

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

11

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., Reinfelden, 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 Herzog, CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

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

Prof. MUDr. Drahomír Hošek, DrSc., Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

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

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

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

Prof. MUDr. M. V. Nermut, PhD., DSc. (h. c.), National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom

Prof. MUDr. MVDr. h. c. Leopold Pospíšil, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Prof. RNDr. Václav Suchý, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Bohumil Ševčík, DrSc., BIOPHARM – Research Institute of Biopharmacy and Veterinary Drugs, a. s., Jilové u Prahy, Czech Republic

Prof. MVDr. Zdeněk Věžník, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Editor-in-Chief – Vedoucí redaktorka

Ing. Zdeňka Radošová

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

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

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

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

Acceptance of manuscripts: Three copies of manuscript should be addressed to: Ing. Zdeňka Radošová, editor-in-chief, Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz. Applications for detailed instructions for authors should be sent to the editorial office.

Subscription information: Subscription orders can be entered only by calendar year (January–December) and should be sent to: Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Subscription price for 1998 is 145 USD (Europe), 152 USD (overseas).

OCCURRENCE OF BOVINE COXIELLOSIS IN THE DISTRICT OF BARDEJOV, EASTERN SLOVAKIA*

VÝSKYT KOXIELÓZY HOVÄDZIEHO DOBYTKA V OKRESE BARDEJOV NA VÝCHODNOM SLOVENSKU

J. Řeháček¹, E. Kocianová¹, E. Kováčová¹, B. Kapitančík², A. Jurčina², O. Nad², P. Ličko³

¹*Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic*

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

³*District Office, Department of State Veterinary Care, Bardejov, Slovak Republic*

ABSTRACT: In the years 1996 to 1997 the occurrence of coxiellosis was studied in the district of Bardejov. The case of abortion and two cases of retention of secundines in dairy cows in the Agricultural Co-operative (RD) Zborov in April 1996 and agglutination antibodies against *Coxiella burnetii* in 33% of the herd (328 cows) of which these animals originated, served as a basis for mass inoculation of cattle by the vaccine Bodibion a.u.v. in May 1996. Cases of Q fever in humans were not recorded at all. Neither antibodies against *C. burnetii* were found in nine tested employees of the central farm Zborov. There were no clinical manifestations of coxiellosis in studied animals, the level of antibodies against *C. burnetii* in 10 long-time studied animals which had high levels of antibodies in the first sampling was gradually falling and even antibodies disappeared in some animals towards the end of studied period after 18 months (October 1997). The presence of coxiella in milk in three of eight tested dairy cows observed before inoculation and five months after it was not confirmed in further examinations. The causative agent was not found in small mammals (369 tested), neither in ectoparasites (82 tested ticks, 663 mites, 57 fleas and 73 lice). The possible source of infection of cattle in the studied rearing is discussed in the contribution.

coxiellosis; *Coxiella burnetii*; cattle; Agricultural Co-operative Zborov

ABSTRAKT: V rokoch 1996 až 1997 bol sledovaný výskyt koxielózy v okrese Bardejov. Prípád zmetania a dva prípady retencie sekundín u dojnic v Roľníckom družstve (RD) Zborov v apríli 1996 a zistené aglutinačné protilátky proti *Coxiella burnetii* v 33 % stáda (328 kráv), z ktorého tieto zvieratá pochádzali, boli podkladom pre hromadné očkovanie hovädzieho dobytku vakcínou Bodibion a.u.v. v máji 1996. Prípady Q horúčky u ľudí tu zaznamenané neboli. U deviatich testovaných zamestnancoch kmeňovej farmy Zborov neboli zistené ani protilátky proti *C. burnetii*. Ku klinickým prejavom koxielózy u sledovaných zvierat nedošlo, hladina protilátok proti *C. burnetii* u dlhodobo sledovaných 10 zvierat, ktoré mali v prvom odbere vysoké hladiny protilátok, sa s postupom času znižovala a u niektorých jedincov ku koncu sledovaného obdobia po osemnástich mesiacoch (október 1997) protilátky vymizli. Prítomnosť koxiely v mlieku u troch z ôsmich testovaných dojnic, pozorovaná pred vakcináciou a päť mesiacov po vakcinácii, nebola pri ďalších vyšetrovaníach potvrdená. Pôvodca nebol zistený v drobných cicavcoch (369 testovaných) a ani v ich ektoparazitoch (testovaných 82 kliešťoch, 663 roztočov, 57 blch a 73 vší). V práci je diskutovaný možný zdroj infekcie hovädzieho dobytku v sledovanom chove.

