tim, že polutanty pronikají do vnitřního tělního prostředí krav, dochází ke kontaminaci surovin živočišného původu (mléko, maso, orgány) polutanty a následně k ohrožení zdraví spotřebitelů.

Trvalým úkolem veterinární hygienické služby zůstává monitorovat spektrum polutantů na farmách skotu, vyhledávat jejich zdroje a navrhnout účinná preventivní opatření.

Dlouhodobé sledování dynamiky polutantů na vybraných farmách skotu okresu Hodonín nám umožňuje vyhodnocovat účinnost preventivních opatření a dále pak posuzovat trendy výskytu polutantů na farmách skotu.

Poznatky o výskytu rizikových polutantů na farmách skotu jsou využitelné i v preventivním a pracovním lékařství.

LITERATURA

BENCKO, V. – CIKRT, M. – LENER, J. (1995): Toxické prvky v životním a pracovním prostředí člověka. 2. vyd. Praha, Grada Publishing. 282 s.
 CIBULKA, J. – MIHOLOVA, D. – PISA, J. – SOVA, Z. – MADER, P. – JANDURAVA, S. – SZAKOVA, J. – PYTLOUN, J. (1989): Natural levels of lead, cadmium and mercury in tissues and hair of newborn calves from different areas of Czechoslovakia. *Sci. Total Environ.*, 84, 101–112.
 DEES, C. – ASKARI, M. – FOSTER, J. S. – AHAMED, S. – WIMALASENA, J. (1997): DDT mimics estradiol stimulation of breast cancer cells to enter the cell cycle. *Mol. Carcinogen.*, 18, 107–114.
 DIAMOND, J. B. – OWEN, R. B. (1996): Long-term residues of DDT compounds in forest soils in Maine. *Environ. Pollut.*, 92, 227–230.
 DRÁPAL, J. – VALCL, O. (eds.) (1995): Kontaminace potravních řetězců cizorodými látkami. Situace v roce 1994. *Inf. Bull. SVS ČR*. 268 s.

DRÁPAL, J. – VALCL, O. (eds.) (1996): Kontaminace potravních řetězců cizorodými látkami. Situace v roce 1995. *Inf. Bull. SVS ČR*. 277 s.
 DRÁPAL, J. – VALCL, O. (eds.) (1997): Kontaminace potravních řetězců cizorodými látkami. Situace v roce 1996. *Inf. Bull. SVS ČR*. 191 s.
 GAJDŮŠKOVÁ, V. – ULRICH, R. (1992): Využití analýzy specifických kongenerů polychlorovaných biphenylů pro kontrolu potravin a surovin živočišného původu. *Vet. Med. – Czech (Praha)*, 37, 471–478.
 KAUPP, H. – DORR, G. – HIPPELEIN, M. – MCLACHLAN, M. S. – HUTZINGER, O. (1996): Baseline contamination assessment for a new resource recovery facility in Germany. 4. Atmospheric concentrations of polychlorinated biphenyls and hexachlorobenzene. *Chemosphere*, 32, 2029–2042.
 MATOUŠKOVÁ, O. – CHALUPA, J. – CIGLER, M. – HRUŠKA, K. (1992): Stat Plus – uživatelská příručka, verze 1.01. 1. vyd. Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství. 256 s.
 MILHAUD, G. E. – MEHENNAOUI, S. (1988): Indicators of lead, zinc and cadmium exposure in cattle. I. Results in a polluted area. *Vet. Hum. Toxicol.*, 30, 513–517.
 RASZYK, J. – GAJDŮŠKOVÁ, V. – ULRICH, R. – NEZVEDA, K. – JAROŠOVÁ, A. – ŠABATOVÁ, V. – DOČEKALOVÁ, H. – SALAVA, J. – PALÁC, J. – SCHÖNDORF, J. (1996): Zhodnocení výskytu rizikových polutantů u výkrmových prasat. *Vet. Med. – Czech*, 41, 261–266.
 RASZYK, J. – ULRICH, R. – GAJDŮŠKOVÁ, V. – NÁPRAVNÍK, A. – SALAVA, J. – PALÁC, J. (1997): Zhodnocení výskytu rizikových polutantů ve výrobních krmných směsích. *Vet. Med. – Czech*, 42, 361–367.
 RASZYK, J. – ULRICH, R. – GAJDŮŠKOVÁ, V. – SALAVA, J. – PALÁC, J. (1998a): Výskyt karcinogenních polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) na farmách prasat a skotu. *Vet. Med. – Czech*, 43, 17–25.
 RASZYK, J. – GAJDŮŠKOVÁ, V. – JAROŠOVÁ, A. – SALAVA, J. – PALÁC, J. (1998b): Occurrence of phthalic acid esters (PAEs) in combined feedstuffs and adipose tissues of swine and cattle. *Vet. Med. – Czech*, 43, 93–95.
 RIVERORODRIGUEZ, L. – BORJAABURTO, V. H. – SANTOSBURGO, C. – WALISZEWSKI, S. – RIOS, C. – CRUZ, V. (1997): Exposure assessment for workers applying DDT to control malaria in Veracruz, Mexico. *Environ. Hlth Persp.*, 105, 98–101.
 SANG, S. – LOURIS, B. (1997): Mercury emission inventory in Ontario. *Environ. Monit. Assm.*, 47, 79–88.
 ŠIŠÁK, M. – FRÁNEK, M. – HRUŠKA, K. (1995): Application of radioimmunoassay in the screening of polychlorinated biphenyls in cow's milk. *Anal. Chim. Acta*, 311, 415–422.
 WILHELM, M. – IDEL, H. (1996): Hair analysis in environmental medicine. *Zbl. Hyg. Umwelt-med.*, 198, 485–501.
 ZAVA, D. T. – BLEN, M. – DUWE, G. (1997): Estrogenic activity of natural and synthetic estrogens in human breast cells in culture. *Environ. Hlth Persp.*, 105, (Suppl. 3), 637–645.

Received: 98–04–28

Accepted: 98–06–03

Kontaktní adresa:

MVDr. Josef R a s z y k, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika
 Tel. +420 5 41 32 12 41, fax +420 5 41 21 12 29, e-mail: kahr@vuvfel.anet.cz

EFFECTS OF TOLTRAZURIL AND MONENSIN IN KIDS NATURALLY INFECTED WITH COCCIDIOSIS

OVLIVNĚNÍ KOKCIDIÓZY KŮZLAT APLIKACÍ TOLTRAZURILU A MONENSINU

S. Šlosárková, K. Chroust, M. Skřivánek

University of Veterinary and Farmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: Efficacy of toltrazuril (Baycox[®]) administered on two subsequent days and of long-term intake of feed medicated with monensin on the course of clinical coccidiosis and shedding of *Eimeria* spp. oocysts was compared in kids of the White Short-Haired breed aged 28 to 35 days. The 52 kids under study, divided into experimental and control subgroups, were born in a goat herd in which clinical coccidiosis was diagnosed on several occasions and intensive shedding of *Eimeria* spp. oocysts was demonstrated repeatedly. Oral treatment with toltrazuril (Baycox 2.5% sol. Bayer) at a dose of 10 mg per 1 kg live weight, administered individually on two subsequent days, markedly and rapidly reduced the number of oocysts in faecal samples collected from naturally infected kids ($P < 0.01$). A significant decrease in the number of oocysts in faecal samples was observed for a period of 3 weeks. While the pretreatment count of oocysts per gram (OPG) was 161 500, it decreased to 6 500, 22 400 and 58 100 one, two and three weeks after the treatment, respectively. Massive shedding of oocysts (OPG = 170 200) was found five weeks after the treatment. The medication of combined concentrates for naturally infected kids with 15 ppm monensin reduced significantly but did not stop the shedding of oocysts. OPG decreased from the pretreatment value of 50 500 to a half after 6 days. A highly significant ($P < 0.01$) decrease in OPG was observed from 30th day of administration of the medicated feed up to the end of this 70-day period, when OPG varied between 1 000 and 3 000. Oocysts of *E. arloingi*, *E. ninakohlyakimovae* and *E. christenseni*, respectively, accounted for 40.1%, 34.7% and 9.6% of all oocysts shed by individual kids of the group receiving the medicated feed.

coccidiosis; goat; toltrazuril; monensin; *Eimeria* spp.

ABSTRAKT: U kůzlat byla ověřována účinnost dvoudenní aplikace toltrazurilu (Baycox[®]) a dlouhodobého podávání monensinu na průběh klinické kokcidiózy a na vylučování počtu oocyst rodu *Eimeria*. Sledování bylo prováděno ve dvou pokusech, do kterých bylo zařazeno celkem 52 kůzlat (vždy rovnoměrně rozdělených do kontrolní a pokusné skupiny) plemene bílá krátkosrstá koza ve věku 28 až 35 dní. Mláďata pocházela ze stádového chovu koz, kde byla opakovaně prokázána klinická kokcidióza a koprologicky potvrzeno vylučování vysokého počtu oocyst kokcií rodu *Eimeria*. Individuální aplikace toltrazurilu (Baycox 2,5% sol. Bayer) v dávce 10 mg/kg ž. h. per os po dva dny vedla u přirozeně infikovaných kůzlat rychle k výrazné redukci počtu vylučovaných oocyst trusem ($P < 0,01$). Signifikantní pokles oocyst v trusu byl zaznamenán po dobu tří týdnů. Hodnota OPG (počet oocyst v 1 g trusu) před léčbou činila 161 500. Jeden, dva, resp. tři týdny po aplikaci bylo zaznamenáno 6 500, 22 400, resp. 58 100 oocyst v 1 g trusu. Pět týdnů po aplikaci toltrazurilu bylo v trusu kůzlat opět zaznamenáno masivní vylučování oocyst, hodnota OPG činila 170 200. Medikací jádrné krmné směsi monensinem v koncentraci 15 ppm bylo u přirozeně infikovaných kůzlat dosaženo významného omezení, nikoli však úplného zastavení vylučování oocyst kokcií trusem. Pokles počtu oocyst v trusu byl pozvolný, po šesti dnech podávání monensinu bylo zaznamenáno snížení hodnoty OPG (50 500) na polovinu. Vysoce významné redukce ($P < 0,01$) bylo dosaženo od 30. dne medikace až do jejího ukončení (70 dní), kdy byl kůzlaty vylučován pouze minimální počet oocyst; hodnoty OPG se pohybovaly od 1 000 do 3 000. Při sledování druhového zastoupení oocyst rodu *Eimeria* v trusu jednotlivých kůzlat medikovaných monensinem tvořily *E. arloingi* 40,1 %, *E. ninakohlyakimovae* 34,7 % a *E. christenseni* 9,6 % všech oocyst vylučovaných trusem.

kokcidióza; koza; toltrazuril; monensin; *Eimeria* spp.

ÚVOD

Kokcidióza patří mezi nejčastěji zjišťované příčiny průjmů odstavených a rostoucích kůzlat ve věku od tří týdnů až do pěti měsíců a bývá jedním z hlavních faktorů vyvolávajících ztráty mláďat v intenzivních typech chovů (Yvone aj., 1985; Foreyt, 1990; Smith

a Sherman, 1994). Onemocnění je většinou vyvoláváno současnou infekcí několika druhů kokcií rodu *Eimeria*, z nichž za nejpatogennější jsou považovány *E. arloingi*, *E. ninakohlyakimovae* (Norton, 1986; Yvone a Esnault, 1987) a dále i *E. christenseni* (Koudela a Boková, 1996; Chroust aj., 1997). Průběh kokcidiózy je u kůzlat často spojen

s projevy apatie, nechutenství, rychle se u nich dostavuje bolestivost dutiny břišní a vodnaté průjmy, někdy s příměsí hlenu či krve. Důsledkem je rozvoj metabolické acidózy, dehydratace organismu a následně dochází i k úhynům postižených mláďat (Foreyt, 1987; Smith a Sherman, 1994).

K léčbě kokcidiozy jsou již dlouhodobě užívány sulfonamidy, které se vyznačují rychlým ovlivněním endogenního vývoje kokciidií v trávicím traktu a schopností tlumit zároveň sekundární bakteriální infekci. Je však nutno aplikovat je opakovaně a jejich léčebný efekt je relativně krátkodobý (Smith a Sherman, 1994; Pavlásek a Mátlová, 1996). K prevenci klinického onemocnění se pak u přežvýkavců doporučuje medikace jadrných krmných směsí antikokcidiky, zejména se užívají amprolium, decoquinate, clopidol, monensin a salinomycin (Foreyt, 1987; Oetjen, 1993). Použití monensinu bylo ověřováno u jehňat, kde jeho dlouhodobé podávání vedlo k výraznému poklesu počtu, případně k úplnému vymizení vylučovaných oocyst trusem (Fitzgerald a Mansfield, 1978; Horton a Stockdale, 1979; Dražan aj., 1983). O použití monensinu u kůzlat informace v dostupné literatuře chybí.

Toltrazuril (Baycox®) vyvinutý k léčbě kokcidiozy u drůbeže je velmi účinný i u králíků, prasat a s úspěchem byl použit i v léčbě kokcidiozy jehňat (Haberhorn a Mundt, 1988; Taylor a Kenny, 1988; Gjerde a Helle, 1991). Použitím toltrazurilu u kůzlat v jednorázové dávce 20 mg/kg ž. h. dosáhl McKenna (1988) redukce počtu vylučovaných oocyst trusem přetrvávající dva až tři týdny po aplikaci. Chartier aj. (1992) dosáhl tohoto účinku u kůzlat až po aplikaci 40 mg toltrazurilu na 1 kg živé hmotnosti.

Cílem naší práce bylo ověření účinnosti toltrazurilu v dávce 10 mg/kg ž. h. po dva dny a dlouhodobého podávání monensinu v koncentraci 15 ppm na průběh klinické kokcidiozy a na vylučování počtu oocyst trusem u přirozeně infikovaných kůzlat.

MATERIÁL A METODY

Zvířata

Do dvou pokusů bylo zařazeno celkem 52 kůzlat, která pocházela ze stádového chovu koz (300 zvířat základního stáda), plemene bílá krátkosrstá koza. Kůzlata byla odchována ve stájích, do věku tří až čtyř týdnů s matkami, poté byla odstavena a samostatně skupinově ustájena v kotcích na hluboké podestýlce. Tyto kotce nebyly v průběhu období porodů čištěny ani dezinfikovány a nové skupiny odstavených kůzlat byly často přičleňovány k slabším kusům z předchozí skupiny. V chovu byla opakovaně prokázána klinická kokcidioza a koprologicky potvrzeno vylučování vysokého počtu oocyst kokciidií rodu *Eimeria*. Krmná dávka kůzlat odstavených od matek se skládala ze směsného koziho mléka nebo mléčné krmné směsi, jadrné krmné směsi,

seny a vody. Pokus I byl realizován přímo v chovu, ze kterého kůzlata pocházela, pokus II se uskutečnil ve stájích Kliniky chorob přežvýkavců VFU Brno.

Pokus I

V tomto experimentu byl studován vliv aplikace toltrazurilu na průběh kokcidiozy u kůzlat. Do pokusu bylo zařazeno 30 kůzlat ve dvou skupinách po 15 zvířatech. Skupina 1 byla kontrolní, skupina 2 byla léčená. V den zahájení pokusu (den 0) byl průměrný věk kůzlat 1. skupiny 35 dní, 2. skupiny 28 dní.

Toltrazuril (Baycox 2,5% sol. Bayer) byl aplikován individuálně v podobě 1,25% vodného roztoku *per os*. Dávka 10 mg/kg ž. h. byla kůzlátům podána dvakrát, 8. a 9. den pokusu. Pokus trval šest týdnů.

U kůzlat byl průběžně sledován zdravotní stav a v den 0, 8, 14, 21, 28 a 41 u nich byly prováděny odběry trusu ke koprologickému vyšetření.

Pokus II

V pokuse bylo ověřována účinnost monensinu v prevenci klinické kokcidiozy kůzlat. Do sledování bylo zařazeno 22 kůzlat samčího pohlaví, rozdělených do dvou skupin po 11 kůzlátích. Skupina 1 byla kontrolní, skupina 2 medikovaná. V době zahájení pokusu (den 0) byl průměrný věk kůzlat obou skupin 35 dnů.

Mláďatům medikované skupiny byla od 9. dne pokusu po několikadenním postupném navyku zaměněna původně předkládaná jadrná krmná směs za granulovanou jadrnou krmnou směs Biostan DS-kůzlata (Biosta Blučina, Česká republika), obohacenou o monensin (Monensin sodium Lonza 10% premix, Lonza Biotec, Kourim, Česká republika) v koncentraci 15 ppm. Tato jadrná směs pak byla předkládána zvířatům až do ukončení pokusu, který trval celkem 10 týdnů.

U zvířat obou skupin byl průběžně sledován jejich zdravotní stav, v pravidelných intervalech byla vážena a ve 2., 10., 15., 23., 30., 37., 44., 50., 62. a 70. dnu pokusu u nich byly odebírány vzorky trusu ke koprologickému vyšetření.

Koprologická vyšetření

Vzorky trusu byly odebírány individuálně z rektu zvířat. Koprologická vyšetření vzorků trusu byla prováděna kvalitativně flotační metodou s použitím Sheatherova, případně Brezova flotačního roztoku. Stanovení počtu oocyst v 1 g trusu (OPG) bylo prováděno kvantitativní metodou v modifikaci podle Chrousta (1970) s použitím ovoskopické počítací komůrky typu McMaster.

Statistické hodnocení

Pro statistické vyhodnocení byly použity neparametrické testy, a to Mann-Witneyův test pro nepárové hod-

noty a Kruskal-Wallisův test. Využito bylo statistického počítačového programu STAT-Plus (Matoušeková aj., 1992).