koxielóza; *Coxiella burnetii*; hovädzí dobytok; RD Zborov

ÚVOD

Podľa Smerníc veterinárnej starostlivosti Slovenskej republiky – 1. diel (1990) každý prípad zmetania domácich zvierat podlieha hláseniu a zisťuje sa jeho pôvod. V apríli 1996 jeden prípad zmetania, dva prípady retencie sekundín a prítomnosť aglutinačných protilátok proti *C. burnetii* v 33 % hovädzieho dobytku v RD Zborov viedlo k hromadnému naočkovaniu tých-

to zvierat v kmeňovej farme družstva Zborov a troch pridružených fariem (Becherov, Chmelová a Stebník) vakcínou Bodibion a.u.v. proti Q horúčke. Vakcináciu zorganizoval a uskutočnil Okresný úrad – Odbor štátnej veterinárnej starostlivosti, Bardejov v máji 1996.

Nakoľko tu však stále hrozilo nebezpečenstvo šírenia koxiely na iné RD, ako aj do voľnej prírody, snažili sme sa v roku 1996 až 1997 nazhromaždiť čo najviac údajov, ktoré by mohli viesť k objasneniu aktivácie

* Partially supported by the Scientific Grant Agency – VEGA (Grant No. 2/1251/1994).

koxielózy v danej oblasti. Zisťovali sme zdravotný stav zamestnancov všetkých fariem RD Zborov a séropozitivitu proti *C. burnetii* u vybraných pracovníkov farmy Zborov. Ďalej sme sledovali na všetkých farmách vylučovanie pôvodu mliekom u vybraných dojníc a protilátky proti *C. burnetii* u týchto zvierat. Prenikanie koxiely do voľnej prírody, ktoré by mohlo viesť ku vzniku prírodného ohniska nákazy, sme sledovali detekciou patogéna u hlodavcov a ich ektoparazitov na pastvinách všetkých menovaných fariem a blízkej farme Varádka, s ktorou je družstvo v úzkom pracovnom kontakte.

MATERIÁL A METÓDY

Charakteristika skúmanej oblasti

Skúmaná oblasť sa nachádza v severovýchodnom cípe Slovenska, v Prešovskom kraji, v okrese Bardejov, spadá do orografického celku Busov. Krajina má typický podhorský ráz, nadmorská výška oblasti sa pohybuje medzi 300 až 500 m n.m. a tomu zodpovedá aj chladnejšia klíma a druhovo chudobnejšia vegetácia. Skúmaný areál RD Zborov z prevažnej časti zaberajú pastviny pre hovädzí dobytok. Tieto zasahujú všade do okrajov listnatých lesov, v ktorých prevláda hrab a lieska. Husté nížinné poschodie okrajov lesov poskytuje vhodné podmienky pre drobné hlodavce.

RD Zborov sa skladá z kmeňovej farmy v Zborove a troch satelitných fariem (Stebník, Chmelová, Bechero). Okrem limitovanej produkcie niektorých poľnohospodárskych plodín (pšenica, zemiaky, krmoviny) je RD orientované na produkciu mlieka. Má otvorený obrat stáda hovädzieho dobytku, presuny zvierat medzi farmami sú pravidelné. Všetky zvieratá pochádzajú len z vlastného chovu, z iných areálov Slovenska ani zo zahraničia sa stavy nedopĺňajú.

Farma Varádka nie je s vyššie spomenutými farmami administratívne spojená, dopĺňa si však od nich stavy zvierat.

Vyšetrovanie ľudí a hovädzieho dobytku na protilátky proti *C. burnetii*

Na protilátky proti *C. burnetii* sme vyšetrovali jednorázovo len vybraných zamestnancov kmeňovej farmy. Dôraz sme kládli na testovanie protilátok v sérach hovädzieho dobytku, ktoré pochádzali z kmeňovej a satelitných fariem. Vyšetřili sme aj séra šiestich kusov dobytku od šiestich súkromníkov zo Zborova.

Vyšetrovanie mlieka dojníc na infekciu *C. burnetii*

Pre sledovanie vylučovania koxiely v mlieku sme zvolili zvieratá, ktoré mali vysoké titry protilátok proti *C. burnetii*. U zvierat, kde sme prítomnosť patogéna v mlieku dokázali, sme vylučovanie sledovali v opakovaní odberom. Vzorky mlieka boli vyšetřené od

ôsmich dojníc z farmy Zborov pred očkovaním v máji 1996 (z každého kusa jedna vzorka) a z tejto ako aj z ostatných pridružených fariem, aj po očkovaní proti *C. burnetii*, v októbri 1996 a 1997 (12 dojníc). Niektoré vzorky boli vyšetřené opakovane: 5 – dvakrát, 3 – trikrát.

Koncentrované mlieko sme inokulovali intraperitoneálne (i. p.) vždy do šiestich bielych neinbredných myši. U troch myši sme infekciu monitorovali priamo v náteroch zo slezín na 7. deň po injikovaní farbením podľa Gimenezá a u zostávajúcich troch myšiek protilátkovou odpoveďou na tretí týždeň po inokulácii vzoriek mlieka. Pri vyšetrovaní vzoriek mlieka odobratých pred vakcináciou sme uskutočnili aj jednu opakovanú pasáž zo slezín myši usmrtených 7. deň po inokulácii vzoriek mlieka.

Odchyt hlodavcov a ich vyšetrovanie na infekciu *C. burnetii*

Drobné cicavce sme odchytávali do živoľných pascí typu Chmela. Po ich roztriedení podľa lokalít a druhov (oddelené myšovité a hrabošovité) asi po 30 zvierat do prepravných klieťok sme ich transportovali na Virologický ústav v Bratislave. Tu, po usmrtení odberom krvi z retroorbitálneho sinusu, sme získané vzorky krvi spracovali na séra. Z cicavcov sme ďalej odobrali ektoparazity a vypitvali sleziny. Prítomnosť koxiely u hlodavcov sme zisťovali na bielych myšiach tým istým spôsobom ako pri vyšetrovaní vzoriek mlieka – sledovaním protilátkovej odpovede a priamym nálezom patogéna v slezine. Subpasáž sme však nerobili.

Odchyt kliešťov a ich vyšetrovanie na infestáciu rickettsiami

Kliešte sme odchytávali šmykaním bielej pokrývky po vegetácii. Po ich roztriedení do druhov a jednotlivých vývinových štádií sme ich otestovali na premorenie rickettsií haemocytovým testom (Ř e h á ě c k a i., 1971). Z kliešťov sme ďalej pripravovali 10% suspenzie vo fyziologickom roztoku, ktoré sme naočkovali i. p. do bielych myši, u ktorých sme prítomnosť *C. burnetii* dokazovali tým istým spôsobom ako v prípade detekcie agensu u hlodavcov.

Vyšetrovanie ektoparazitov z drobných cicavcov na premorenie s *C. burnetii*

Z ektoparazitov zozbieraných zo zvierat sme po ich determinácii pripravili skupinky po 10 až 50 jedincov. Z nich sme 10% suspenzie vo fyziologickom roztoku injikovali i. p. do bielych myši, u ktorých sme infekciu dokazovali tým istým spôsobom ako v prípade vyšetrovania odchytených kliešťov z vegetácie.

Použitie sérologické metódy

Protilátky proti *C. burnetii* v sérach ľudí, hovädzieho dobytku, divožijúcich hlodavcov a bielych myši, ktoré

I. Konfirmácia sérologického vyšetrenia 10 vybraných vzoriek hovädzieho dobytku pred vakcináciou proti *C. burnetii* v máji 1966 (titer 1 : 64 v MAR) – Confirmation of serological examination in 10 selected samples of cattle before inoculation against *C. burnetii* (titre 1 : 64 in MAR)

		1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1 024	1 : 2 048
MAR	fáza ¹ I	2	3	2	1				
	fáza II		1	2		3	2	1	1
KFR	fáza II		3	4	1				
ELISA		1 : 2 000	1 : 4 000	1 : 8 000					
		2	1	7					

MAR = metóda mikroaglutinácie – method of microagglutination
KFR = komplement fixačný test – complement-fixation test

¹phase

boli očkované suspenziami z ectoparazitov a vzorkami mlieka, sme vyšetrovali metódou mikroaglutinácie (MAR) a ELISA. V prípade konfirmácie prvého testovania protilátok u hovädzieho dobytku aj komplement fixačným testom (KFR). Všetky antigény použité v týchto testoch boli pripravené na Virologickom ústave SAV v Bratislave. V sérologických reakciách boli použité korpuskulárne antigény *C. burnetii* kmeňa Nine Mile vo fáze II (resp. I). Pre MAR sme použili antigén pripravený podľa F i s e t a a i. (1969), pre KFR antigén pripravený podľa S c h r a m e k a a i. (1972) a v ELISA teste antigén pripravený podľa O r m s b e e (1962). Základné titry sme stanovili v MAR 1 : 16, v KFR 1 : 8 a v ELISA 1 : 500.