VÝSLEDKY

Pokus I

Klinické nálezy

V kontrolní skupině byl v den 0 pozorován u pěti kůzlat nahrbený postoj, apatie a průjem. Výživný stav všech kůzlat byl hodnocen jako dobrý. U nejvíce postiženého kůzlete činila hodnota OPG 438×10^3 . V průběhu sledování počet klinicky nemocných kůzlat kolísá, maxima dosáhl 21. až 28. den, kdy byl pozorován průjem, malátnost, zaostávání v růstu a velmi špatný výživný stav u osmi kůzlat. Nejvyšší zjištěná hodnota OPG byla $1\,296 \times 10^3$. Ve 41. dni pokusu byly projevy klinické kokcidie zaznamenány u tří kůzlat, u dalších 10 kůzlat byl zjištěn špatný výživný stav a zaostávání v růstu. Neuhynulo žádné kůzle.

V léčené skupině byl v den 0 a 8 zaznamenán průjem u tří, resp. osmi kůzlat, nejvyšší hodnota OPG byla 866×10^3 . Narušení celkového zdravotního stavu u kůzlat nebylo zjištěno ve 14. a 28. dni. Ve 41. dni pokusu byla všechna kůzla v dobrém výživném stavu, průměrem byla postižena dvě mláďata.

Koprologické nálezy

Průběh vylučování oocyst ukazuje tab. I. Rozdíly v intenzitě infekce mezi oběma skupinami před aplikací toltrazurilu (den 0 a 8) nebyly statisticky významné (Mann-Witneyův test). V den aplikace (8. den) byl v léčené skupině ve srovnání s 0. dnem zaznamenán signifikantní nárůst vylučování oocyst. Aplikace toltrazurilu v této skupině (8. a 9. den) vedla ke statisticky průkazné redukci počtu oocyst v trusu kůzlat po dobu dvou až tří týdnů (Kruskal-Wallisův test, $P < 0,01$). Ve 14. a 21. dnu dvě třetiny kůzlat léčené skupiny nevylučovaly žádné oocysty trusem, případně vylučovaly

minimální množství oocyst, zatímco kůzla kontrolní skupiny vylučovala oocysty ve velkém množství a průměrná hodnota OPG u nich činila až $166\,700$. Rozdíly v počtu vylučovaných oocyst mezi léčenou a kontrolní skupinou byly ve dnech 14, 21 a 28 vysoce významné (Mann-Witneyův test, $P < 0,01$). V 5. týdnu po aplikaci toltrazurilu byl zaznamenán u léčené skupiny silný nárůst počtu oocyst v trusu, který byl signifikantní ve srovnání se dnem 14 (Kruskal-Wallisův test, $P < 0,01$).

Pokus II

Klinické nálezy

V kontrolní skupině bylo v den zahájení pokusu u tří kůzlat zaznamenáno nechutenství, apatie a průjem. V průběhu dalšího sledování zde počet nemocných kůzlat narůstal a 23. den pokusu byly uvedené příznaky zjištěny u osmi kůzlat. Do 30. dne pokusu došlo k úhynu čtyř kůzlat. Po 30. dnu sledování byla zbylá kůzla této skupiny vzhledem k špatnému zdravotnímu a výživnému stavu nutně odporazena. Nejvyšší hodnoty OPG dosáhly 866 až $1\,496 \times 10^3$.

U medikované skupiny bylo v den zahájení pokusu u dvou kůzlat pozorováno nechutenství, mírná apatie, naježená srst a průjem, u dalších dvou kůzlat přetrvávaly do 5. dne pokusu mírná rhinitis a konjunktivit. V dalším sledování již u kůzlat nebylo pozorováno výrazné narušení zdravotního stavu, s výjimkou pěti kůzlat, u kterých byl v období 45. až 50. dne pokusu pozorován občasný suchý kašel. Zvířata s chutí přijímala předkládané krmivo, trus byl u většiny z nich formovaný. Dlouhodobým průměrem trpělo pouze jedno kůzle, u kterého však hodnoty OPG byly po celou dobu sledování nízké. Výživný stav kůzlat byl dobrý, s výjimkou kůzlete s dlouhodobým průjemem, u kterého byl hodnocen jako špatný. Toto kůzle jako jediné zaostávalo v růstu a dosáhlo i nejnižší živé hmotnosti v závěru sledování ($16,7$ kg).

Průměrná živá hmotnost kůzlat kontrolní skupiny vzrostla za 28 dnů sledování z $6,8$ na $11,0$ kg. Denní přírůstek hmotnosti u této skupiny tak činil $0,146$ kg. U medikované skupiny stoupla hmotnost za stejné období z $6,9$ na $13,0$ kg a průměrný denní přírůstek byl

I. Vliv individuální aplikace toltrazurilu v dávce 10 mg/kg ž. h. po dva dny na vylučování oocyst *Eimeria* spp. u přirozeně infikovaných kůzlat v pokusu I – The effect of individual application of toltrazuril at a dose 10 mg/kg live weight on two subsequent days on the shedding of *Eimeria* spp. oocysts in naturally infected kids in trial I

Skupina ¹	Počet kůzlat ⁴	Toltrazuril (den aplikace) ⁵	Průměrné hodnoty OPG $\times 10^3$ v den ⁶					
			0	8	14	21	28	41
Kontrolní ²	15	–	108,5	77,2	87,8 ^A	166,7 ^A	192,9 ^A	101,6
Léčená ³	15	8 a 9	96,3	161,5 ^B	6,5 ^C	22,4 ^C	58,1 ^C	170,2 ^D

A = signifikantní rozdíl mezi kontrolní a léčenou skupinou ($P < 0,01$) – significant difference between control and treated group ($P < 0,01$)

B = signifikantní rozdíl ke dni 0 v léčené skupině ($P < 0,01$) – significant difference on day 0 in treated group ($P < 0,01$)

C = signifikantní rozdíl ke dni 8 v léčené skupině ($P < 0,01$) – significant difference on day 8 in treated group ($P < 0,01$)

D = signifikantní rozdíl ke dni 14 v léčené skupině ($P < 0,01$) – significant difference on day 14 in treated group ($P < 0,01$)

¹group, ²control, ³treated, ⁴kid number, ⁵(day of application), ⁶average OPG $\times 10^3$ values on day

0,219 kg. U kontrolní skupiny bylo zaznamenáno významné zaostávání v růstu (t -test, $P < 0,05$). Medikovaná skupina dosáhla na konci pokusu průměrné živé hmotnosti 21,8 kg a denní přírůstek hmotnosti u této skupiny za 68 dní sledování činil 0,219 kg.

Koprologické nálezy

Počet vylučovaných oocyst kokcií v 1 g trusu kůzlat před a v průběhu medikace monensinem v pokuse II uvádí tab. II. U pokusné skupiny byl ve srovnání s kontrolní skupinou zaznamenán od 15. dne sledování statisticky významný rozdíl v hodnotách OPG (Mann-Witneyův test, $P < 0,01$). V rámci medikované skupiny kůzlat byla u postupně klesajících počtů vylučovaných oocyst zjištěna od 30., resp. 37. dne sledování statistická významnost ve srovnání se dny 6 a 10, resp. se dnem 15 (Kruskal-Wallisův test, $P < 0,01$).

Jak vyplývá z tab. III, nejpočetnější zastoupení v trusu jednotlivých kůzlat medikované skupiny po celou dobu sledování vykazovaly *E. arloingi* a *E. ninakohlyakimovae*. Třetím nejčastějším druhem byla *E. christenseni*.

DISKUSE

V našich pokusech vedlo podání toltrazurilu kůzlům dávce 10 mg/kg ž. h. po dva dny k rychlé a výrazné redukci počtu oocyst vylučovaných trusem. Výsledky ukazují, že aplikace toltrazurilu v uvedené dávce je vysoce efektivní a brání rozvoji klinické kokcidiózy a s ní související mortality u přirozeně infikovaných kůzlat. Velmi nízké počty OPG u léčených kůzlat byly zjišťovány po dobu 14 až 21 dní ve srovnání s počtem

oocyst v trusu kontrolní skupiny. Naše výsledky se shodují s nálezy, které popsali u koz McKenna (1988) a u jehňat Taylor a Kenny (1988), kteří jednorázovou aplikací toltrazurilu v dávce 20 mg/kg ž. h. dosáhli shodně redukce počtu vylučovaných oocyst po dobu dvou až tří týdnů. Naproti tomu se liší od údajů, které publikovali Chartier aj. (1992). Tito autoři dosáhli po jednorázovém podání stejné dávky toltrazurilu kůzlům redukcí OPG pouze na sedm dní. Kolísání počtu oocyst vylučovaných trusem u kontrolní skupiny odpovídá nálezům u přirozených infekcí.

V pokuse II ověřovaná dlouhodobá aplikace monensinu vedla k postupnému významnému omezení, nikoli však k úplnému zastavení, vylučování oocyst kokcií trusem kůzlat. Umožnila tak, spolu s nutriční úrovní jaderné krmné směsi, dosáhnout u pokusných kůzlat ve srovnání s kontrolní skupinou velmi dobrých průměrných denních přírůstků hmotnosti. Podávání monensinu tedy příznivě ovlivnilo vývoj zdravotního stavu kůzlat. Podobně jako v našem pokusu u kůzlat zaznamenali u přirozeně infikovaných jehňat Horton a Stockdale (1979) po 15denním podávání monensinu v dávce 11 ppm 50% pokles vylučovaných oocyst a od 36. dne pokusu byly oocysty vylučovány v minimálních množstvích. Úplné vymizení oocyst v trusu popsali u jehňat medikovaných monensinem v dávce 10 až 20 ppm po 14denní aplikaci Fitzgerald a Mansfield (1978) a Dražan aj. (1983). Uvedení autoři zaznamenali také vyšší průměrné denní přírůstky hmotnosti u medikované skupiny, a to až 0,23 kg. Koncentrace 15 ppm monensinu v jaderné krmné směsi použitá v našem pokuse II odpovídá doporučeným dávkám monensinu, které uvádí Prosl a Baumgartner (1986) ve výši 10 až 20 ppm a Foreyt (1990) ve výši 10 až 30 ppm v předkládané jaderné směsi.

II. Vliv medikace monensinem na vylučování oocyst *Eimeria* spp. u přirozeně infikovaných kůzlat v pokusu II – The effect of monensin medication on the shedding of *Eimeria* spp. oocysts in naturally infected kids in trial II

Skupina ¹	Počet kůzlat ⁴	Průměrné hodnoty OPG x 10 ³ v den ⁵									
		6	10	15	23	30	37	44	50	64	70
Kontrolní ²	11	65,7	77,6	87,8 ^A	156,7 ^A	231,2 ^A	–	–	–	–	–
Medikovaná ³	11	50,5	42,8	21,2	7,4	5,2 ^{BC}	3,0 ^{BCD}	2,4 ^{BCD}	1,6 ^{BCD}	1,0 ^{BCD}	1,4 ^{BCD}

↓ = zahájení medikace skupiny 2 monensinem – beginning of monensin medication in group 2

A = signifikantní rozdíl mezi kontrolní a léčenou skupinou ($P < 0,01$) – significant difference between control and treated group ($P < 0,01$)

B = signifikantní rozdíl ke dni 6 v medikované skupině ($P < 0,01$) – significant difference on day 6 in medicated group ($P < 0,01$)

C = signifikantní rozdíl ke dni 10 v medikované skupině ($P < 0,01$) – significant difference on day 10 in medicated group ($P < 0,01$)

D = signifikantní rozdíl ke dni 15 v medikované skupině ($P < 0,01$) – significant difference on day 15 in medicated group ($P < 0,01$)

¹ group, ² control, ³ medicated, ⁴ kid number, ⁵ average OPG x 10³ values on day

III. Zastoupení druhů kokcií *Eimeria* spp. u jednotlivých kůzlat medikované skupiny ($\bar{x} \pm sd$) – Representation of the species of *Eimeria* spp. coccidia in the kids of medicated group

Zastoupení druhů kokcií rodu <i>Eimeria</i> (%) ¹							
<i>E. arloingi</i>	<i>E. ninakohlyakimovae</i>	<i>E. christenseni</i>	<i>E. hirci</i>	<i>E. caprina</i>	<i>E. alijevi</i>	<i>E. jolchijevi</i>	<i>E. apsheromica</i>
40,1 ± 4,3	34,7 ± 5,1	9,6 ± 2,0	6,5 ± 2,3	3,2 ± 1,0	4,2 ± 1,1	0,7 ± 0,6	0,9 ± 0,7

¹ representation of the coccidium species of the genus *Eimeria* spp.

Vzhledem k prokázanému razantnímu a rychlému účinku toltrazurilu předpokládáme, že bude s úspěchem využíván v léčbě rozvíjejících se klinických forem infekce. Výhodou se potom jeví i individuální způsob perorální aplikace tohoto antikokcidika, zvláště pokud se u zvířat dostavuje v rámci klinického obrazu onemocnění inapetence. Jednorázová léčba toltrazurilem vede k rychlému, ale poměrně krátkodobému ovlivnění průběhu infekce. Pro jednorázovou aplikaci takového přípravku je nutné důkladné posouzení průběhu nemoci a správné určení vhodné doby k léčbě. Terapie ve velmi raných fázích onemocnění může vést k eliminaci kokciidií dříve, než je dostatečně stimulován imunitní systém hostitele a reinfekce pak může vyvolat těžký průběh klinického onemocnění (Taylor a Kenny, 1988).

Ovlivnění průběhu kokcidiózy kůzlat podáváním monensinu bylo v našem sledování pozvolné a vedlo postupně až k téměř úplnému potlačení vylučování oocyst a k zábraně reinfekce, což je v souladu s údaji, které uvádějí Fitzgerald a Mansfield (1978), McDougald a Dunn (1978), Horton a Stockdale (1979) a Dražan aj. (1983). Pozitivního efektu bylo dosaženo zřejmě především díky tomu, že medikace byla zahájena před rozvojem výrazných klinických příznaků onemocnění. U rozvinuté klinické kokcidiózy lze podáváním monensinu dosáhnout redukce počtu vylučovaných oocyst, ale není možno zabránit rozvoji průměrné a ztrátám hmotnosti (Leek aj., 1976).

Relativně krátkodobé ovlivnění průběhu kokcidiózy aplikací toltrazurilu a jeho poměrně dlouhé ochranné lhůty, uváděné pro drůbež, by mohly představovat určité nevýhody pro chovatele. Domníváme se však, že i přes uvedená omezení lze při správném načasování léčby toltrazurilem, doplněné současným zavedením cílených preventivních opatření, výrazně snížit kontaminaci prostředí oocystami a přivést tak ovlivnit průběh kokcidiózy ve stádu. Použití 2,5% preparátu Baycox doporučují také Haberkorn a Mundt (1988), kteří u domácích zvířat i zvířat v zoologických zahradách prokázali účinnost toltrazurilu na široké spektrum kokciidií.

Předpokládáme, že použití antikokcidik, které navodí dlouhodobé potlačení infekce a které mají krátkou ochrannou lhůtu, související s užíváním velmi nízkých koncentrací, je pro chovatele z hlediska realizace masného zhodnocení kůzlat i udržení optimálního zdravotního stavu stáda vhodnější. Určitým nebezpečím užívání ionoforních antikokcidik je však vznik možné intoxikace, případně retardace přírůstků, pokud není dodrženo jejich přesné dávkování a jejich důkladné zamíchání v jadrné krmné směsi (Laue aj., 1989).

Poděkování

Autoři práce děkují pí Zdeňce Procházkové a pí Marii Vaňátkové za technickou spolupráci při realizaci studie.

LITERATURA

- DRAŽAN, J. – JAMBOR, V. – CHROUST, K. (1983): Výkrm jehňat při použití granulovaných krmných směsí s přídatkem rumensinu. *Veterinářství*, 33, 440–442.
- FITZGERALD, P. R. – MANSFIELD, M. E. (1978): Ovine coccidiosis: Effect of the antibiotic monensin against *Eimeria ninakohlyakimovae* and other naturally occurring coccidia of sheep. *Am. J. Vet. Res.*, 39, 7–10.
- FOREYT, W. J. (1987): Coccidiosis in sheep and goats. *Vet. Hum. Toxicol.*, 29, 60–64.
- FOREYT, W. J. (1990): Coccidiosis and cryptosporidiosis in sheep and goats. *Vet. Clin. N. Am.: Food Anim. Pract.*, 6, 655–670.
- GJERDE, B. – HELLE, O. (1991): Chemoprophylaxis of coccidiosis in lamb with a single oral dose of toltrazuril. *Vet. Parasitol.*, 38, 97–107.
- HABERKORN, A. – MUNDT, H. C. (1988): Untersuchungen an einem vielseitig einsetzbaren Kokzidiotherapeutikum. *Prakt. Tierarzt*, 4, 46–51.
- HORTON, G. M. J. – STOCKDALE, P. H. G. (1979): Effects of amprolium and monensin on oocyst discharge, feed utilisation, and ruminal metabolism of lambs with coccidiosis. *Am. J. Vet. Res.*, 40, 966–970.
- CHARTIER, C. – PELLET, M. P. – PORS, I. (1992): Effects of toltrazuril on oocyst discharge and growth in kids with naturally-acquired coccidial infections. *Small Ruminant Res.*, 8, 171–177.
- CHROUST, K. (1970): Kvantitativní metoda pro stanovení počtu vajíček gastrointestinálních helmintů a oocyst kokciidií v trusu přežvýkavců a koní. *Laboratorní metodiky ÚSVÚ Praha*, s. 12–14.
- CHROUST, K. – LUKEŠOVÁ, D. – MODRÝ, D. – SVOBODOVÁ, V. (1997): Veterinární protozoologie. Brno, Veterinární a farmaceutická univerzita. 113 s.
- KOUDELA, B. – BOKOVÁ, A. (1996): Kokcidie koz chovaných v České republice. In: Sbor. Abstr. České a slovenské parazitologické dny. Měfín, 1996, s. 20.
- LAUE, W. von – RESEEL, L. – ROSSOW, N. – BAUMANN, G. (1989): Schadensgeschehen bei Mastlämmern nach Einsatz monensinhaltigen Mischfutters. *Mh. Vet.-Med.*, 44, 459–460.
- LEEK, R. G. – FAYER, R. – McLOUGHLIN, D. K. (1976): Effect of monensin on experimental infections of *Eimeria ninakohlyakimovae* in lambs. *Am. J. Vet. Res.*, 37, 339–341.
- MATOUŠKOVÁ, O. – CHALUPA, J. – CIGLER, M. – HRUŠKA, K. (1992): STAT-Plus – uživatelská příručka, verze 1.01. Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství. 168 s.
- McDOUGALD, L. R. – DUNN, W. J. (1978): Efficacy of monensin against coccidiosis in lamb. *Am. J. Vet. Res.*, 39, 1459–1462.
- McKENNA, P. B. (1988): The efficacy of toltrazuril against naturally-acquired coccidial infections in goats. *Vet. Med. Rev.*, 59, 157–161.
- NORTON, C. C. (1986): Coccidia of the domestic goat *Capra hircus*, with notes on *Eimeria ovinoidalis* and *E. bakuensis* (syn. *E. ovina*) from the sheep *Ovis aries*. *Parasitology*, 10, 279–289.

- OETJEN, B. D. (1993): Management of coccidiosis in dairy calves and replacement heifers. *Comp. Cont. Educ. Vet. Med.: Food Anim. Pract.*, 15, 891–898.
- PAVLÁSEK, I. – MÁTLOVÁ, V. (1996): Kokciidióza u kůzlat. *Náš chov*, č. 5, 30–31.
- PROSL, H. – BAUMGARTNER, N. (1986): Erkrankungen bei Schaf und Ziege – 3. Endoparasitosen. *Wien. Tierärztl. Mschr.*, 73, 415–421.
- SMITH, M. C. – SHERMAN, D. M. (1994): *Goat Medicine*. Philadelphia, Lea a Febiger. 620 pp.
- TAYLOR, S. M. – KENNY, J. (1988): Coccidiocidal efficacy of a single treatment of toltrazuril in naturally infected lambs. *Vet. Rec.*, 123, 573.
- YVORE, P. – ESNAULT, A. (1987): Interpreting fecal examinations for ovine and caprine coccidial infection. *Vet. Med.*, 82, 740–743.
- YVORE, P. – ESNAULT, A. – NACIRI, M. (1985): Coccidiosis in goats: effect of mono- and multispecific infections. *Rec. Méd. Vét.*, 161, 347–351.

Received: 98–03–12

Accepted: 98–05–11

Kontaktní adresa:

MVDr. Soňa Šlosárková, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1–3, 612 42 Brno, Česká republika
Tel. +420 5 41 56 24 11, fax +420 5 74 88 41, e-mail: sonaslo@post.cz

ORAL VACCINATION OF FOX CUBS AGAINST RABIES IN THE VICINITY OF DENS

ORÁLNÍ VAKCINACE LIŠČAT PROTI VZTEKLINĚ U NOR

O. Matouch¹, J. Jaroš¹, V. Vrzal²

¹State Veterinary Institute, Liberec, Czech Republic

²Bioveta, a. s., Ivanovice na Hané, Czech Republic

ABSTRACT: The additional oral antirabies vaccination of fox cubs was tested in two districts by placing the vaccine baits near to dens. The Lysvulpen (SAD-Bern) oral vaccine produced by Bioveta Ivanovice company was used in the field trial. 7 150 vaccine doses were distributed to 794 fox dens in the territory of 1962 km². The vaccine campaign was performed during the last week of May 1997. 8–10 baits were placed to each den by voluntary hunters. Checking of the bait uptake was carried out by the hunters on the second, fifth and eighth days after the distribution. The laboratory checking which began four weeks after the distribution of the baits was focused on tetracycline marking and rabies antibody presence in body liquids. Juvenile foxes from both treated and non-treated areas were examined. In both areas the spring oral vaccination campaign was held in a traditional way. The Lysvulpen vaccine has shown a good attractivity for the fox cubs. The major part of the vaccine baits was eaten up during the first five days (78%) and the total uptake made 89.5%. 7–12% of the baits was eaten by non-target animals. In the experimentally treated area, the TTC marker was present in 46.3% cubs and antibodies in 30.2 % of body liquids. The examination of brains for the presence of rabies virus was negative in all cases. There was no case of vaccine virus infection of the fox cubs. 99 cubs from the nontreated control area were examined. Tetracycline was found in 9% and the antibodies in 7.8% of cases. The results obtained proved that the oral vaccination of fox cubs – being performed in the neighbourhood of dens – is a useful additional rabies control method. It enables to immunise the juvenile foxes – it means the part of the fox population which is not affected during the traditional spring vaccination campaign.

fox; rabies; oral immunization; biomarker; seroconversion; efficiency

ABSTRAKT: Na území dvou okresů byla ověřena doplňková orální vakcinace liščat proti vzteklině v okolí nor s použitím orální vakcíny Lysvulpen (SAD-Bern) vyrobené v Biovetě a. s., Ivanovice na Hané. Na území 1 962 km² bylo k 794 norám umístěno po 8 až 10 dávkách celkem 7 150 vakcinačních návnad. Kontrola příjmu vakcíny byla provedena druhý, pátý a osmý den po vyložení. Laboratorní kontrola byla zaměřena na průkaz přítomnosti tetracyklinu a antirabických protilátek u liščat. Byly vyšetřeny mladé lišky z experimentální i kontrolní oblasti. Vakcína Lysvulpen vykazovala dobrou atraktivitu pro liščata. Většina vakcinačních návnad byla konzumována během prvních pěti dnů (78 %) a celkový příjem činil 89,5 %. Tetracyklinový marker byl nalezen u 46,3 % liščat a protilátky u 30,2 % vyšetřených tělních tekutin. U 99 liščat z kontrolní oblasti byl tetracyklin zjištěn v 9 % a sérokonverze v 7,8 % případů. Získané výsledky ukazují, že orální vakcinace liščat u nor je vhodnou doplňkovou metodou v boji proti vzteklině.

liška obecná; vzteklin; orální imunizace; biomarker; sérokonverze; účinnost

ÚVOD

Významným prostředkem boje proti vzteklině ve volné přírodě je orální vakcinace lišek. V České republice se tato metoda uplatňuje od roku 1989. V průběhu let byl registrován trvalý pokles počtu pozitivních případů vztekliny až do roku 1995, kdy bylo dosaženo 88% redukce v porovnání s počátečním stavem (Matouch a Jaroš, 1996). Tento příznivý vývoj byl přerušen v roce 1996, kdy byl zaznamenán opět mírný nárůst incidence. Nákaza se znovu objevila v některých oblastech navzdory pokračujícím kampaním orální vakcinace. Ukázalo se, že tradiční model používané vaki-

nační strategie v intervalech jaro – podzim nezaručuje při počtu dávek 15 až 18 na 1 km² trvalou eradikaci vztekliny.

Obdobné zkušenosti byly získány i v zahraničí a jsou vysvětlovány výrazným nárůstem stavů lišek po úspěšném utlumení nákazy (Müller aj., 1995; Schenzle, 1995).

Tyto poznatky vedly k různým modifikacím metodiky orální vakcinace lišek. Jednoznačně je preferována letecká distribuce vakcíny se zvýšeným počtem dávek a doporučovány další doplňkové vakcinační kampaně v průběhu roku (Schlüter a Müller, 1995; Müller, 1997) s cílem dosáhnout co nejvyššího stupně imunity v celé liščí populaci.

Ve snaze řešit tuto situaci, byla některými autory zkoušena také orální vakcinace lišcat v okolí nor s různými typy orálních vakcín (Breitenmoser aj., 1995; Guillaume aj., 1997). Dosažené výsledky byly nadějně, a proto bylo i u nás přikročeno ve vybraných oblastech s nepříznivou nálezovou situací k ožkoušení doplňkové vakcinace lišcat v okolí nor.

Cílem předkládané terénní studie bylo ověřit možnost použití tuzemské orální vakcíny Lysvulpen (Bioveta a. s., Ivanovice na Hané) pro tento účel a získat poznatky z organizování akce ve spolupráci s myslivci.

MATERIÁL A METODA

Vakcinační kampaň

Experimentální vakcinace byla provedena na území dvou okresů (Česká Lípa a Děčín) na rozloze 1 962 km². Vakcinovanou oblast lze charakterizovat jako pahorkatinu s nadmořskou výškou 250 až 500 m n. m. s rozsáhlejším zalesněním prolutými lučními plochami, pastvinami i ladem ležící půdou. Čtyři týdny před zahájením akce proběhla instruktáž myslivců a dva týdny před kladením návnad sčítání liščích nor v jednotlivých revírech. Celkem bylo registrováno 794 obsazených nor. Vakcinační kampaň proběhla 23., 24. a 31. května a bylo použito 7 150 vakcinačních dávek. Předchozí plošná manuální vakcinace celého území byla provedena 26. až 27. dubna.

Použitá vakcína

Byla použita tuzemská antirabická orální vakcína Lysvulpen komerčně vyrobená v Biovetě a. s., Ivanovice na Hané, s použitím atenuovaného vakcinačního viru SAD-Bern. Tekutá očkovací látka v množství 1,8 ml je obsažena v plastické kapsli obalené návodovou hmotou. Každá vakcinační návnada obsahuje 150 mg tetracyklinu. Po příjmu vakcíny lze tento biomarker prokázat mikroskopicky v ultrafialovém světle v kostní tkáni, kde je dlouhodobě deponován.

Distribuce vakcíny

Vykládání vakcinačních návnad k norám bylo prováděno myslivci dobrovolně a vycházelo z metodiky používané při vakcinaci dospělých lišek. Ke každé noře bylo umístěno 8 až 10 dávek vakcíny. Návnady byly kladeny v bezprostředním okolí nory, ne však přímo do jejího ústí. Byly rozmístěny rozptýleně dle konfigurace terénu v místech nejčastějšího předpokládaného pohybu lišcat ve vzdálenosti 1 až 15 m od nory. Před účinkem slunečních paprsků a dravými ptáky byly návnady zakryty listy, trávou atp. Při kladení bylo dbáno na minimalizaci zanechaných lidských stop a pachů, které by mohly lišcata odradit.

Kontrola

Kontrolu příjmu návnad u 120 nor provedli myslivci druhý, pátý a osmý den po jejich nakladení. Při tom byly registrovány zbytky vakcín, způsob konzumace, různé stopy a změny v okolí nory svědčící například o požití návnady jinými druhy zvířat. Zbytky nalezených vakcinačních kapslí byly sebrány.

Laboratorní vyšetření

Čtyři týdny po aplikaci vakcíny do terénu se započalo s odevzdáváním ulovených lišcat veterinární službě. Každé lišče bylo označeno štítkem obsahujícím jméno lovce, místo, datum ulovení a údaje o chování před ulovením. Sběr lišcat probíhal po dobu čtyř měsíců, do konce září. Odevzdaná lišcata byla nejprve podrobena vyšetření mozku na přítomnost viru vztekliny standardními metodami, imunofluorescenčním testem a izolačním pokusem (Dean aj., 1996; Koprowski, 1996). U všech kadáverů byla odebrána dolní čelist na přípravu kostního výbrusu pro průkaz tetracyklinu. K sérologické analýze byla použita tělní tekutina odebraná z dutiny hrudní, případně břišní. Přítomnost specifických antirabických virus-neutralizačních protilátok byla prokazována RFFIT – rychlým fluorescenčním fokus inhibičním testem (Smith aj., 1996). Titry byly vyjadřovány v mezinárodních jednotkách IU/ml. Za pozitivní byl považován titr 0,5 IU a vyšší.

Kontrolní vzorky

Jako kontrolní vzorky byla použita lišcata z okresů, kde se vakcinace u nor neprováděla. Tato kontrolní oblast s obdobnými přírodními podmínkami i nadmořskou výškou byla vzdálena více než 60 km od pokusné oblasti. Orální vakcinace zde probíhala pouze tradičním způsobem v rámci jarní a podzimní kampaně.

VÝSLEDKY

Příjem návnad

Většina vakcinačních návnad byla přijata do pátého dne po vyložení. Během prvních 48 hodin bylo konzumováno v průměru 28,8 % návnad, do pátého dne pak 70,8 % návnad a osmý den tento počet stoupl na 89,5 %.

Nalezené stopy, případně zbytky kapslí nasvědčovaly, že menší množství (asi 7 až 12 %) návnad bylo konzumováno hlodavci, ptáky, případně i divokými prasaty. Některá přímá pozorování uváděla požití návnad jak liščaty, tak i dospělou liškou. Zbytky kapslí byly většinou shromážděny blízko vsuku do nory a jemná perforace svědčila o požití liščaty. Nálezy obnažených nedotčených kapslí bez návnadové hmoty byly zcela ojedinělé.

Laboratorní vyšetření

Vyšetření na vzteklinu

Z vakcinované oblasti bylo vyšetřeno celkem 69 lišek. Vyšetření mozku na vzteklinu bylo ve všech případech negativní. Uliční ani vakcinační virus nebyl izolován.

Průkaz TTC

Biomarker (TTC) byl prokázán z celkového počtu 69 vyšetřených ve 32 případech (46,3 %), zatímco z kontrolní oblasti bylo pozitivních pouze 9 vzorků z 99 vyšetřených (9 %). Výsledky průkazu tetracyklinu uvádí tab. I.

Sérokonverze

K vyšetření na protilátky bylo vhodných celkem 43 vzorků tělních tekutin. Ve 13 z nich (30,2 %) byl titr antirabických protilátek vyšší než 0,5 IU. Z kontrolní skupiny 51 vzorků byly protilátky nalezeny u čtyř lišek (7,8 %). Výsledky průkazu antirabických protilátek uvádí tab. II.

DISKUSE

Orální vakcinace lišek proti vzteklině představuje nepochybně účinný nástroj tlumení vztekliny ve volné přírodě. Jarní a podzimní aplikace vakcinačních kampaň přinesla obzvláště v prvních letech po jejím zavedení pozitivní výsledky v řadě evropských zemí (Steck aj., 1982; Schneider a Cox, 1983; Kissling a Gram, 1992; Brochier aj., 1988; Ďurové aj., 1996). Později se však projeví některé nedostatky. Nevýhoda dvou vakcinací v průběhu roku spočívá v tom, že jarní kampaň, prováděná obvykle na konci zimy, nepostihuje velmi významnou část populace – liščata. Tito nechránění jedinci s vysokou migrač-

ní aktivitou v letním a podzimním období hrají významnou úlohu při šíření a udržování nákazy (Breitenmoser aj., 1995). Odtud pramení snahy imunizovat i tuto kategorii liščí populace.

Konečný efekt orální vakcinace lišek u nás je do značné míry závislý na dobré spolupráci s myslivci. Instruktáže myslivců proběhly v obou okresech za vysoké účasti a aktivního přístupu zúčastněných. Akce znamenala oživení zájmu myslivců po předchozím stereotypu manuální plošné jarní a podzimní vakcinace lišek.

Připravená metodika i časový harmonogram při sčítání lišek, distribuci vakcinačních návnad a následné kontrole byly dodrženy. Nutno však dodat, že jsme předpokládali větší aktivitu při následném lovu a odezdávání lišek pro kontrolní vyšetření.

Použitá vakcína Lysvulpen se ukázala pro liščata jako dostatečně atraktivní. Celkový příjem návnad 89,5 % je plně srovnatelný s návnadami Raboral použitými k vakcinaci u nás ve Francii (Vuillaume aj., 1997). Dynamiku příjmu nelze porovnat, neboť tyto autoři provedli kontrolu jednorázově sedmý den. Menší počet kontrol má výhodu menšího rušení liščími rodin.

Vyšetření mozku ulovených mladých lišek neprokázalo v žádném případě infekci vakcinačním virem, stejně jako předchozí laboratorní experimenty s kmenem SAD-Bern u této kategorie zvířat (Vrzal aj., 1996).

Průkaz biomarkeru je nepřímým důkazem konzumace vakcíny a indikuje procento zasažené populace. Zjištěná přítomnost biomarkeru u 46,3 % i sérokonverze (30,2 %) jsou poněkud nižší, než uvádějí Vuillaume aj. (1997), kteří prokázali TTC u 77 % a protilátky u 40 % lišek. Důvodem může být nižší počet návnad kladených difúzně ve větším okruhu kolem nory. Zahraníční autoři kladli několik návnad vždy bezprostředně před vchod z nory. To sice usnadňuje nalezení návnad, ale zároveň umožňuje nežádoucí konzumaci více dávek jedním jedincem.

Také přítomnost biomarkeru v kontrolní oblasti byla ve Francii vyšší, když dosáhla 43 % oproti naší zjištěným 9 %.

I. Přehled vyšetření na přítomnost biomarkeru – Examination for biomarker presence

Oblast ¹	Počet vyšetřených ²	Počet pozitivních ³	Procento ⁴
Vakcinovaná ⁵	69	32	46,3
Kontrolní ⁶	99	9	9,0
Významnost rozdílu hodnot: ⁷ $P < 0,01$			

¹area, ²number of examined animals, ³number of positive cases, ⁴percentage, ⁵vaccination, ⁶control, ⁷significance of value difference

II. Průkaz protilátek v tělních tekutinách – Proof of antibodies in body liquids

Oblast ¹	Počet vyšetřených ²	Počet pozitivních ³	Procento ⁴
Vakcinovaná ⁵	43	13	30,2
Kontrolní ⁶	51	4	7,8
Významnost rozdílu hodnot: ⁷ nesignifikantní ⁸			

For 1–7 see Tab. I; ⁸non significant

Z toho lze usuzovat, že ve Francii, díky teplejšímu podnebí, již během obvyklé jarní kampaně jsou liščata schopna aktivně konzumovat vakcinační návnady jako potravu. V našich podnebních podmínkách toho nejsou většinou mladá liščata ještě schopna. Námi zjištěná séropozitivita u některých liščat z kontrolní oblasti může být spíše výsledkem konzumování návnad přinesených matkami. Časté nálezy zbytků plastických kapslí u ústí nor tomu nasvědčují.

Pro maximální efekt je podstatné načasování akce tak, aby mláďata byla ještě fixována na noru, ale již se přechodně pohybovala v jejím okolí. Čím jsou pak starší, tím je jejich imunitní odpověď kvalitnější. Z tohoto pohledu je třeba citlivě zvolit termín vyložení návnad. I v rámci jednoho okresu je třeba diferencovat podle místních podmínek.