VÝSLEDKY

Sledovanie zdravotného stavu zamestnancov RD Zborov

Zdravotný stav zamestnancov RD Zborov zisťovaný hlavne retrospektívne, pred a najmä po zmetaní u dojnice na farme Zborov, ako aj po celý čas rokov 1996 až 1997 nepreukázal, že by medzi nimi došlo k výskytu Q horúčky a protilátky proti *C. burnetii* neboli zistené ani u deviatich pracovníkoch farmy.

Sledovanie dynamiky protilátok proti *C. burnetii* u hovädzieho dobytku

Zmetanie u jednej dojnice a retencie sekundín u dvoch kráv zistené v apríli 1996 na farme Zborov podľa prítomnosti aglutinačných a komplement fixačných protilátok v titroch 1 : 32 a 1 : 8 viedlo k vyradeniu týchto zvierat z chovu. Stádo hovädzieho dobytku tejto farmy v počte 328 ks malo aglutinačné protilátky proti *C. burnetii*: 27 zvierat – 1 : 16, 23 – 1 : 32 a 12 – 1 : 64. Z 39 zvierat vyšetrených z fariem Stebník a Chmelová, štyri (10 %) mali protilátky proti *C. burnetii* v MAR v titroch 1 : 16. Sérologické vyšetrenie na farme Zborov sme zopakovali u 10 zvierat s titrami aglutinačných protilátok 1 : 64 komplement viažúcou reakciou, ELISA testom a keďže pre dobytok sú typické protilát-

ky proti *C. burnetii* vo fáze I aj v MAR s antigénom vo fáze I (tab. I).

Na základe týchto výsledkov boli v máji 1996 všetky sérologicky negatívne i pozitívne jedince hovädzieho dobytku na RD Zborov očkované proti *C. burnetii* vakcínou Bodibion, a. u. v. (Mevak, Nitra, Slovenská republika) dávkou 5 ml/ks v kmeňovej farme Zborov a po 2 ml/ks v ostávajúcich troch satelitných farmách. V máji 1997 boli tieto zvieratá revakcinované. Vakcinácia pokračovala u novonarodených teliat v roku 1996 a 1997 od veku troch mesiacov.

Prítomnosť protilátok v sérach hovädzieho dobytku sme ďalej sledovali v októbri 1996 a 1997 na všetkých farmách a v novembri 1996, vo februári a v máji 1997 na farme Stebník, ktorá sa ukázala ako najviac kontaminovaná koxielou. Získané výsledky (tab. II) ukázali, že titer protilátok postupom času klesal a u niektorých jedincov sme protilátky v októbri 1997 už ani nezaznamenali, a to aj u takých zvierat, ktoré boli v roku 1996 séropozitívne. Klinické príznaky koxielózy u sérologicky negatívnych ako aj u pozitívnych zvierat pozorované neboli. Séra šiestich kráv od súkromníkov boli bez protilátok proti *C. burnetii*.

Sledovanie vylučovania koxiely v mlieku dojníc

Zo vzoriek mlieka od ôsmich dojníc na farme Zborov testovaných pred vakcináciou v máji 1996 sme koxielu nepriamo zistili v mlieku troch dojníc: u myši očkovaných týmito vzorkami sme síce *C. burnetii* 7. deň v slezinách nepozorovali, ale následná pasáž zo slezín vyvolala u myši protilátkovú odpoveď v MAR v titroch 1 : 16 až 128. Opätovné vyšetrenie siedmich vzoriek z vyššie spomenutých dojníc v októbri 1996 nevedlo opäť k manifestácii koxiel v slezinách myši, vyústilo však znovu v tých istých troch vzorkách ako v máji 1996, vytvorením protilátok v titroch 1 : 64 až 256. Koxielu sme sa snažili ďalej preukázať v mlieku 17 séropozitívnych dojníc v októbri 1997 (farma Stebník sedem, farmy Chmelová a Zborov po päť vzoriek). Šesť vzoriek bolo opakovaných a pochádzalo zo skupiny dojníc, z ktorých sme u troch zistili koxielu pred aj po očkovaní v roku 1996. Vyšetrenie na prítomnosť proti-