Organizace celé akce proběhla hladce, ale vyžaduje zodpovědný přístup orgánů veterinární služby i myslivečských organizací.

Získané výsledky a zkušenosti ukazují, že orální vakcinace liščat u nor je vhodná doplňková metoda v boji proti vzteklině, použitelná především při nárůstu početných stavů lišek. Při malé finanční náročnosti lze tímto způsobem zvýšit podíl imunizovaných jedinců a snížit tak možnost dalšího šíření nákazy.

LITERATURA

BREITENMOSER, U. – KAPHEGYI, T. – KAPPELER, A. – ZANONI, R. (1995): Significance of young foxes for the persistence of rabies in northwestern Switzerland. In: SCHWYZER, M. et al.: Immunobiology of Viral Infections. Proc. 3rd Congress Europ. Soc. Vet. Virol., pp. 391–396.
BROCHIER, B. – THOMAS, I. – IOKEM, A. – GINTER, A. – KALPERS, J. – PAQUOT, A. – COSTY, F. – PASTORET, P. P. (1988): A field trial in Belgium to control fox rabies by oral immunisation. *Vet. Rec.*, 123, 618–621.
DEAN, D. J. – ABELSETH, M. K. – ATANASIU, P. (1996): The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F. X. et al.: Laboratory Techniques in Rabies. 4th ed. Geneva, WHO, pp. 88–95.
DUROVE, A. – ŠVRČEK, S. – SOKOL, J. – ŠULIOVÁ, J. – ONDREJKA, R. – BENÍŠEK, Z. – ZÁVADOVÁ, J. – JANUSOVÁ, K. – LOVÁS, B. – BORSUKOVÁ, O. – KUBINEC, J. (1996): Orale Immunisierung freilebender Rot-

füchse gegen Tollwut in der Slowakei im Jahre 1994. *Wien. Tierärztl. Mschr.*, 83, 158–163.

KISSLING, R. – GRAM, G. (1992): Orale Immunisierung von Füchsen gegen Tollwut in Österreich im Zeitraum von 1989 bis 1991. *Wien. Tierärztl. Mschr.*, 79, 333–344.

KOPROWSKI, H. (1996): The mouse inoculation test. In: MESLIN, F. X. et al.: Laboratory Techniques in Rabies. 4th ed. Geneva, WHO, pp. 80–87.

MATOUCH, O. – JAROŠ, J. (1996): Vztekliny v ČR a její tlumení orální vakcinací. *Veterinářství*, 46, 327–330.

MÜLLER, W. W. (1997): Where do we stand with oral vaccination of foxes against rabies in Europe? *Arch. Virol.*, 13, 83–94.

MÜLLER, T. – SCHLÜTER, H. – KAUTZSCH, S. (1995): Zur Wechselwirkung von oraler Tollwutimmunisierung und Fuchspopulationsdynamik. *Tierärztl. Umsch.*, 50, 743–747.

SCHENZLE, D. (1995): Zur Frage der weiteren Tollwutbekämpfung in Deutschland. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 102, 421–424.

SCHLÜTER, H. – MÜLLER, T. (1995): Tollwutbekämpfung in Deutschland. Ergebnisse und Schlußfolgerungen aus über 10jähriger Bekämpfung. *Tierärztl. Umschau*, 50, 748–758.

SCHNEIDER, L. G. – COX, J. H. (1983): Ein Feldversuch zur oralen Immunisierung von Füchsen gegen die Tollwut in der Bundesrepublik Deutschland. I. Unschädlichkeit, Wirksamkeit und Stabilität der Vakzine SAD B19. *Tierärztl. Umsch.*, 38, 315–324.

SMITH, J. S. – YAGER, P. A. – BAER, G. M. (1996): A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus neutralizing antibody. In: MESLIN, F. X. et al.: Laboratory Techniques in Rabies. 4th ed. Geneva, WHO, pp. 181–192.

STECK, F. – WANDELER, A. – BICHSEL, P. – CAPT, S. – SCHNEIDER, L. (1982): Oral immunisation of foxes against rabies. A field study. *Zbl. Vet.-Med. B.*, 29, 372–396.

VRZAL, V. – HUNADY, M. – MATOUCH, O. (1996): Immunity in young foxes after oral vaccination against rabies. In: LALOŠEVIC, D.: Selected Papers of Rabies Prophylaxis. Pasteur Institute, Novi Sad. 157 pp.

UILLAUME, P. – AUBERT, M. – DEMERSON, J. M. – CLIQUET, F. BARRAT, J. – BREITENMOSER, U. (1997): Vaccination des renards contre la rage par dépôt d'appâts vaccinaux à l'entrée des terriers. *Ann. Méd. Vét.*, 141, 55–62.

Received: 98-05-07

Accepted: 98-05-29

Kontaktní adresa :

MVDr. Oldřich Matouch, CSc., Státní veterinární ústav, U sila 1139, 463 11 Liberec 30, Česká republika
Tel. +420 48 46 26 31, fax +420 48 46 26 22

CHLAMYDIA PECORUM

L. Pospíšil

Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: Minireview of the fourth *Chlamydia* species – *C. pecorum* – described only in 1992. Data on clinical manifestations and pathogenesis of experimental infection with *C. pecorum*, including clinical and serological diagnostic methods are summarized and completed with a description of characteristics of isolates of different origins and available information on genetics and antigenic properties of *C. pecorum*.

Chlamydia pecorum; clinical manifestations; experimental infection; characteristics of isolates; genetics

ABSTRAKT: Minireview o čtvrtém chlamydiálním druhu *C. pecorum*, popsáném teprve v roce 1992. V přehledu je uveden klinický obraz a experimentální patogenita *C. pecorum*, diagnostické možnosti klinické a sérologické, speciální popis kmenů různé provenience a dosavadní údaje o genetice a antigenních vlastnostech *C. pecorum*.

Chlamydia pecorum; klinický obraz; experimentální infekce; speciální popis; genetika

ÚVOD

Genitální chlamydiální infekce, jako významný zdravotnický problém, byly rozpoznány v souvislosti s rozvojem poznatků o úloze chlamydií v akutních klinických syndromech a s poznáním vážného dopadu těchto infekcí na reprodukci. Úloha chlamydií při vzniku očních onemocnění byla známá již dávno. K druhotným poznatkům o jejich prevalenci došlo poté, co se diagnostické testy staly široce dostupné. Celosvětově se odhaduje 300 milionů případů chlamydiové infekce ročně (Holmes aj., 1984; Schachter, 1990). Důsledné kontinuální aplikování molekulárních technik nepochybně přispěje k objasnění stále se expandující úlohy chlamydií při vzniku onemocnění lidí i zvířat, vytýčí fylogenetické vztahy mezi chlamydiálními druhy a v bakteriální říši a poskytne metody pro detekci a kontrolu chlamydiálních infekcí (Peeling a Brunham, 1996).

Chlamydie jsou obligátní intracelulární gramnegativní bakterie s jedinečným vývojovým cyklem. Patří do řádu *Chlamydiales* s jednou čeledí a jedním rodem (Moulder aj., 1984). Rod *Chlamydia* má čtyři druhy: *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae*, *C. pecorum*. Je pravděpodobné, že seznam jednotlivých druhů není úplný a brzy bude rozšířen o další, který je prozatím označován jako mikroorganismus „Z“, protože podle srovnávacích analýz sekvencí ribosomální DNA mezi chlamydií patří (Kahane aj., 1995). Chlamydie jsou příčinou rozsáhlé palety různých patologických stavů o široké škále, od inaparentních až po těžké, letálně končící infekce (Storz, 1988).

Čtvrtý chlamydiální druh – *C. pecorum* – popsali teprve v roce 1992 japonští autoři Fukushima a Hirai. Je považován výhradně za zvířecího patogena, obdobně jako *C. psittaci*, zatímco druhy *C. trachomatis* a *C. pneumoniae* jsou označovány jako patogeny humánní (Grayston aj., 1989; Věžník a Pospíšil, 1997).

Dělení jednotlivých chlamydiových druhů na patogeny humánní a zvířecí se zdá být jen aproximativní, nikoliv však výhradní, protože *C. psittaci* – ač převážně patogen zvířecí – může způsobovat infekce lidí a naopak humánní patogen *C. trachomatis* byl prokázán ve spojivkovém vaku krav, ejakulátu býků a plicích holubů (Věžník a Pospíšil, 1993, 1997; Pospíšil aj., 1997), ve stěvě selat (Zahn aj., 1995) atd.

Různost chlamydiových kmenů všech dosavadních druhů byla známa ještě před objevem *C. pecorum*. *C. trachomatis* má tři biovary (biovar trachom, biovar lymphogranuloma venereum a biovar myši pneumonitidy). Biovar trachomový má sérovary A, B, Ba, C (způsobující oční infekci trachom), D, E, F, G, H, I, K (původce genitálních infekcí). Biovar lymphogranuloma venereum má sérotypy L₁, L₂, L₃ (původce pohlavní nákazy lymphogranuloma venereum). U biovaru myši pneumonitidy nebyly zatím sérovary popsány.

C. psittaci má biovar savčí, biovar ptačí a biovary Koala. Biovar savčí má devět sérovarů, biovar ptačí sedm sérovarů a donedávna dva existující biovary Koala byly překlasifikovány jako Koala *C. pneumoniae* a Koala *C. pecorum* (Timm aj., 1996).

Výskyt *C. pecorum* bude patrně častější než se předpokládá. Podle skotských autorů (Anderson aj.,

1996), kteří provedli analýzu chlamydiových izolátů z přežvýkavců a prasat, většina patřila k *C. pecorum*.

V tomto přehledu bude uvedena pouze *C. pecorum*, která jako příčina humánní infekce nebyla dosud zaznamenána. Nejpočetnější publikace o tomto druhu se týkají molekulární genetiky, imunochemie a poměrně méně často patogenese. Ve srovnání s obsáhlou literaturou o *C. trachomatis*, *C. psittaci* a *C. pneumoniae*, je počet prací o *C. pecorum* zatím skromný.

INFEKCE *C. PECORUM*

Klinický obraz infekcí způsobených *C. pecorum* – obdobně jako infekcí vyvolaných jinými chlamydiálními druhy – může mít charakter inaparentní, ale také velmi závažný. Postiženo bývá převážně centrální nervstvo, respirační a trávicí trakt. Infekce tak může mít charakter encefalomyelitidy, pneumonie nebo intestinálního postižení s průjmy. Inaparentní infekce se zdají být velmi časté. Po akutní klinické infekci může dojít ke stavu latence a infikovaný jedinec se stává nosičem chlamydií, které vylučuje exkrementy po velmi dlouhou dobu (Fukushi a Hirai, 1993). Pospischil aj. (1996) popisují kromě intestinálního postižení prasat také aborty, orchitidy, epididymitidy a uretritidy u kančů, dále perikarditidy, polyartritidy a polyserositidy u selat a artritidy a konjunktivitidy jatečných bēhounů.

Specifické epidemiologické analýzy zatím nebyly provedeny. Pouze na základě séroepidemiologických studií japonských autorů, při nichž bylo použito reakce vazby komplementu, se dá prokázat velké rozšíření chlamydiové infekce u hovězího dobytka v letech 1953 až 1960, u krav, koní a prasat v letech 1980 až 1983 (Fukushi aj., 1985). V roce 1988 popsali Ishida aj. izolaci chlamydie z trusu klinicky bezpříznačné ovce. Z těchto nálezů se dá usuzovat, že šlo o infekci způsobenou *C. pecorum*. Rovněž dle průběhu a charakteru enzoocie neplodnosti skotu z šedesátých let u nás je pravděpodobné, že její příčinou byla *C. pecorum* (Věžník, 1971).

Výsledky izolačních pokusů prováděných na farmách v Anglii a Walesu (Clarkson a Philips, 1997) nasvědčují, že pro vznik enterální infekce *C. pecorum* je věk jedince významným faktorem. Maximum izolátů bylo zachyceno (na tkáňových kulturách McCoy) od jehňat ve věku tři až devět měsíců. Z feces 316 dospělých ovcí se nepodařilo zachytit ani v jediném případě.

S pomocí mikroimunofluorescenční reakce se podařilo diferencovat několik sérovarů *C. pecorum* (Baghian aj., 1996).

EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE

C. pecorum inokulovaná do žloutkového vaku kuřecího embrya způsobuje jeho uhynutí do 3 až 11 dnů. *C.*

pecorum je mírně patogenní pro myš. Pouze po intranasální infekci se u myši zpravidla rozvíjí infekce, zatím co po infekci subkutánní, intraperitoneální nebo intracerebrální se infekce projeví sotva znatelně. Zato relativně velmi patogenní je *C. pecorum* pro morče. Po intraperitoneální infekci se u naočkovaného morčete objeví horečka, ztráta tělesné hmotnosti, peritonitis, splenomegalie. Současně se vytvářejí komplementfixační protilátky (Fukushi a Hirai, 1993).

U prasat způsobuje *C. pecorum* po intracerebrální aplikaci infekci mírného průběhu s horečkou, malátností, ztrátou chuti. Po aplikaci tracheální vznikne pneumonie. V přirozených podmínkách však infekce probíhá s daleko pestřejšími klinickými příznaky.

DIAGNÓZA

Stanovení diagnózy infekce *C. pecorum* je značně obtížné, protože variabilita klinických příznaků na jedné straně a počet latentních bezpříznačných infekcí na straně druhé jsou velmi časté. K tomu je nutno připočítat citelný nedostatek vhodných diagnostických metod. V každém případě je předpokladem pro stanovení exaktní diagnózy izolace *C. pecorum* a její identifikace, například PCR (Sheehy aj., 1996). Velmi dobrých výsledků průkazu *Chlamydia psittaci/pecorum* dosáhli Zahner aj. (1995) pomocí imunohistochemie.

Pro sérologickou diagnostiku není stále ještě k dispozici vhodný antigen. Pudjiatmoko aj. (1996) použili k průkazu antichlamydiových protilátek (včetně anti-*C. pecorum*) u koček nepřímý imunofluorescenční test. S dobrým výsledkem byla též aplikována kompetitivní ELISA reakce (Salti-Montesanto aj., 1997). Nepominuta nezůstává ani reakce komplementfixační (Griffiths aj., 1996). Antigeny sérotypu 2 *C. pecorum* jsou patrně species specifickými antigeny, které mohou být použity v diagnostice (Salinas aj., 1996).

SPECIÁLNÍ POPIS

U *C. pecorum* byly zatím popsány boviní, ovinní a porcinní kmeny (Fukushi a Hirai, 1992; Kaltenboeck aj., 1993). Typovým kmenem je E 58 ATCC VR 628 izolovaný z mozku telety (Wenner aj., 1953). Název „*pecorum*“ je odvozen od latinského slova „*pecus*“, označující stádo ovcí nebo hovězího dobytka. Původně byly také kmeny izolované pouze z hovězího dobytka nebo ovcí řazeny k druhu *C. pecorum*. Dosud známé fenotypy *C. pecorum* jsou neodlišitelné od *C. psittaci* v tom, že jsou rezistentní na sulfadiazin a vytvářejí oválné, syté inkluze v buněčných kulturách. V inkluzích se neukládá glykogen a mají typická retikulární a elementární tělíska, která jsou po stránce morfologické identická s tělísky *C. psittaci*. Chromatograficky se podařilo určit poměr G + C mol% *C. pecorum* přibližně na 40 % (Fukush-

hi a Hirai, 1988). Homologie mezi různými kmeny *C. pecorum* je 92 %, mezi *C. pecorum* a jinými chlamydiemi méně než 30 %.

Ke kultivaci *C. pecorum* se používá žloutkový vak kuřecího embrya a určité linie buněčných kultur. Za pět až sedm dnů po inokulaci do žloutkového vaku se lze o růstu *C. pecorum* přesvědčit barvením podle Gimenez. Z buněčných linií se pro kultivaci *C. pecorum* nejčastěji používají Madine-Derby z hovězí ledviny (MDBK), HeLa 229, Mc Coy a L929. Typový kmen E 58 roste pouze na MDBK. Před inokulací *C. pecorum* je nutno na buněčnou linii působit pět minut DEAE-dextranem (30 mg/ml) při pokojové teplotě. Dále je k absorpci mikroorganismu na buňky nutná centrifugace (1 000 ot/min po dobu 20 minut při teplotě 20 °C) a přísada cykloheximidu (0,5 µg/ml) v médiu z 5 % bovinního fetálního séra. Suplementární přísady, jako například tryptofosofosfátový bujon (10 %), glukóza (0,1 %) a některé aminokyseliny v médiu růst *C. pecorum* příznivě ovlivňují. Kmeny *C. pecorum* zřídka mají cytopatický efekt. Inokulované buňky se inkubují tři až pět dní při teplotě 37 °C (Philips a Clark-son, 1995).

GENETIKA

Chromozomální DNA *C. pecorum*, dále její fyzikální a genetické zmapování nejsou ještě dostatečně známy.

C. pecorum vykázala více jak 88 % homologie DNA z kmenů tohoto druhu. Homologie mezi *C. pecorum* a jinými chlamydiemi byla menší než 30 %. Tyto údaje jsou průkazem genetické identity *C. pecorum* a opravňují její oddělení od *C. psittaci*.

Fylogenetické a alelické analýzy spočívající na sekvencích genu proteinu zevní membrány (MOMP) rovněž prokázaly, že *C. pecorum* tvoří jednu skupinu ompA alel (Kaltenboeck aj., 1991, 1993). Podle toho rovněž více kmenů porcinního původu patří ke druhu *C. pecorum*. Kaltenboeck aj. (1993) referují o čtyřech ompA alelách v *C. pecorum*. Rovněž Anderson (1991) identifikoval jeden kmen izolovaný z ovčí polyartritidy jako *C. pecorum* na základě sekvencí ompA. Analýza sekvencí genu proteinu zevní membrány přispěla také k potvrzení dvou genetických skupin chlamydií izolovaných z medvídků koala. Skupina A (dříve označená jako I) zahrnuje kmeny způsobující oční a systémové infekce, zatímco kmeny skupiny B (dříve II) vyvolávají u koal urogenitální a oční infekce (Glassick aj., 1996). Timms aj. (1996) tyto izoláty označuje jako Koala *C. pneumoniae* a Koala *C. pecorum*.