Farma ¹	Zviera ²	Okt. 96	Nov. 96	Febr. 97	Máj ⁶ 97	Okt. 97	Protilátky-titre/počet zvierat ⁷
Zborov	teľatá ³	1/2/10*					MAR 128(1); ELISA (1 : 500)
	dojnice ⁴	6/8/9					MAR 16(4), 32(1), 64(1); ELISA (1 : 500)
	dojnice					3/6/6	MAR 16(3); ELISA (1 : 500)
Stebník	dojnice	7/7/10	7/7/7	7/7/7	3/6/6	3/3/9	Okt. 96-MAR 16(4), 32(2), >256(1); ELISA 1 000(3), 2 000(2), 4 000(2)
							Nov. 96-MAR 16(2), 32(2), 64(1), 128(1), >256(1) ELISA 2 000(1), 4 000(2), 8 000(4)
							Feb. 97-MAR 16(3), 64(2), 256(2) ELISA 1 000(3), 4 000(2), 8 000(2)
							Máj 97-MAR 16(1), 64(1), 256(1) ELISA 1 000(1), 2 000(1), 4 000(2), 8 000(2)
							Okt. 97-MAR 16(3) ELISA (1 : 500)
Chmelová	dojnice	8/5/10				2/2/8	Okt. 96-MAR 16(6), 32(1), 64(1) ELISA 500(2), 1 000(2), 4 000(1)
							Okt. 97-MAR 16(1), 32(1) ELISA (1 : 500)
Becherov	jalovice ⁵	0/0/10				0/0/10	negatívne ⁸

* = počet pozitívnych v MAR/počet pozitívnych v ELISA/celkový počet testovaných zvierat – number of positive in MAR/number of positive in ELISA/total number of tested animals

MAR = metóda mikroaglutinácie – method of microagglutination

¹farm, ²animal, ³calves, ⁴dairy cows, ⁵heifers, ⁶May, ⁷antibodies-titers/number of animals, ⁸negative

látok aj na manifestáciu koxiel v slezine bolo v tomto čase už negatívne.

Výšetrovanie drobných cicavcov, kliešťov a iných ektoparazitov na preorenie s *C. burnetii*

Z areálu RD Zborov a farmy Varadka sme na preorenie s *C. burnetii* celkovo vyšetrili 349 drobných hlodavcov: z farmy Becherov 73, Chmelová 56, Stebník 91, Zborov 92 a Varadka 37. Dominantným druhom bol *Apodemus flavicollis* – 165, pred *Apodemus agrarius* – 90, *Clethrionomys glareolus* – 69, *Microtus arvalis* – 23 a *Apodemus microps* – dva jedince. Všetky vyšetrovania boli negatívne.

Kliešte sme v študovanej oblasti zbierali počas troch expedícií v októbri 1996, v máji a v októbri 1997. V jesenných zberoch sme kliešte nenašli, v máji 1997 sme celkom zbierali 82 imág *Ixodes ricinus* (48 samíc a 34 samcov): v lokalite Becherov – 34, Stebník – 9 a Zborov – 39. V kliešťoch sme *C. burnetii* ani iný organizmus z triedy *Rickettsiales* nezistili.

Z celkového počtu 773 testovaných ektoparazitov zozbieraných z hlodavcov bolo 10 lariev a ným kliešťa *I. ricinus*, 57 blch, 663 roztočov, prevažne druhu *Laelaps agilis* a 73 vší. Zaparazitovaných bolo 94 % hlodavcov v máji a 51 % v októbri, pričom na jedného hostiteľa pripadlo priemerne 3,4 ektoparazitov v máji a 11,6 v októbri. Počty kliešťov boli nízke, lebo v tom-

to biotope nie sú hojné, a tiež preto, lebo mikromamália boli po odchyte tri až päť dní držané v prepravných klieťkach, počas čoho ich mohli nakŕmené larvy a nymfy kliešťov opustiť.

DISKUSIA

Prvé údaje o výskyte *C. burnetii* na východnom Slovensku uverejnil Pospíšil (1956), ktorý sledoval prítomnosť komplement viažúcich protilátok u domácich zvierat a ľudí. Hovädzi dobytok reagoval pozitívne v 9,5 %, ovce v 8,6 %, u dojčiek a krmičov séropozitívnych zvierat sa našli protilátky v 9,7 %, v kontrolnej skupine ľudí iba u 1,6 %. Na základe komplexného vyšetrovania preorenia domácich zvierat koxielou na Slovensku Gmitter (1961) ukázal, že hlavným prameňom infekcie na východnom Slovensku sú ovce.