Fukushi a Hirai (1993) prokázali, že existují nejméně tři sérovary *C. pecorum*. Údaje o DNA sekvencích umožnily rozlišení kmenů amerického a japonského původu (Kaltenboeck aj., 1993).

DNA fingerprinting metoda prokázala jasné rozdíly mezi *C. pecorum* a jinými chlamydiálními druhy (Fukushi a Hirai, 1993).

IMUNOCHEMIE

Antigenní profil *C. pecorum* byl vyšetřován reakcí imunoblot s hovězími séry obsahujícími komplement-fixační nebo ELISA-protilátky (Matsumoto aj., 1991). Šest z devíti sér reagovalo s antigeny o 40, 56 až 64 a 84 kDa. Tyto výsledky dokazují silnou imunogenicitu antigenů 56 až 64 a 84 kDa antigenů a imunogenní odlišnost antigenu MOMP.

Antigeny elementárních tělísek *C. pecorum* byly zkoumány s pomocí králíčího antiséra reakcí imunoblot. Bylo zjištěno nejméně 20 antigenů v rozmezí molekulové hmotnosti 3 až 20 kDa. Většinu antigenů byla 5 až 7, 16, 39, 56 až 64, 84 a 86 kDa. Fukushi a Hirai (1993) pozorovali nejméně tři imunotypy MOMP. Tři kmeny izolované v Japonsku byly typ 4 (Bo/Jokohama) a typ 5 (Bo/Malda), zatímco dva kmeny z USA Bo/58 a ov/IPA byly typ 6.

Bylo prokázáno, že sekvence ompA obou těchto kmenů jsou identické. Perez-Martinez a Storz (1985) podávají zprávu o typech kmenů *C. pecorum*, k nimž patří pět sérovarů.

Kuroda-Kitagawa aj. (1993) analyzovali s pomocí nepřímého imunofluorescenčního testu s monoklonálními protilátkami proti 56 až 64 Kd antigenům *C. pecorum* (kmen Maeda izolován z pneumonie krávy) pět kmenů *C. pecorum*, 25 kmenů savčí *C. psittaci*, 19 kmenů ptačí *C. psittaci*, jeden kmen *C. pneumoniae* a tři kmeny *C. trachomatis*. Imunologická příbuznost byla prokázána mezi *C. pecorum* a savčími kmeny *C. psittaci*, které se kompletně lišily od kmenů ptačích. Bovinní kmeny se odlišovaly od ovinních kmenů. Kmeny izolované z morčat a koček se lišily od ovčích i bovinních izolátů. Výsledky potvrzují, že uvedený způsob typizace umožňuje epidemiologické studie se zaměřením na odlišení bovinních a ovinních kmenů *C. pecorum* a *C. psittaci*.

Parciální analýzou 16S z RNA nukleotidových sekvencí bylo určeno, že existuje poměrně vysoký počet mezidruhových sekvencí, svědčících o větší příbuznosti *C. pecorum* s *C. psittaci* než s *C. pneumoniae* a *C. trachomatis* (Sheehy aj., 1997). Odbornou studii provedli také Pudjiatmoko aj., 1997.

ZÁVĚR

C. pecorum je nově popsán chlamydiální druh patogenní pro savce. Pravděpodobně se však vyskytoval již dříve, avšak jeho bližší určení bylo umožněno teprve na základě nových poznatků z chlamydiální biologie. Byl to zejména výzkum *C. pneumoniae*, který přinesl nové pohledy na chlamydiální infekci, specifickou morfologii elementárních tělísek (EB), větší či menší rozdílnost ve skladbě zevní membrány (MOMP) a rozdíly v patogenitě jednotlivých druhů (Grayston aj., 1989). *C. pecorum* má široké hostitelské spektrum (od přežvýkavců přes prase až po vačnatce), pestroutu paletu patogenity od encephalomyelitidy po inaparentní infek-

ci, homogenní chromozomální DNA a odlišné genové sekvence OMPA. Velmi chudé jsou zatím poznatky o vlastnostech na molekulární úrovni. Byly zatím zjišťovány pouze genové sekvence více kmenů, nikoliv však proteinových genů zevní membrány včetně *omp2* a *omp3* a ani gen tepelného šoku nebyl zatím sekvencován.

LITERATURA

- ANDERSON, A. A. (1991): Serotyping of *Chlamydia psittaci* isolate using serovar-specific monoclonal antibodies with the microimmunofluorescence test. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 707–711.
- ANDERSON, I. E. – BAXTER, S. I. F. – DUNBAR, S. – RAE, A. G. – PHILIPS, H. L. – CLARKSON, M. J. – HERRING, A. J. (1996): Analyses of the genomes of chlamydiae isolates from ruminants and pigs support the adoption of the new species *Chlamydia pecorum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 245–251.
- BAGHIAN, A. – KOUSOULAS, K. – TRUAX, R. – STORZ, J. (1996): Specific antigens of *Chlamydia pecorum* and their homologues in *C. psittaci* and *C. trachomatis*. *Am. J. Vet. Res.*, **57**, 1720–1725.
- CLARKSON, M. J. – PHILIPS, H. L. (1997): Isolation of faecal chlamydia from sheep in Britain and their characterization by cultural properties. *Vet. J.*, **153**, 307–310.
- FUKUSHI, H. – HIRAI, K. (1988): Immunochemical diversity of the major outer membrane protein of avian and mammalian *Chlamydia psittaci*. *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 675–680.
- FUKUSHI, H. – HIRAI, K. (1992): Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminant. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42**, 306–308.
- FUKUSHI, H. – HIRAI, K. (1993): *Chlamydia pecorum* – the fourth species of genus *Chlamydia*. *Microbiol. Immunol.*, **37**, 515–522.
- FUKUSHI, H. – OGAWA, H. – MORIKOSHI, T. – OKUDA, Z. – SHIMAKURA, S. – HIRAI, K. (1985): Chlamydial complement fixing antibodies in cows, horses and pigs from 1980 to 1983. *Res. Bull. Fac. Agric. Gifu Univ.*, **50**, 1985, 259–263. In: FUKUSHI, H. – HIRAI, K. (1993): *Chlamydia pecorum* – the fourth species of genus *Chlamydia*. *Microbiol. Immunol.*, **37**, 515–522.
- GLASSIK, T. – GIFFARD, P. – TIMMS, P. (1996): Outer membrane protein² gene sequences indicate that *Chlamydia pecorum* and *Chlamydia pneumoniae* cause infections in Koalas. *Syst. Appl. Microbiol.*, **19**, 457–464.
- GRAYSTON, J. T. – KUO, C. C. – CAMPBELL, L. A. – WANG, S. P. (1989): *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. strain TWAR. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 88–90.
- GRIFFITHS, P. C. – PLATER, J. M. – HORGAN, M. W. – ROSE, M. P. – VENABLES, C. – DAWSON, M. (1996): Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by comparative immunofluorescence assay, recombinant lipopolysaccharide enzyme-linked immunosorbent assay, and complement fixation test. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 1512–1518.
- HOLMES, K. K. – MARDH, P. A. – SPARLING, P. F. – WIESNER, P. J. (1984): Sexually Transmitted Diseases. New York, McGraw-Hill Book Co. 1079 s.
- ISHIDA, T. – KIRISAWA, R. – ONUMA, M. – MIKAMI, Y. – IMAZU, Y. – KAWAKAMI, Y. (1988): Isolation and serological survey of *Chlamydia psittaci* in sheep in Hokkaido. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **50**, 894–899.
- KAHANE, S. – METZER, E. – FRIEDMAN, M. G. (1995): Evidence that the novel microorganism „Z” may belong to a new genus in the family *Chlamydiaceae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **126** (2), 203–207.
- KALTENBOECK, B. – KOUSOULAS, K. G. – STORZ, J. (1991): Detection and differentiation of *Chlamydia psittaci* mediated by a two-step polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 1969–1975.
- KALTENBOECK, B. – KOUSOULAS, K. G. – STORZ, J. (1993): Structures and allelic diversity and relationship among the major outer membrane protein (*ompA*) genes of the four chlamydial species. *J. Bacteriol.*, **175**, 487–502.
- KURODA-KITAGAWA, Y. – SUZUKI-MURAMATSU, C. – YAMAGUCHI, T. – FUKUSHI, H. – HIRAI, K. (1993): Antigenic analysis of *Chlamydia pecorum* and mammalian *Chlamydia psittaci* by use of monoclonal antibodies to the major outer membrane protein *ompA* 56-to 64-kd protein. *Am. J. Vet. Res.*, **54**, 709–712.
- MATSUMOTO, H. – FUKUSHI, H. – YAMAGUCHI, T. – HIRAI, K. (1991): Antigenic analysis of feline and bovine *Chlamydia psittaci* with monoclonal antibodies. *J. Vet. Med. Sci.*, **53**, 173–179.
- MOULDER, J. W. – HATCH, T. P. – KUO, C. C. – SCHACHTER, J. – STORZ, J. (1984): Genus *Chlamydia*. In: KRIEG, N. R. (ed.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Baltimore, Williams and Wilkins.
- PEELING, R. W. – BRUNHAM, R. C. (1996): Chlamydiae as pathogen: new species and new issues. *E. merg. Infect. Dis.*, **2**, 307–319.
- PEREZ-MARTINEZ, J. A. – STORZ, J. (1985): Antigenic diversity of *Chlamydia psittaci* of mammalian origin determined by microimmunofluorescence. *Infect. Immun.*, **50**, 905–910.
- PHILIPS, H. L. – CLARKSON, M. J. (1995): Spontaneous change from overt to covert infection of *Chlamydia pecorum* in cycloheximide-treated mouse McCoy cells. *Infect. Immun.*, **63**, 3729–3730.
- POSPISCHIL, A. – THOMA, R. – SCHILLER, I. – SYDLER, T. – GUSCETTI, F. (1996): Chlamydia in pigs. *Pig-Journal*, **37**, 9–13.
- POSPÍŠIL, L. – VĚŽNÍK, Z. – DIBLÍKOVÁ, I. – PEJČOCH, M. (1997): Výskyt protilátek proti skupinovému antigenu v lidské populaci ČR. *Epidem. Mikrobiol. Immunol.*, **46**, 3–17.
- PUDJATMOKO-FUKUSHI, H. – OCHIAI, Y. – YAMAGUCHI, T. – HIRAI, K. (1996): Seroepidemiology of feline chlamydiosis by microimmunofluorescence assay with multiple strains as antigens. *Microbiol. Immunol.*, **40**, 755–759.
- PUDJATMOKO-FUKUSHI, H. – OCHIAI, Y. – YAMAGUCHI, T. – HIRAI, K. (1997): Phylogenetic analysis of the genus *Chlamydia* based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 425–431.
- SALINAS, J. – SOURIAN, A. – DeSu, C. – ANDERSEN, A. A. – RODOLAKIS, A. (1996): Serotype 2-specific antigens from ruminant strains of *Chlamydia pecorum* detected

by monoclonal antibodies. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 19, 155–161.

SALTI-MONTESANTO, V. – TSOLI, E. – PAPAPAVASILION, P. – PSARROU, E. – MARKEY, B. K. – JONES, G. E. – VRETON, E. (1997): Diagnosis of ovine enzootic abortion, using a competitive ELISA based on monoclonal antibodies against variable segments 1 and 2 of the major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* serotype 1. Am. J. Vet. Res., 58, 228–235.

SCHACHTER, J. (1990): Chlamydial infections. West J. Med., 153, 523–534.

SHEEHY, N. – MARKEY, B. – GLEESON, M. – QUINN, P. J. (1996): Differentiation of *Chlamydia psittaci* and *C. pecorum* strains by species – specific PCR. J. Clin. Microbiol., 34, 3175–3179.

SHEEHY, N. – MARKEY, B. – QUINN, P. J. (1997): Analysis of partial 16S rRNA nucleotide sequences of *Chlamydia pecorum* and *C. psittaci*. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 17, 201–205.

STORZ, J. (1988): Overview of animal diseases induced by chlamydial infections. In: BARRON, A. J. (ed.): Microbiology of Chlamydia. Florida, CRC Press. Inc. Boca Raton, s. 167–192.

TIMMS, P. – JACKSON, M. – GLASSICK, T. – GIFFARD, P. (1996): Phylogenetic diversity of chlamydial strains

(*C. pecorum* and *C. pneumoniae*) infecting Koalas. In: Proceedings of the third Meeting of The European Society for Chlamydia Research. Vienna, Sept. 11–14, 119 s.

VĚŽNÍK, Z. (1971): Udział bedsonii w przypadkach enzootycznej nieplodności u bydła. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol., 124, 81–88.

VĚŽNÍK, Z. – POSPÍŠIL, L. (1993): Podíl chlamydii na nemocnosti zvířat a lidí. Brno, VÚVeL, 53 s.

VĚŽNÍK, Z. – POSPÍŠIL, L. (1997): Chlamydie infekce. Brno, nakladatelství IDVZP, 163 s.

WENNER, H. A. – HARSHFIELD G. S. – CHANG, T. W. – MENGES, R. W. (1953): Sporadic bovine encephalomyelitis. II. Studies on the etiology of the disease, isolation of nine strains of an infection agent from naturally infected cattle. Am. J. Hyg., 57, 15–29.

ZAHN, J. – SZEREDI, L. – SCHILLER, I. – STRAUMANN KUNZ, U. – BÜRGI, E. – GUSCETTI, F. – HEINEN, E. – CORBOZ, L. – SYDLER, T. – POSPISCHIL, A. (1995): Immunhistologischer Nachweis von *Chlamydia psittaci*/*C. pecorum* und *C. trachomatis* im Ferkel – Darm. J. Vet. Med. B, 42, 266–276.

Received: 98–03–06

Accepted after corrections: 98–03–18

Kontaktní adresa:

Prof. MUDr. Leopold Pospíšil, DrSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika
Tel. +420 5 41 32 12 41, fax +420 5 41 21 12 29, e-mail: „ULEPO“ kahr@vuvel.anet.cz

Oznamujeme čtenářům a autorům našeho časopisu,

že v návaznosti na časopis *Scientia agriculturae bohemoslovaca*, který až do roku 1992 vycházel v Ústavu vědeckotechnických informací Praha, vydává od roku 1994

Česká zemědělská univerzita v Praze

časopis

SCIENTIA AGRICULTURAE BOHEMICA

Časopis si zachovává původní koncepci reprezentace naší vědy (zemědělství, lesnictví, potravinářství) v zahraničí a jeho obsahem jsou původní vědecké práce uveřejňované v angličtině s rozšířenými souhrny v češtině.

Časopis je otevřen nejširší vědecké veřejnosti a redakční rada nabízí možnost publikace pracovníkům vysokých škol, výzkumných ústavů a dalších institucí vědecké základny.

Příspěvky do časopisu (v angličtině, popř. v češtině či slovenštině) posílejte na adresu:

**Česká zemědělská univerzita v Praze
Redakce časopisu *Scientia agriculturae bohemica*
165 21 Praha 6-Suchbát**

MORPHOLOGIC AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF BOVINE SOMATIC CELLS IN MILK*

MORFOLOGICKÁ A FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKA SOMATICKÝCH BUNĚK MLÉKA SKOTU

Z. Sládek¹ D. Ryšánek²

¹*Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno, Czech Republic*

²*Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic*

ABSTRACT: Morphology of bovine mammary gland somatic cells studied on optical and electronoptical microscopy basis is summarized in this review. The review also includes basic functional characteristics of these cells. Degenerative forms of somatic cells, especially phagocytes, are characterized morphologically, too. The review is the basis of further experimental studies of phagocytosis process of phagocytes derived from a juvenile bovine mammary gland.

bovine mammary gland; somatic cells; morphology

ABSTRAKT: Review shrnuje poznatky o morfologii somatických buněk mléčné žlázy skotu získané na bázi optické a elektronoptické mikroskopie. Zabývá se popisem základních funkčních charakteristik těchto buněk. Charakterizuje rovněž morfologicky degenerativní formy somatických buněk, zejména fagocytů. Je východiskem dalších experimentálních studií procesu fagocytózy fagocytů pocházejících z juvenilní mléčné žlázy skotu.

mléčná žláza skotu; somatické buňky; morfologie

Seznam použitých zkratk: PMN – polymorfonukleární leukocyt; CFU-GM – granulocyty a makrofágy kolonie stimulující faktor.

CONTENTS

1. Introduction
2. Types of somatic cells
 - 2.1. Polymorphonuclear leukocytes
 - 2.1.1. Structure
 - 2.1.2. Ultrastructure
 - 2.2. Macrophages
 - 2.2.1. Structure
 - 2.2.2. Ultrastructure
 - 2.3. Lymphocytes
 - 2.4. Eosinophil granulocytes
 - 2.5. Epithelial cells
 - 2.5.1. Structure
 - 2.5.2. Ultrastructure
 - 2.6. Erythrocytes
3. Somatic cells pathomorphology
 - 3.1. Abnormal polymorphonuclear leukocytes
 - 3.2. Abnormal macrophages

* Supported by the National Agency for Agricultural Research in Prague (Grant No. EP 0960006084).

OBSAH

1. Úvod
2. Druhy somatických buněk
 - 2.1. Polymorfonukleární leukocyty
 - 2.1.1. Struktura
 - 2.1.2. Ultrastruktura
 - 2.2. Makrofágy
 - 2.2.1. Struktura
 - 2.2.2. Ultrastruktura
 - 2.3. Lymfocyty
 - 2.4. Eozinofilní granulocyty
 - 2.5. Eritocyty
 - 2.5.1. Struktura
 - 2.5.2. Ultrastruktura
 - 2.6. Erytrocyty
3. Patomorfologie somatických buněk
 - 3.1. Abnormální polymorfonukleární leukocyty
 - 3.2. Abnormální makrofágy
4. Závěr
5. Literatura

1. ÚVOD

Mléko v období laktace, sekrety mléčné žlázy v období kolostrogenese, v kolostrálním období a v období aktivní involuce, jakož i tekutina obsažená v dutinovém systému juvenilní mléčné žlázy a mléčné žlázy v období trvalé involuce obsahují buňky. Paape aj. (1963) pro ně zavedl označení somatické buňky. Tento pojem dosáhl širokého uplatnění zejména v diagnostice zánětu mléčné žlázy a jako jakostní znak syrového mléka. V podstatě jde o buňky zánětu, jímž se makroorganismus brání proti infekcím a napravuje poškozené tkáně. Zánětu se účastní jednak krátkou dobu žijící, cirkulující zánětlivé buňky (neutrofily, eozinofily a bazofily), jednak dlouhožijící, rezidentní, necirkulující zánětlivé buňky (makrofágy a žírné buňky) – Broide (1987).

Buněčná ochrana mléčné žlázy je však v širším smyslu zajišťována dvěma skupinami leukocytů: lymfocyty B a T, náležejícími k humorální a buňkami zprostředkované imunitě, a fagocyty, neutrofily a makrofágy, jejichž funkce spočívá v ingesci a zabíjení patogenů mléčné žlázy. Účastní se i další buňky, což vedlo k rozlišení na tzv. nefagocyty (lymfocyty), neprofesionální fagocyty (trombocyty, žírné buňky, epitelální buňky, fibroblasty a HeLa buňky) a profesionální fagocyty (neutrofily a makrofágy) – Paape aj. (1991a).

Buňky mléka skotu byly studovány dávno před tím, než byl pro ně vytvořen souhrnný pojem somatické buňky. Označení jednotlivých typů buněk procházelo vývojem. Proto v literatuře existuje celá řada synonym pro jejich označení: polymorfonukleární leukocyty (PMN, neutrofilní granulocyty, neutrofily), makrofágy

(mononukleární fagocyty, histiocyty, monocyty, kolostrální tělíska, Donného korpuskle, pěnové buňky) a lymfocyty.

Polymorfonukleární leukocyty, makrofágy a lymfocyty jsou nejběžnější se vyskytující buňky v období laktace, zaprahlosti a v kolostrálním období (Zlotnik, 1947; Blackburn a Macadam, 1954; Mayer a Klein, 1961; Cullen, 1966; Outteridge a Lascelles, 1966; Duitschaeffer a Leggat, 1967; Giesecke a van den Heever, 1967; Schalm a Laismanis, 1968).

V menším zastoupení to jsou:

- epitelální buňky (Zlotnik, 1947; Adler a Magaki, 1951; Engel, 1953; Blackburn a Macadam, 1954; Mayer a Klein, 1961; Helminen a Ericsson, 1968a, b, c; Duitschaeffer, 1968; Schalm a Laismanis, 1968; Smith a Schultz, 1977; Schulz, 1977),
- eozinofily (Zlotnik, 1947; Duitschaeffer a Leggat, 1967; Wardley aj., 1976),
- bazofily (Duitschaeffer a Leggat, 1967),
- histiocyty (Holmquist a Papanicolaou, 1956),
- monocyty (Hadwen a Gwalkin, 1939; Adler a Magaki, 1951; Blackburn a Macadam, 1954; Mayer a Klein, 1961; Cullen, 1966; Duitschaeffer a Leggat, 1967; Jensen a Eberhart, 1975; Wardley aj., 1976),
- erytrocyty (Zlotnik, 1947; Mayer a Klein, 1961; Duitschaeffer a Leggat, 1967; Wardley aj., 1976),
- žírné buňky (Helminen a Ericsson, 1968a),

– plazmatické buňky (Blackburn a Macadam, 1954; Helminen a Ericsson, 1968a).

Absolutní i diferenciální počet somatických buněk je rozdílný v jednotlivých funkčních obdobích mléčné žlázy (Blackburn, 1966; Schultz, 1977; Lee aj., 1980; Jensen a Eberhart, 1981; McDonald a Anderson, 1981; Outteridge a Lee, 1981; Paape aj., 1981; Concha, 1986). Souhr těchto údajů prezentuje tab. I.

I. Absolutní i diferenciální počet somatických buněk ve funkčních obdobích mléčné žlázy – Absolute and differential somatic cell counts in the functional periods of mammary gland

Období ¹	Absolutní počet ² (10 ³ /ml)	Makrofágy ⁶ (%)	PMN (%)	Lymfocyty ⁷ (%)
Laktace ²	200	60	12	28
Kolostrální ³	1 000/280	50/37	25/37	25–26
Aktivní involuce ⁴	18 000	43	19	38

¹period, ²lactation, ³colostral, ⁴active involution, ⁵absolute counts, ⁶macrophages, ⁷lymphocytes

Nejvýznamějším činitelem ovlivňujícím absolutní i diferenciální počet somatických buněk je zánětlivý proces, při kterém vzrůstá počet somatických buněk ve čtvrtovém vzorku až o několik řádů (z 10⁴ na 10⁷). Průměrný počet somatických buněk narůstá s virulencí patogenního agens (Blackburn, 1955; Zeidler aj., 1968). V diferenciálním počtu vzrůstá při akutním zánětu zastoupení polymorfonukleárních leukocytů, které může dosáhnout 90 i víceprocentního zastoupení. Chronický zánět je provázen vyšším zastoupením makrofágů a lymfocytů, avšak polymorfonukleární leukocyty zůstávají dominantní (Mielke a Koblenz, 1981; Concha aj., 1984; Concha, 1986).

2. DRUHY SOMATICKÝCH BUNĚK

2.1. Polymorfonukleární leukocyty

Většina somatických buněk, včetně polymorfonukleárních leukocytů, pochází z krve (Schalm aj., 1971). Polymorfonukleární leukocyty vznikají v kostní dřeni procesem extravaskulární granulopoeze z pluripotentní kmenové buňky. Jejich doba zrání činí u skotu přibližně šest dnů. Polymorfonukleární leukocyty vstupují diapedezí do cévního systému, kde cirkulují. Doba cirkulace v periferní krvi je u skotu pět až šest hodin (Schalm aj., 1971), osm až devět hodin (Carlson a Kaneko, 1975). Poločas životnosti těchto buněk činí jeden až dva týdny (Schalm aj., 1971). Vlivem chemotaktických látek migrují do místa produkce těchto látek, např. do infikovaného dutinového systému mléčné žlázy.

Proces migrace polymorfonukleárních leukocytů z krve do dutinového systému mléčné žlázy byl studován *in vivo* (Schalm aj., 1971; Harmon a Heald, 1982; Nickerson a Pankey, 1984; Stossel aj., 1984; Concha, 1986; Akers a Thompson, 1987; Kehrli a Shuster,

1994) a *in vitro* (Olson, 1990; Huynh aj., 1991; Bochsler aj., 1994; MacDonald aj., 1994; Lin aj., 1995; Lin aj., 1996; Smits aj., 1996).

Těsně po aktivaci polymorfonukleárních leukocytů chemotaktickými faktory dochází ke shrnutí cytoplazmatické membrány (Hoffstein aj., 1982). Buňka se prodlužuje a vytváří směrem dopředu široké lameliopodium a směrem dozadu úzké uropodium. Motorem jsou aktinová cytoplazmatická filamenta seskupená v oblas-

ti lameliopodia a uropodia (Malech aj., 1977). Polymerace a depolymerace těchto filament je regulována aktinmodelujícími proteiny, které tímto způsobem mění tvar polymorfonukleárních leukocytů a jsou nezbytným krokem pro chemotaxi (Stossel aj., 1984).

Schalm aj. (1971) popisují migraci polymorfonukleárních leukocytů do tkání mléčné žlázy skrze kapiláry, jež probíhají parenchymem, a poté přes duktální a alveolární epitel. Avšak způsob pasážování přes epitel není zcela jednoznačně objasněn (Schalm aj., 1971; Concha, 1986; Lin aj., 1995).

Někteří autoři vedli polemiku o tom, jak migrují polymorfonukleární leukocyty přes alveolární epitel a má-li tento proces přímý vliv na poškození sekrečních epitelálních buněk.

Frost (1975) uvádí, že migrují skrze epitelální léze, nikoliv skrze intaktní epitel. Podobně Nickerson a Pankey (1984) tvrdí, že přestup skrze degenerované epitelální buňky je dominantním způsobem migrace. Na druhé straně však Harmon a Heald (1982) uvádějí, že intercelulární migrace je hlavní cestou pro influx polymorfonukleárních leukocytů během mastitidy. Akers a Thompson (1987) na základě studia vlivu na mléčnou produkci uvádějí, že leukocytóza během mastitidy poškozují sekreční epitelie a může snižovat produkci mléka.

Výsledky studií s použitím radioaktivně značených polymorfonukleárních leukocytů prokázaly, že doba migrace činí přibližně dvě hodiny. Tato doba je potřebná pro pevné přilnutí – adhezenci ke stěně endotelu postkapilárních venul, pro migraci mezi endotelálními buňkami diapedezí, migraci skrze intercelulární matrix subepitelální lamina propria, a konečně, pro migraci přes epitelální výstelku strukové cisterny do sekretu mléčné žlázy (Kehrli a Shuster, 1994).

Lin aj. (1995) studovali proces migrace na jednovrstevné kultuře linie bovinních epitelálních buněk mléčné žlázy (MAC-T) a prokázali, že polymorfonukleární leukocyty vstupují mezibuněčnými prostory

tím, že zapouštějí pseudopodia do apikální desmozmální lišty (tight junction) a prostoupí aniž by epitelální buňky porušily. Po prostupu dochází k obnovení pevného spojení mezi epitelálními buňkami.

2.1.1. Struktura

Polymorfonukleární leukocyty, které se nacházejí v mléce skotu, mají téměř shodnou morfologickou strukturu jako v periferní krvi (McDonald a Anderson, 1981) a zachovávají si i mnoho z jejich charakteristik (Schalm aj., 1971).

Buňky mají oválný, eliptický či nepravidelný tvar a jejich multilobulární jádro se barví temně růžově. Velikost buněk je 9 až 10 μm (McDonald a Anderson, 1981). Laloky jádra jsou spojeny jemnými filamenti, která můžeme spatřit v optickém mikroskopu (Schalm aj., 1971). U dojnic v řiti se můžeme setkat se sex chromatinem ve tvaru „bubnové paličky“ tak, jak byl popsán u krevních neutrofilů (Bessis, 1973). Cytoplazma bovinních polymorfonukleárních leukocytů je v nátěrech mléka někdy sotva viditelná, světle zbarvená a obsahuje malé nebo větší množství nepatrně růžových až jasných granulí. Ty pak plázmě dávají narůžovělý nádech. Některé polymorfonukleární leukocyty mohou obsahovat v cytoplazmě jednu nebo více tukových vakuol, které odsunují granule k okraji cytoplazmatické membrány (Schalm aj., 1971). Schalm rovněž uvádí, že neutrofilů můžeme pozorovat ve světelném mikroskopu v různých stadiích degenerativních změn následkem fagocytózy tukových částic.

Granule nacházející se v cytoplazmě polymorfonukleárních leukocytů můžeme rozdělit do tří typů:

- Velké husté azurofilní – primární granule jsou peroxidáza pozitivní a jsou formovány ve stadiu promyelocytu. Jsou to lysozomy o velikosti 0,3 až 0,8 μm . Vůči ostatním granulím jsou zastoupeny v menšině. Obsahují důležité antibakteriální substance, jako myeloperoxidázu, lysozomální kyselou hydrolázu, neutrální proteázu, kyselou mukopolysacharidázu a jiné trávicí enzymy operující v kyselém prostředí. Přitom nejdůležitějším antibakteriálním prostředkem je myeloperoxidáza-hydrogen peroxid-halogenid. Myeloperoxidáza v přítomnosti hydrogen peroxidu a halogenidových iontů usmrcuje bakterie (Paape a Wergin, 1977). Dále obsahují β -glukoronidázu, elastázu a katepsin G (Paape aj., 1991a).
- Malé husté specifické – sekundární granule jsou peroxidáza negativní a formují se během stadia myelocytu. Jejich velikost je přibližně 0,3 μm . Zaujímají čtyřnásobně větší podíl než primární granule. Obsahují lysozomální alkalickou fosfatázu a všechny laktoferin (Paape a Wergin, 1977).
- Nový typ granulí – u skotu byl popsán třetí typ granulí. Tyto granule jsou větší, hustější a nacházejí se ve větším množství než předešlé typy granulí. Obsahují stejné aktivní složky jako azurofilní a specifické granule, kromě laktoferinu (Gennaro aj.,

1980). Dále bazické proteiny, nazývané defenziny. Jsou baktericidní vůči grampozitivním i gramnegativním bakteriím, jakož i vůči houbám a plísním. Baktericidní jsou tedy pro všechny běžné původce mastitid (Paape aj., 1991a).

2.1.2. Ultrastruktura

Přehlednější a podrobnější mikroanatomickou strukturu a ultrastrukturu těchto buněk v mléce umožnil transmisní a rastrovací elektronový mikroskop. Polymorfonukleární leukocyty mají vysokou elektronovou denzitu jader a vykazují obsah malých denzních granulí v cytoplazmě (Lee aj., 1980). Při velkém zvětšení můžeme pozorovat na povrchu buňky množství pseudopodií, které protrudují směrem od středu buňky a vytvářejí tak záhyby a kapsy. Polymorfonukleární leukocyty nemají schopnost regenerace cytoplazmatické membrány (Naidu a Newbould, 1973). Pseudopodie proto představují tzv. zásobu cytoplazmatické membrány. Tato zásoba hraje rozhodující úlohu při fagocytární funkci, neboť při fagocytóze dochází k pohlcování odškrcených úseků plazmalemy (Paape a Wergin, 1977) a tak ke snižování množství cytoplazmatické membrány.

V transmisním elektronovém mikroskopu můžeme vidět přítomné fagocytované kazeinové micely, glykogenové partikule, tukové vakuoly nebo membránový materiál těchto vakuol (Anderson aj., 1975).

Dominantním typem cytoplazmatických granulí u polymorfonukleárních leukocytů kravského mléka jsou denzní azurofilní granule (Paape a Wergin, 1977).

Paape a Wergin (1977) rovněž uvádějí, že azurofilní a specifické granule, které se nacházejí v polymorfonukleárních leukocytech bovinní krve, nejsou v této podobě nalézány u těchto buněk v mléce. Tento fakt, tj. absence specifických granulí, je vysvětlován jako důsledek fagocytózy, neboť tyto typy granulí splývají ve fagolysosomy. To znamená, že specifické granule jsou jako první uzavřeny v procesu fagocytózy do fagozomů za vzniku fagolysosomů (Bainton aj., 1971). Z buněk mohou být reverzní endocytózou extrudována mimo buňku, a to v daleko větším množství než azurofilní granule (Paape a Wergin, 1977). K uvolnění obsahu cytoplazmatických granulí dochází zpravidla právě popsaným způsobem. Za určitých podmínek tedy dochází k extracelulární degranulaci, která významným způsobem ovlivňuje průběh zánětu (Broide, 1987).

2.2. Makrofágy

Je známo, že vysoce vakuolizované buňky (pěnové buňky) popsal již Donné (1838) jako charakteristickou buněčnou složku kolostra a sekretu involující mléčné žlázy. Ačkoliv byly tyto buňky objeveny před více než sto lety, diskutabilní byl jejich původ a funkce. Dnes je zřejmé, že pěnové buňky v mléce jsou

vlastně makrofágy, které mají mimo jiné také schopnost fagocytózy a odstraňování tukových kapének z involující mléčné žlázy (Lee aj., 1969).

Předpokládalo se, že monocyty v mléce pocházejí pravděpodobně z krve nebo jsou původem z buněk vazivové tkáně – histiocytů (Schalm aj., 1971). Dnes je zřejmé, že se diferencují z krevních monocytů, které se usazují v různých tkáních jako zralé makrofágy. Nacházejí se všude v pojivových tkáních a okolo bazálních membrán krevních cév. Do různých tkání migrují monocyty zřejmě náhodně bez nutného vlivu lokálního zánětu (Broide, 1987).

Mononukleární fagocytární systém (dříve nazývaný retikuloendoteliální systém) zahrnuje promonocyty a jejich předchůdkové buňky v kostní dřeni, monocyty v krevním řečišti a makrofágy ve tkáních. Předurčená předchůdková buňka kostní dřeně, tzv. CFU-GM, se během přibližně šesti dnů pod vlivem lokálně tvořených specifických stimulačních faktorů (colony stimulating factor) diferencuje na monoblast. Ten poté přechází v promonocyt, který je po určité době vyplaven do krevního řečiště jako monocyt (Broide, 1987).

2.2.1. Struktura

Monocyty patří mezi největší krevní elementy a zároveň také mezi největší buněčné elementy sektretu mléčné žlázy. Zde makrofágy dosahují velikosti 30 až 40 μm (Lee aj., 1969), 10 až 45 μm (Mayer a Klein, 1961; Jensen a Eberhart, 1975) 15 až 35 μm (McDonald a Anderson, 1981), 35 μm (Desiderio a Campbell, 1980). V mléce je obvykle nalézáme ve stejné strukturální podobě, jako v krvi. V optickém mikroskopu jsou makrofágy oválné, kulaté nebo elongované. Jádro je vyplněno krajkovitým nebo šňůrovitým chromatinem (Schalm aj., 1971), často jemně dispergovaným (Desiderio a Campbell, 1980). Je relativně velké, oválné, ledvinovitého tvaru (Schalm aj., 1971), excentrické a protáhlé (Desiderio a Campbell, 1980), nebo je hluboce sevřeno a často vyplňuje celou cytoplazmu. Cytoplazma makrofágů je světle modrá až šedo-modrá a je často vakuolizovaná nebo zpěněná a může obsahovat několik azurofilních granulí (Schalm aj., 1971). U některých buněk zaujímá cytoplazma větší prostor než jádro, u jiných je tomu naopak. V cytoplazmě se nacházejí intracelulární vakuoly, a to v kruhovém obrazení kolem jádra nebo i na buněčné periferii (Desiderio a Campbell, 1980).