Prvé správy o Q horúčke na severovýchodnom Slovensku sú z okresu Bardejov. Skupina 33 poľnohospodárskych pracovníkov z tohto okresu sa začiatkom apríla 1962 infikovala počas návštevy poľnohospodárskych zariadení na západnom a strednom Slovensku (Janok a i., 1964). Zakrátko vypukla epidémia Q horúčky u ošetrovateľov hovädzieho dobytku na hospodárskom dvore v Keckovciach, okres Svidník a preniesla sa na ŠM vo Svidníku (Fričová a i., 1967). V ďalších rokoch v tejto oblasti neboli zaznamenané epidémie ani

sporadické prípady Q horúčky i tým ale nevylučujeme možnú cirkuláciu *C. burnetii* v prírode alebo inaparentne v populáciách hospodárskych zvierat.

Aj keď na základe negatívneho výsledku serologického vyšetrenia na brucelózu (PA a KFR), chlamydiózu (KFR) a IBR (ELISA) a prítomnosti aglutinačných a komplex fixačných protilátok proti *C. burnetii* predpokladáme, že zmetanie a retencia sekundín u dojnic na farme Zborov boli zapríčinené práve *C. burnetii*, nemôžeme vylúčiť aj iné príčiny. Ako sa všeobecne udáva, koxiela najmä v poslednom mesiaci gravidity, aj keď sporadicky, môže vyvolať zmetanie u kráv. Ako uvádza Little (1983), kravy aj napriek veľkému množstvu koxiel v placentе, prípadne v mlieku, môžu rodiť plne vyvinuté zdravé teľatá, pričom infekcia neovplyvňuje ani hmotnosť ani laktáciu rodiacich zvierat.

Keďže sme protilátky proti *C. burnetii* metódou MAR a ELISA testom päť mesiacov po očkovaní zvierat na jednej zo štyroch sledovaných fariem (Becherov) nenašli, čo je po tomto čase u vakcinovaných zvierat normálne (Šádecký a i., 1974), domnievame sa, že protilátky zistené v ostatných farmách sú odrazom prirodzenej infekcie, a nie odpoveďou na vakcináciu. Pretože u týchto zvierat dochádzalo postupne k znižovaniu hladín protilátok a patogén sa s odstupom času už v mlieku nezistil ani nepriamo prítomnosťou protilátok, je zrejme, že ochrana pred infekciou *C. burnetii* sa uskutočnila bunkami sprostredkovanou imunitou.

V sledovanej oblasti sa fauna drobných cicavcov a ich ektoparazitov principiálne nelíši od ostatných oblastí Slovenska. Je tu však nižší výskyt čo do druhu a počtu kliešťov, čo by mohlo nepriaznivo ovplyvniť výskyt *C. burnetii* v teréne, ale pre manifestáciu Q horúčky to nemusí byť podstatné, pretože v iných lokalitách Slovenska podobného charakteru, sme prítomnosť koxiely dokázali (Řeháček a i., 1991). Ak hodnotíme výskyt kliešťov v tejto oblasti, je zrejme, že nielen jarná, ale aj jesenná vlna výskytu *I. ricinus* je tu veľmi nízka až nulová (jeseň). V porovnaní s inými lokalitami Slovenska sa tu nevyskytuje rod *Dermacentor* a *Haemaphysalis*, ktorých druhy sú v niektorých lokalitách na juhu východného Slovenska hojné.

Čo bolo zdrojom koxiellovej infekcie hovädzieho dobytky zostáva nezodpovedané. Vynára sa tu niekoľko hypotéz:

1. *C. burnetii* bola v päťdesiatych rokoch zavlečená ovcami z Rumunska do južného Poľska, okres Gorlice (Wojciechowski, 1959) hraničiacej priamo s lokalitami, kde sa v súčasnosti zaznamenali séropozitívne kusy hovädzieho dobytky. Je možné, že sa v tomto čase pozdĺž poľsko-slovenských hraníc vytvorilo prírodné ohnisko koxiely, ktoré tu roky latentne perzistuje a len zmetanie u kravy a sérologické vyšetrenie stád hov. dobytky na RD Zborov spôsobili, že bolo odkryté. Cirkulujúca koxiela v tejto oblasti mohla postupne strácať svoju virulenciu, takže už nebola schopná u domácich zvierat, ktoré tu chovajú, najmä ovce a kravy, vyvolať zjavné príznaky koxiely, ani spôsobiť ochorenie ľudí. Existencia takých oslabených kme-

ňov *C. burnetii* bola preukázaná izoláciou pôvodcu z mlieka dojnic na strednom Slovensku a v Českej republike (Kociánová a i., 1993).

2. Južne od skúmanej krajiny sa rozkladajú oblasti, v ktorých bola prítomnosť pôvodcu aj koxiely samotná už v minulosti dokázaná (Mittermayer a i., 1964; Fričová a i., 1967; Řeháček a i., 1976, 1991). Je možné, že prirodzenou cestou, prostredníctvom voľne žijúcich zvierat a ich ektoparazitov, najmä kliešťov, mohla byť do nami sledovanej lokality opätovne zanesená.

3. Koxiela mohla byť zavlečená hlavne zo Zakarpatska na Ukrajinu, keďže táto oblasť je považovaná za endemickú oblasť výskytu Q horúčky (Maksimovich a i., 1995). Okrem spôsobu zanesenia koxiely stavovcami a kliešťami, ako je uvedené v predchádzajúcom bode, môžu výhodné Slovensko kontaminovať, napr. havrany, ktoré k nám prilietavajú prezimovať z juhu Bieloruska, Ukrajiny a až stredného Povolžia (Rajský, 1986). Protilátky proti *C. burnetii* u havranov na území Slovenska dokázali Rajský (1986) a Kociánová (1988).

4. Na základe našich dlhoročných skúseností, za najčastejšiu cestu prenosu nákazy do sledovanej oblasti považujeme zavlečenie koxiely prostredníctvom infikovaných domácich zvierat (ovca, koza, hovädzí dobytok), ktoré sa z oblastí zamorených koxiellou dostávajú legálnou ale i nelegálnou cestou bez podrobenia patričnej veterinárnej kontrole do koxiellou nekontaminovaného prostredia (Literák a Řeháček, 1996). Túto posledne uvedenú možnosť, aj keď pre ňu v našom prípade nemáme priamy dôkaz, považujeme za najpravdepodobnejšiu.

Addendum

V prvom polroku 1998 sme dotazom na Okresnom úrade – Odbor veterinárnej starostlivosti v Bardejove, a tiež priamo na RD Zborov zisťovali, či na jednotlivých farmách nedochádza k ochoreniu zvierat alebo zamestnancov RD, ktoré by mohlo byť koxiellózou, resp. Q horúčkou. Odpoveď bola jednoznačne negatívna. Ďalej sme koncom apríla vyšetrili hemocytovým testom na prítomnosť *C. burnetii* 294 imag kliešťa *I. ricinus* (Zborov – 100, Chmelová – 42 a Becherov – 152 jedincov). Tiež s negatívnym výsledkom.

LITERATÚRA

FISET, P. – ORMSBEE, R. A. – SILBERMAN, B. – PEACOCK, M. G. – SPIELMAN, S. R. (1969): A microagglutination technique for detection and measurement of rickettsial antibodies. Acta Virol., 13, 60–66.
FRÍČOVÁ, M. – JANOK, J. – LUKÁČOVÁ, V. – ROJKOVIČ, D. – TARABČÁK, M. – VILNER, L. (1967): Epidémia Q horúčky vo Svidníku. Brat. Lek. Listy, 48, 233–242.
GMITTER, J. (1961): Epizootológia a prevencia koxiely na Slovensku. [Dizertačná práca.] Košice, 342 s.