2.2.2. Ultrastruktura

Elektronově mikroskopické studie (Lee aj., 1980) odhalily dva typy makrofágů dle obsahu lipidových inkluzí:

Makrofágy bez lipidových inkluzí: Jádro je u tohoto typu buněk velmi nepravidelně stočené s difúzně rozmístěným chromatinem. V základní cytoplazmě nacházíme mitochondrie, středně velký Golgiho aparát s ma-

lymi, hustými a oválnými vezikulami a také cisterny granulárního endoplazmatického retikula. Velikost tohoto typu buněk je kolem 8 až 18 μm . Tento typ makrofágů je dominantní u krav v období zaprahlosti.

Makrofágy s lipidovými inkluzemi: Ty představují vlastně dva typy buněk. První obsahuje v cytoplazmě globule mléčného tuku s charakteristickým složením membrány, která je obklopená kontinuální membránou jednotkou fagocytární vakuoly. U druhého, většího typu jsou lipidové kapičky bez membrány, obdobně jako tuk tukových depot (Lee aj., 1980).

Makrofágy plní svou úlohu v imunitě, a to hlavně fagocytózou a následnou inaktivací cizích živých a neživých antigenních materiálů (Broide, 1987).

Na rozdíl od polymorfonukleárních leukocytů žijí makrofágy déle, mohou se diferencovat *in situ*, na vnější stimuly odpovídají poměrně pomalu, jsou převládajícím druhem buněk v ložiscích zánětu po uplynutí prvních 8 až 12 hodin (Broide, 1987). Zúčastňují se ničení bakterií a virů žijících uvnitř buňky. Makrofágy se dále oproti polymorfonukleárním leukocytům liší škálou enzymů svých cytoplazmatických granulí, v recyklaci, obnově membrán fagolysosomů, v sekreci nelysosomalních proteinů a ve větší šíři antimikrobiálního spektra (Broide, 1987).

2.3. Lymfocyty

Lymfocyty jsou buňky, které stejně jako předešlé elementy pocházejí z krve. V anglosaské literatuře přetrvává rozdělení na velké a malé lymfocyty (Schalm aj., 1971).

V mléce skotu mají lymfocyty sférický tvar s tmavě se barvicím jádrem. Jádro může být oválné nebo mírně protáhlé. Jaderný chromatin je buď hladký nebo nakupeň. Obvykle má jádro na jedné straně tzv. zoubkování (Lee aj., 1969). Cytoplazma lymfocytu se barví světle až tmavě modře. Občas můžeme pozorovat i přítomnost několika azurofilních granulí, stejně jako u lymfocytů periferní krve (Schalm aj., 1971). Azurofilní granule měří v průměru 0,3 až 0,6 μm a jsou nejvíce přítomny u velkých lymfocytů periferní krve (Bessis, 1973). Někdy cytoplazmu nenalezneme vůbec (Lee aj., 1980). Cytoplazma je u malých lymfocytů neznatelná a jádro vyplňuje téměř celou buňku (Bessis, 1973). U velkých lymfocytů je cytoplazma rozložena kolem jádra v podobě prstence (Schalm aj., 1971). Neobsahuje žádné tukové vakuoly (McDonald a Anderson, 1981). Velikost lymfocytů je 7 až 12 μm (Lee aj., 1969), malé lymfocyty mají rozměr 5 až 7 μm a velké lymfocyty 12 až 15 μm (McDonald a Anderson, 1981).

Lymfocyty jsou zahrnovány pod pojem nefagocytující buňky mléčné žlázy. Jejich populace v mléce se skládá z B a T buněk a tyto typy hrají důležitou roli v humorální a buňkami zprostředkované imunitě (Paape aj., 1991a). V mléce neinfikované mléčné žlázy zahrnují B lymfocyty 20 % lymfocytární populace a T lymfocyty 47 % (Concha, 1986). Toto procento se

	Lymfocyty B ⁴	Lymfocyty T ⁵	Nezařaditelné ⁶
Periferní krev ¹	21,2	66,4	9,4
Zaprahle žlázy ²	2,8	88,1	5,4
Kolostrum ³	3,5	89,0	15,1

¹peripheral blood, ²non-lactating mammary glands, ³colostrum, ⁴B lymphocytes, ⁵T lymphocytes, ⁶indeterminable

ještě zvyšuje ve prospěch T lymfocytů až na 85 % u mléčné žlázy v involuci (Wilson aj., 1986; Duhamel aj., 1987).

2.4. Eozinofilní granulocyty

Byly popsány jako jeden z druhů somatických buněk mléka skotu, který se vyskytuje velmi sporadicky (Zlotnik, 1947; Duitschaeffer a Leggat, 1967; Schalm aj., 1971; Wardley aj., 1976). Derivují se stejně jako většina somatických buněk z krve a jsou typické acidofilní granulací. Buňky mohou být kulatého nebo oválného tvaru se sférickým nebo lobulárním jádrem. Cytoplazma je čistá, jasná a obsahuje množství acidofilních granulí (Schalm aj., 1971).

2.5. Epitélie

Po mnoho let se předpokládalo, že hlavním typem buněk obsažených v mléce jsou epiteliální buňky, které byly různě označovány: pseudopolymorfonukleáry, velké šupinaté buňky, kolostrální korpuskule (Zlotnik, 1947). Použitím transmisního elektronového mikroskopu se zjistilo, že představují pouze 2 % z celkového počtu somatických buněk mléka (Targowski, 1982).

Epiteliální buňky pocházejí z epitelu sekrečních acínů a dutinového systému mléčné žlázy. Vznikají odloučením při reparativních a regeneračních procesech. Nemají proto specifickou lokalizaci původu, tak jako ostatní somatické buňky (Schalm aj., 1971). Morfologické charakteristiky těchto druhů buněk pozorovaných v mléce budou svým vzhledem podobné buňkám v histologických preparátech tkání mléčné žlázy (Zlotnik, 1947; Adler a Magaki, 1951; Engel, 1953; Blackburn a Macadam, 1954; Mayer a Klein, 1961; Helminen a Ericsson, 1968a, b, c; Duitschaeffer, 1968; Schalm a Laismanis, 1968; Schalm aj., 1971; Smith a Schultz, 1977; Schultz, 1977).

2.5.1. Struktura

Epiteliální buňky mají různou velikost a nepravidelný tvar. Jádro je relativně velké, dobře viditelné, sférického nebo eliptického tvaru. Cytoplazma vytváří úzkou či širokou zónu barvicí se mírně bazofilně (Schalm aj., 1971) nebo acidofilně (McDonald a Anderson, 1981). Neobsahuje granula a je prostá tukových globulí (Schalm aj., 1971). Může mít

i zpěněný vzhled. Degenerované formy těchto buněk se dříve nazývaly pseudopolymorfni a mikropseudopolymorfni buňky (Zlotnik, 1947). Tyto buňky se mohou vyskytovat ve dvojicích i ve skupinách. Jejich cytoplazma se může slévat, čímž tyto buňky nabývají vzhled slévající se masy (Schalm et al., 1971).

Kolostrální tělíska jsou velké buňky kolem 30 až 45 μm (McDonald a Anderson, 1981) s malým jádrem a cytoplazmou naplněnou velkým množstvím malých a několika velkých tukových kapének (Schalm aj., 1971).

Dalším typem epiteliálních buněk, které se nalézají v mléce jsou tzv. velké šupinaté buňky. Mají velikost kolem 25 až 55 μm a nepravidelný tvar. V náterech mléka obarvených Leishmanovým barvivem se cytoplazma barví nazelenale a má granulovanou strukturu. Jádro je tmavě zbarveno a je velké 6 až 7 μm , sférického, eliptického nebo nepravidelného tvaru a obsahuje granulární chromatin (Schalm aj., 1971).

Schalm aj. (1971) popsali buňky, které označili jako buňky epiteliální – vakuolární. Tento typ buněk byl středně velký až obrovský. Jádro bylo velké, dobře viditelné, sférického, eliptického tvaru, nepravidelně ohraničené, podobně jako u předešlého typu bezvakuolárních epitelových buněk. Cytoplazma těchto buněk obsahovala v různém množství několik tukových globulí odlišných velikostí, jež se barvila světle až tmavě modře nebo růžově a obsahovala červenavě-růžová granula. Menší buňky měly obvykle tmavě modrou cytoplazmu s dobře viditelným jádrem a několika tukovými vakuolami. Velké buňky měly naopak světlou modrou nebo růžovou cytoplazmu, mnoho tukových globulí a nepoměrně malé jádro. Degenerované formy těchto buněk obsahovaly několik vakuol v jádře, nebo častěji bylo jádro dezintegrováno v malé, hrubé fragmenty dispergované v cytoplazmě. Mohly se objevit rovněž i buňky bezjaderné – enukleované. Dnes je známo, že tento typ buněk není epiteliálního původu, nýbrž to jsou makrofágy včetně různých forem jejich degenerace (Wardley aj., 1976; McDonald a Anderson, 1981).

2.5.2. Ultrastruktura

Ultrastrukturu epiteliálních buněk popsal Lee aj. (1980): epiteliální buňky pocházející z duktálního systému mléčné žlázy měly cytoplazmu s množstvím fibril a v mnoha případech byly tyto buňky ve shlucích 4 až 16 buněk spojených pevnými spoji. Obvykle měly krátké, zavalité mikrokilky, nepravidelně rozložené na je-

jich buněčném povrchu. Epitelie pocházející přímo z mamárního sekretorického epitelu nebyly pozorovány jako celé buňky, ale jen jako zářící fragmenty těchto buněk.

Bylo prokázáno (Savage, 1972), že adherence některých bakteriálních druhů k mukózním epitelialním buňkám je činitelem kolonizace dutiny ústní a gastrointestinálního traktu. Tato adherence je navíc prvním stadiem v patogenetice infekci (Frost, 1975). Obdobně je tomu i v dutinovém systému mléčné žlázy (Wanasinghe, 1981).

Brooker (1983) upozornil, že neseekretorické epitelialní buňky, pokrývající žlázy a strukový mlékojem a strukový kanálek mléčné žlázy, vytvářejí promínající pseudopodia, pomocí kterých jsou schopny fagocytovat kazeinové micely a mléčný tuk. Proto tyto buňky označují Paape aj. (1991a) jako neprofesionální fagocyty mléčné žlázy skotu. Tento fagocytární potenciál by mohl hrát parciální roli v protekci mléčné žlázy před patogenními bakteriemi (Brooker, 1983).

2.6. Erythrocyty

V mléčném sedimentu i v kolostru můžeme pozorovat i erythrocyty, které se barví stejně jako v krevním nátěru, mohou být mírně deformovány a nacházejí se jednotlivě nebo ve shlucích (Zlotnik, 1947; Mayer a Klein, 1961; Duitschaeffer a Leggat, 1967; Schalm aj., 1971; Wardley aj., 1976).

3. PATOMORFOLOGIE SOMATICKÝCH BUNĚK

V posledních desetiletích se přesouvá experimentální zájem z morfologických charakteristik somatických buněk na studium procesu fagocytózy (Mackie aj., 1982; Talstad, 1983; Craven a Anderson, 1984; Dulin aj., 1984; Mullan aj., 1985; Hirsch, 1985; Bassalik-Chabielska aj., 1988; Dulin aj., 1988; Niemialowski et al., 1988; Sandgren aj., 1991; Hu aj., 1995; Grant a Finch, 1997). Předmětem studia je i ovlivnění procesu fagocytózy u polymorfonukleárních leukocytů a makrofágů mléčné žlázy skotu (Guidry aj., 1980; Reinitz aj., 1982; Ziv aj., 1983; Miller aj., 1985; Nickerson aj., 1985, 1986; Targowski a Klucinski, 1985; Targowski a Niemialowski, 1986; Saad, 1987; Paape a Miller, 1988; Smuda, 1989; Lintner a Eberhart, 1990a, b; Paape aj., 1990; Paape aj., 1991a, b; Rainard, 1990; Woldehiwet a Rowan, 1990; Zeconi aj., 1994; Almeida a Oliver, 1995; Concha aj., 1995). V těchto studiích se můžeme setkat s popisem normální ultrastruktury, a zároveň s popisem jednotlivých forem degenerativních změn či abnormalit fagocytujících buněk tak, jak je uvádějí dále Nickerson aj. (1985, 1986), Lintner a Eberhart (1990a, b) a Paape aj. (1990):

3.1. Abnormální polymorfonukleární leukocyty

- Alterovaný typ je charakteristický tím, že buňka nabývá sférický tvar a ztrácí pseudopodie. Laloky jádra vykazují mírný otok, cytoplazmatické granule nabývají sférický tvar.
- Oteklý typ vykazuje navíc otok buňky a kompletní ztrátu pseudopodií. Buňky udržují sférický tvar. Laloky jádra a cytoplazmatické granule mají elektrotonově nižší densitu a vykazují přítomnost prázdných vakuol.
- Lýzovaný typ charakterizuje počínající cytolyza, cytoplazmatická degenerace a extruze buněčných komponent.

3.2. Abnormální makrofágy

Mají typické kulaté jádro obsahující elektronově prozařující chromatin. Lze zaznamenat přítomnost až několika cytoplazmatických vakuol, z nichž některé mají vzhled prázdných objektů. Dochází k úplné ztrátě pseudopodií. Proces degenerace pokračuje karyolýzou a končí totální lýzou těchto buněk.

4. ZÁVĚR

Do sedmdesátých let byla pozornost autorů zaměřena na morfolologii profesionálních fagocytů v optickém a elektronoptickém obrazu. V osmdesátých letech se přenáší pozornost autorů k detailnímu studiu vlastního procesu fagocytózy, zejména pak k faktorům limitujícím baktericidní funkci fagocytů. Těžiště experimentálního zájmu v devadesátých letech leží v oblasti studia modelování fagocytární funkce. Zvláštní pozornost je věnována těmto procesům ve fagocytech mléčné žlázy, zejména skotu.

Toto review prezentujeme jako východisko našeho aktuálního experimentálního zájmu cíleného k poznání raných znaků rezistence mléčné žlázy vůči bakteriální infekci.

5. LITERATURA

- ADLER, H. E. – MAGAKI, H. (1951): Cell types present in milk of cows in a chronic staphylococcal mastitis herd. *Vet. Med. US.*, 46, 89–92.
- AKERS, R. M. – THOMPSON, W. (1987): Effect of induced leucocyte migration on mammary cell morphology and milk biosynthesis. *J. Dairy Sci.*, 70, 1685–1695.
- ALMEIDA, R. A. – OLIVER, S. P. (1995): Phagocytosis of *Streptococcus uberis* by bovine mammary macrophages: opsonizing effect of bovine antiserum. *Zntbl. Vet.-Med. B.*, 42, 331–337.
- ANDERSON, M. – BROOKER, B. E. – ANDREWS, A. T. – ALICHANIDIS, E. (1975): Membrane material in bovine skim-milk from udder quarters infused with endotoxin and pathogenic organisms. *J. Dairy Res.*, 25, 401–417.

- BAINTON, D. F. – ULLYOT, J. L. – FARQUHAR, M. G. (1971): The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. Origin and content of azurophil and specific granules. *J. Exp. Med.*, **134**, 907–921.
- BASSALIK-CHABIELSKA, L. – SMUDA, P. – ZIABA, G. – KOSTRZYŃSKI, S. (1988): Phagocytosis by somatic cells from dry cow secretion. *Acta Microbiol. Pol.*, **37**, 73–82.
- BESSIS, M. (1973): *Living Blood Cell and Their Ultrastructure*. New York, Springer-Verlag. 767 pp.
- BLACKBURN, P. S. (1955): A comparison of the diagnostic value of the total and differential cell counts of bovine milk. *J. Dairy Res.*, **22**, 37–42.
- BLACKBURN, P. S. (1966): The variation in the cell count of cow's milk throughout lactation and from one lactation to the next. *J. Dairy Res.*, **33**, 193–198.
- BLACKBURN, P. S. – MACADAM, I. (1954): The cells in bovine milk. *J. Dairy Res.*, **21**, 31–36.
- BOSCHLER, P. N. – NIELSEN, N. R. – SLAUSON, D. O. (1994): Transendothelial migration of neonatal and adult bovine neutrophils *in vitro*. *J. Leukocyte Biol.*, **55**, 43–49.
- BROOKER, B. E. (1983): Pseudopod formation and phagocytosis of milk components by epithelial cells of bovine mammary gland. *Cell Tissue Res.*, **229**, 639–650.
- BROIDE, D. H. (1987): Buňky zánětu. s. 130–140. In: STITES, D. P. – TERR, A. I.: *Základní a klinická imunologie*. Praha, Victoria Publishing. 744 pp.
- CARLSON, G. P. – KANEKO, J. J. (1975): Intravascular granulocyte kinetics in developing calves. *Am. J. Vet. Res.*, **15**, 421–425.
- CONCHA, C. (1986): Cells types and their immunological functions in bovine mammary tissues and secretions. *Nord Vet.-Med.*, **38**, 257–272.
- CONCHA, C. – HOLMBERG, O. – ÅSTRÖM, G. (1984): Cells found in non-infected and staphylococcus-infected bovine mammary quarters and their ability to phagocytosis fluorescent microspheres. *J. Vet. Med. B.*, **33**, 371–378.
- CONCHA, C. – COORAY, R. – HOLMBERG, O. (1995): Ginseng-enhanced oxidative and phagocytic activities of polymorphonuclear leukocytes from bovine peripheral blood and stripping milk. *Vet. Res.*, **26**, 155–161.
- CRAVEN, A. – ANDERSON, J. C. (1984): Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine mammary gland macrophages and intracellular protection from antibiotic action *in vitro* and *in vivo*. *J. Dairy Res.*, **51**, 513–523.
- CULLEN, G. A. (1966): Cells in milk. *Vet. Bull.*, **36**, 337–346.
- DESIDERIO, J. V. – CAMPBELL, S. G. (1980): Bovine mammary gland macrophages: isolation, morphologic features, and cytoplasmic immunoglobulins. *Am. J. Vet. Res.*, **41**, 1595–1599.
- DONNÉ, A. (1838): From: TURNER, C. W. (1952): *The Mammary Gland*. Vol. I. The anatomy of the udder of cattle and domestic animals. Lucas Brothers, Columbia, Missouri. 110 pp.
- DUHAMEL, G. E. – BERNECO, D. – DAVIS, W. C. – OSBURN, B. I. (1987): Distribution of T and B lymphocytes in mammary dry secretions, colostrum and blood of adult dairy cattle. *Vet. Immunol. Immunop.*, **14**, 101–121.
- DUITSCHAEVER, C. L. (1968): The use of the Namarski interference system in microscopic studies of somatic cells in bovine milk and other body fluids. *Mikroskopie*, **23**, 345–347.
- DUITSCHAEVER, C. L. – LEGGAT, A. G. (1967): Cells in bovine milk. Differential staining in suspension: Collecting, counting and examining on millipore membrane. *Stain Technol.*, **42**, 183–194.
- DULIN, A. M. – PAAPE, M. J. – WEINLAND, B. T. (1984): Determination of phagocytosis of 32P-labeled *Staphylococcus aureus* by bovine polymorphonuclear leukocytes. *Am. J. Vet. Res.*, **45**, 768–789.
- DULIN, A. M. – PAAPE, M. J. – NICKERSON, S. C. (1988): Comparison of phagocytosis and chemiluminescence by blood and mammary gland neutrophils from multiparous and nulliparous cows. *Am. J. Vet. Res.*, **49**, 172–177.
- ENGEL, S. (1953): An investigation of the origin of the colostrum cells. *J. Anat.*, **87**, 362–366.
- FROST, A. J. (1975): Selective adhesion of microorganisms to the ductular epithelium of the bovine mammary gland. *Infect. Immun.*, **2**, 1154–1156.
- GENNARO, R. – DEWALD, B. – HORISBERGER, U. – GUBLER, H. U. – BAGGIOLINI, M. (1980): A novel type of cytoplasmic granule in bovine neutrophils. *J. Cell Biol.*, **96**, 1651–1661.
- GRANT, R. G. – FINCH, J. M. (1997): Phagocytosis of *Streptococcus uberis* by bovine mammary gland macrophages. *Res. Vet. Sci.*, **62**, 74–78.
- GIESECKE, W. H. – HEEVER, L. W., van den (1967): The diagnosis of mastitis by direct and indirect cytological methods. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, **38**, 16–21.
- GUIDRY, A. J. – PEARSON, R. E. – PAAPE, M. J. – WILLIAMS, W. F. (1980): Relationship among leukocyte phagocytosis, milk immunoglobulins, and susceptibility to intramammary infection. *Am. J. Vet. Res.*, **41**, 997–1001.
- HADWEN, S. – GWALKIN, R. (1939): The detection of abnormal cow's milk by microscopic methods. *Can. Vet. J. Res.*, **17**, 225–244.
- HARMON, R. J. – HEALD, C. W. (1982): The migration of polymorphonuclear leukocytes into the bovine mammary gland during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Am. J. Vet. Res.*, **43**, 992–998.
- HELMINEN, H. J. – ERICSSON, J. L. E. (1968a): Studies on mammary gland involution. I. On the structure of the lacting mammary gland. *J. Ultras. Res.*, **25**, 193–213.
- HELMINEN, H. J. – ERICSSON, J. L. E. (1968b): Studies on mammary gland involution. II. Ultrastructural evidence for auto- and heterophagocytosis. *J. Ultras. Res.*, **25**, 214–227.
- HELMINEN, H. J. – ERICSSON, J. L. E. (1968c): Studies on mammary gland involution. III. Alterations outside auto- and heterophagocytic pathways for cytoplasmic degradation. *J. Ultras. Res.*, **25**, 229–239.
- HIRSCH, H. P. (1985): Zur *in vitro*-Phagozytose der polymorphkernigen Leukozyten des Eutersekrets vor und nach dem Trockenstellen der Kühe. *Arch. Exper. Vet.-Med.*, **41**, 7–11.
- HOFFSTEIN, S. T. – FRIEDMAN, R. S. – WEISSMAN, G. (1982): Degranulation, membrane addition, and shape change during chemotactic factor-induced aggregation of human neutrophils. *J. Cell Biol.*, **95**, 234–241.

- HOLMQUIST, D. G. – PAPANICOLAOU, G. N. (1956): The exfoliative cytology of the mammary gland during pregnancy and lactation. N.Y. Acad. Sci., 63, 1422–1435.
- HU, S. – CONCHA, C. – COORAY, R. – HOLMBERG, O. (1995): Ginseng-enhanced oxidative and phagocytic activities of polymorphonuclear leukocytes from bovine peripheral blood and stripping milk. Vet. Res., 26, 155–161.
- HUYNH, H. T. – ROBITAILLE, G. – TURNET, J. D. (1991): Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAT-C): an *in vitro* model for bovine lactation. Exp. Cell Res., 197, 191–199.
- JENSEN, D. L. – EBERHART, R. J. (1975): Macrophages in bovine milk. Am. J. Vet. Res., 36, 619–624.
- JENSEN, D. L. – EBERHART, R. J. (1981): Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. Am. J. Vet. Res., 42, 743–747.
- KEHRLI, M. C. – SHUSTER, D. E. (1994): Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. J. Dairy Sci., 77, 619–627.
- LEE, C. S. – McDOWELL, G. H. – LASCELLES, A. K. (1969): The importance of macrophages in the removal of fat from the involuting mammary gland. Res. Vet. Sci., 10, 34–38.
- LEE, C. S. – WOODING, F. B. P. – KEMP, P. (1980): Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows. J. Dairy Res., 47, 39–50.
- LIN, Y. – XIA, L. – TURNER, J. D. – ZHAO, X. (1995): Morphologic observation of neutrophil diapedesis across bovine mammary gland epithelium *in vitro*. Am. J. Vet. Res., 56, 203–207.
- LIN, Y. – CAI, J. – TURNER, J. D. – ZHAO, X. (1996): Quantification of bovine neutrophil migration across mammary epithelium *in vitro*. Can. J. Vet. Res., 60, 145–149.
- LINTNER, S. – EBERHART, R. J. (1990a): Effect of bovine mammary secretion during the early nonlactating period and antibiotics on polymorphonuclear neutrophil function and morphology. Am. J. Vet. Res., 51, 524–532.
- LINTNER, S. – EBERHART, R. J. (1990b): Effect of antibiotics on phagocyte recruitment, function, and morphology in the bovine mammary gland during the early nonlactating period. Am. J. Vet. Res., 51, 533–542.
- MacDONALD, E. A. – XIA, L. – MONARDES, H. – TURNER, J. D. (1994): Neutrophil function *in vitro*: diapedesis and phagocytosis. J. Dairy Sci., 77, 628–638.
- MACKIE, D. P. – PEARSON, G. R. – CURRAN, W. L. – POLLOCK, D. A. – LOGAN, E. F. (1982): Electron microscopic visualisation of the *in vitro* phagocytosis of group B streptococci by bovine polymorphonuclear leukocytes. Res. Vet. Sci., 33, 333–337.
- MALECH, H. L. – ROOT, L. K. – GALLIN, J. I. (1977): Structural analysis of human neutrophil migration. J. Cell Biol., 75, 666–693.
- MAYER, G. – KLEIN, M. (1961): Histology and cytology of the mammary gland. pp. 47–116. In: KON, S. K. – COWIE, A. T. (ed.): Milk: The Mammary Gland and its Secretion. Vol. I. New York and London, Academic Press. 515 pp.
- McDONALD, J. S. – ANDERSON, A. J. (1981): Total and differential somatic cell counts in secretions from noninfected bovine mammary glands: the peripartum period. Am. J. Vet. Res., 42, 1366–1368.
- MIELKE, H. – KOBLLENZ, CH. (1981): Herkunft und Verhalten der Makrophagen der Milch eutergesunder und euterkranker Kühe. Arch. Exper. Vet.-Med., 35, 1–18.
- MILLER, R. H. – PAAPE, M. J. – DULIN, A. M. – SCHULTZE, W. D. – WEINLAND, B. T. – PEARSON, R. E. (1985): Factors affecting ability of skim milk to support phagocytosis by bovine polymorphonuclear leukocytes. J. Dairy Sci., 68, 3087–3094.
- MULLAN, N. A. – CARTER, E. A. – NGUYEN, K. A. (1985): Phagocytic and bactericidal properties of bovine macrophages from non-lactating mammary glands. Res. Vet. Sci., 38, 160–166.
- NAIDU, T. G. – NEWBOULD, F. H. S. (1973): Glycogen in leukocytes from bovine blood and milk. Can. J. comp. Med., 37, 44–55.
- NICKERSON, S. C. – PAAPE, M. J. – DULIN, A. M. (1985): Effect of antibiotics and vehicles on bovine mammary polymorphonuclear leukocyte morphologic features, viability, and phagocytic activity *in vitro*. Am. J. Vet. Res., 46, 2259–2265.
- NICKERSON, S. C. – PAAPE, M. J. – HARMON, R. J. – ZIV, G. (1986): Mammary leukocyte response to drug therapy. J. Dairy Sci., 69, 1733–1742.
- NICKERSON, S. C. – PANKEY, J. W. (1984): Neutrophil migration through teat and tissues of bovine mammary quarters experimentally challenged with *Staphylococcus aureus*. J. Dairy Sci., 67, 826–834.
- NIEMIALTOWSKI, M. – NONNECKE, B. J. – TARGOWSKI, S. P. (1988): Phagocytic activity of milk leukocytes during chronic staphylococcal mastitis. J. Dairy Sci., 71, 780–787.
- OLSON, D. P. (1990): *In vitro* migration responses of neutrophils from cows and calves. Am. J. Vet. Res., 51, 973–977.
- OUTTERIDGE, P. M. – LASCELLES, A. K. (1966): The cellular and immune response in milk and regional lymph during experimental mastitis. Res. Vet. Sci., 7, 360–367.
- OUTTERIDGE, P. M. – LEE, C. S. (1981): Cellular immunity of the mammary gland with particular reference to T, B lymphocytes and macrophages. In: BUTLER, J. E. (ed.): The Ruminant Immune System. Adv. Exp. Med. Biol., 137, 513–534.
- PAAPE, M. J. – HAFS, H. D. – SNYDER, W. W. (1963): Variation of estimated numbers of milk somatic cells stained with Wright's stain or pyronin γ-methyl green stain. J. Dairy Sci., 46, 1211–1216.
- PAAPE, M. J. – WERGIN, W. P. (1977): The leukocyte as a defense mechanism. J. Am. vet. med. Assoc., 170, 1214–1223.
- PAAPE, M. J. – WERGIN, W. P. – GUINDRY, A. J. – SCHULTZE, W. D. (1981): Phagocytic defense of the ruminant mammary gland. In: BUTLER, J. E. (ed.): The Ruminant Immune System. Adv. exp. Med. Biol., 137, 555–578.
- PAAPE, M. J. – MILLER, R. H. (1988): Sources of variation introduced into a phagocytosis assay as a result of the isolation of neutrophils from bovine blood. Am. J. Vet. Res., 49, 1210–1213.

- PAAPE, M. J. – NICKERSON, S. C. – ZIV, G. (1990): *In vivo* effect of chloramphenicol, tetracycline, and gentamycin on bovine neutrophil function and morphologic features. *Am. J. Vet. Res.*, **51**, 1055–1061.
- PAAPE, M. J. – GUINDRY, A. J. – JAIN, N. C. – MILLER, R. H. (1991a): Leukocytic defense mechanisms in the udder. *Flem. Vet. J.*, **62**, 95–109.
- PAAPE, M. J. – MILLER, R. H. – ZIV, G. (1991b): Pharmacologic enhancement or suppression of phagocytosis by bovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.*, **52**, 363–366.
- RAINARD, P. (1990): Effect of milk or colostrum on phagocytosis of glass- or plastic-adherent *Streptococcus agalactiae* by bovine granulocytes. *Vet. Immunol. Immunop.*, **26**, 203–208.
- REINITZ, D. M. – PAAPE, M. J. – MATHER, I. H. (1982): Effect of phagocytosed fat and casein on the intraphagosomal pH in bovine polymorphonuclear leukocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **170**, 287–285.
- SAAD, A. M. (1987): Flow cytometric measurement of bovine milk neutrophil phagocytosis. *Acta Vet. Scand.*, **28**, 333–342.
- SANDGREN, C. H. – NORDLING, K. – BJORK, I. (1991): Isolation and phagocytic properties of neutrophils and other phagocytes from nonmastitic bovine milk. *J. Dairy Sci.*, **74**, 2965–2975.
- SAVAGE, D. C. (1972): Survival of mucosal epithelia penetration and growth in tissues of pathogenic bacteria. *Sym. Soc. Gen. Microbiol.*, **22**, 25–28.
- SCHALM, O. W. – LASMANIS, J. (1968): The leukocytes: Origin and function in mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **153**, 1688–1694.
- SCHALM, O. W. – CARROL, E. J. – JAIN, N. C. (1971): Number and types of somatic cells in normal and mastitis milk. p. 94–123. In: SCHALM, O. W. – CARROL, E. J. – JAIN, N. C.: *Bovine mastitis*. Philadelphia. 360 pp.
- SCHULTZ, L. H. (1977): Somatic cells in milk. Physiological aspects and relationship to amount and composition of milk. *J. Food Protect.*, **40**, 125–131.
- SMITH, J. W. – SCHULTZ, R. D. (1977): Mitogen and antigen responsive milk lymphocytes. *Cell Immunol.*, **29**, 165–173.
- SMITS, E. – CIFRIAN, E. – GUIDRY, A. J. – RAINARD, P. – BURVENICH, C. – PAAPE, M. J. (1996): Cell culture for studying bovine neutrophil diapedesis. *J. Dairy Sci.*, **79**, 1353–1360.
- SMUDA, P. H. (1989): Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by somatic cells in dry cow secretion of mammary gland. *Acta Microbiol. Pol.*, **38**, 271–283.
- STOSSEL, T. P. – HARTWIG, J. H. – YIN, H. L. – SOUTHWICK, F. S. – ZANER, K. S. (1984): The motor of leukocytes. *Fed. Proc.*, **43**, 2760–2763.
- TALSTAD, I. – DALEN, H. – LEHMANN, V. (1983): De-granulation and enzyme release during phagocytosis of inert particles and of bacteria by polymorphonuclear neutrophil granulocytes. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, **91**, 403–411.
- TARGOWSKI, S. P. (1982): Role of immune factors in protection of mammary gland. *J. Dairy Sci.*, **66**, 1781–1789.
- TARGOWSKI, S. P. – KLUCINSKI, W. (1985): Effect of immune complexes from mastitic milk on blocking of Fc receptors and phagocytosis. *Infect. Immun.*, **47**, 484–488.
- TARGOWSKI, S. P. – NIEMIALTOWSKI, M. (1986): Inhibition of lacteal leukocyte phagocytosis by colostrum, non-lactating secretion, and mastitis milk. *Am. J. Vet. Res.*, **47**, 1940–1945.
- WANASINGHE, D. D. (1981): *In vitro* adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary gland epithelial cells. *Acta Vet. Scand.*, **22**, 99–108.
- WARDLEY, R. C. – ROUSE, B. T. – BABIUK, L. A. (1976): The mammary gland of the ox: a convenient source for the repeated collection of neutrophils and macrophages. *J. Reticuloendothel. Soc.*, **19**, 29–36.
- WILSON, R. A. – LINN, J. A. – EBERHART, R. J. (1986): A study of bovine T-cell subsets in the blood and mammary secretions during the dry period. *Vet. Immunol. Immunop.*, **13**, 151–164.
- WOLDEHIWET, Z. – ROWAN, T. G. (1990): Some observations on the effect of age of calves on the phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by polymorphonuclear leukocytes. *Brit. Vet. J.*, **146**, 165–170.
- ZECCONI, A. – BRONZO, V. – PICCININI, R. – SPREAFICO, G. – RUFFO, G. (1994): Phagocytic activity of bovine polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J. Dairy Res.*, **61**, 271–279.
- ZEIDLER, H. – TOLLE, A. – HEESCHEN, W. (1968): Importance of cytological and bacteriological findings in mastitis diagnosis. *Milchwissenschaft*, **23**, 674–681.
- ZIV, G. – PAAPE, M. J. – DULIN, A. M. (1983): Influence of antibiotics and intramammary antibiotic products on phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine leukocytes. *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 385–388.
- ZLOTNIK, I. (1947): Types of cells present in cow's milk. *J. Comp. Pathol. Ther.*, **57**, 196–207.

Received: 98–05–07

Accepted after corrections: 98–05–19

Kontaktní adresa:

MVDr. Dušan Ryšánek, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 00 Brno, Česká republika
Tel. +420 5 41 32 12 41, fax +420 5 41 21 12 29, e-mail: „udury“<olma@vuvet.anet.cz>

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

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

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

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

Název práce (titul) nemá přesáhnout 85 úhůů 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 práci 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 PSČ, 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 given 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

Raszyk J., Gajdůšková V., Ulrich R., Jarošová A., Nápravník A., Salava J., Palác J.: Evaluation of the occurrence of some harmful pollutants on cattle farms.....	233
Šlosárková S., Chroust K., Skřivánek M.: Effects of toltrazuril and monensin in kids naturally infected with coccidiosis.....	239
Matouch O., Jaroš J., Vrzal V.: Oral vaccination of fox cubs against rabies in the vicinity of dens..	245
REVIEW ARTICLE	
Pospíšil L.: <i>Chlamydia pecorum</i>	249
Sládek Z., Ryšánek D.: Morphologic and functional characteristics of bovine somatic cells in milk....	255

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

OBSAH

Raszyk J., Gajdůšková V., Ulrich R., Jarošová A., Nápravník A., Salava J., Palác J.: Zhodnocení výskytu vybraných rizikových polutantů na farmách skotu.....	233
Šlosárková S., Chroust K., Skřivánek M.: Ovlivnění kokcidiózy kůzlat aplikací toltrazurilu a monensinu.....	239
Matouch O., Jaroš J., Vrzal V.: Orální vakcinace lišcat proti vzteklině u nor	245
PŘEHLED	
Pospíšil L.: <i>Chlamydia pecorum</i>	249
Sládek Z., Ryšánek D.: Morfologická a funkční charakteristika somatických buněk mléka skotu	255