- JANOK, J. – LUKÁČOVÁ, K. – ROJKOVIČ, D. (1964): Epidémia Q horúčky v Bardejovskom okrese. *Brat. Lek. Listy*, *44*, 281–287.
- KOČIANOVÁ, E. (1988): Investigation of small mammals and birds by rickettsiae in Bratislava. *Acta F. R. N. Univ. Comen., Format. Protec. Nat.*, *14*, 61–67.
- KOČIANOVÁ, E. – KOVÁČOVÁ, E. – LITERÁK, I. – ŘEHÁČEK, J. (1993): Some biological properties of *C. burnetii* strains isolated in Slovak and Czech Republics. In: *Abstr. Book Intern. Conf. Zoonoses, Piešťany, Oct. 5.–7., 1993*, 46 s.
- LITERÁK, I. – ŘEHÁČEK, J. (1996): Q fever – distribution and importance of this disease in the Czech Republic and in the Slovak Republic. *Vet. Med. – Czech*, *41*, 45–63.
- LITTLE, T. W. A. (1983): Q fever – an enigma. *Brit. Vet. J.*, *139*, 277–283.
- MAKSIMOVICH, M. B. – KLIMCHUK, N. D. – KUSHNIR, Z. G. – ZASTAVNYI, I. V. – BAT, O. S. – DREMLUGA, V. I. – IGNATYUK, L. P. – SHULYARENKO, S. V. – MOSKALEZ, N. D. (1995): Q fever in the western part of the Ukraine (In Russian). *J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.*, *1*, 29–33.
- MITTERMAYER, T. – SCHEIDOVÁ, L. – TARABČÁK, M. – MILOŠOVIČOVÁ, A. – ZELENÁKOVÁ, V. (1964): Epidémia Q horúčky v košickom okrese. *Brat. Lek. Listy*, *44*, 288–295.
- ORMSBEE, R.A. (1962): A method of purifying *Coxiella burnetii* and other pathogenic rickettsiae. *J. Immunol.*, *88*, 100–108.
- POSPÍŠIL, R. (1956): Sérologická detekcia Q horúčky na východnom Slovensku. *Brat. Lek. Listy*, *36*, 35–38.
- RAJSKÝ, D. (1986): Príspevok k štúdiu epizootológie koxielózy v sekundárnom ohnisku. *Veterinárství*, *36*, 539–541.
- ŘEHÁČEK, J. – BREZINA, R. – KOVÁČOVÁ, E. – ŽUPANČIČOVÁ, M. (1971): Haemocyte test – an easy, quick and reliable method for the detection of rickettsiae in ticks. *Acta Virol.*, *15*, 237–240.
- ŘEHÁČEK, J. – ŽUPANČIČOVÁ, M. – ÁČ, P. – BREZINA, R. – ÚRVÖLGYI, J. – KOVÁČOVÁ, E. – TARASEVIČ, I. V. – JABLONSKAJA, V. A. – POSPÍŠIL, R. – BALOGHOVÁ, D. (1976): Rickettsioses studies 2. Natural foci of rickettsioses in East Slovakia. *Bull. WHO*, *53*, 31–38.
- ŘEHÁČEK, J. – ÚRVÖLGYI, J. – KOČIANOVÁ, E. – SEKEYOVÁ, Z. – VAVREKOVÁ, M. – KOVÁČOVÁ, E. (1991): Extensive examination of different tick species for infestation with *Coxiella burnetii* in Slovakia. *Eur. J. Epidemiol.*, *7*, 299–303.
- SÁDECKÝ, E. – BREZINA, R. – MICHALOVIČ, M. (1974): Imunizácia hovädzieho dobytku proti Q horúčke. *Vet. Med. (Praha)*, *19*, 653–660.
- SCHRAMEK, S. – BREZINA, R. – ÚRVÖLGYI, J. (1972): A new method of preparing diagnostic Q fever antigen. *Acta Virol.*, *16*, 100–108.
- WOJCIECHOWSKI, E. (1959): The problem of Q fever in Poland. *Bull. Inst. Marine Medicine in Gdansk*, *10*, 39–47.

Received: 98–03–28

Accepted after corrections: 98–07–27

Kontaktná adresa:

RNDr. Jozef Řeháček, DrSc., Virologický ústav Slovenskej akadémie vied, Dúbravská cesta 9, 842 46 Bratislava, Slovenská republika
Tel. +421 7 59 41 35 27, fax +421 7 37 42 84, e-mail: virukoc@savba.savba.sk

DISTRIBUTION OF HEAVY METALS IN CALF ORGANS*

DISTRIBUCE TĚŽKÝCH KOVŮ V ORGÁNECH TELAT

D. Horký¹, J. Illek², A. Pechová²

¹ *Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic*

² *Ruminant Disease Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Veterinary and Pharmaceutical University, Brno, Czech Republic*

ABSTRACT: The distribution of heavy metals and their localisation in cells and tissues of some calf organs were determined by a modified histochemical method employing light microscopy. The metals were administered, singly or in combination, orally or subcutaneously. Experiment I included 32 calves of both sexes, three months old, which were allocated to seven groups; six received Cd (two groups), Zn, Cd and Zn, and Cd and Se (two groups) and one group was a control one. In experiment II, 21 bulls, aged three months, were allocated to four groups; three were given Cd, Cd and Cu, and Cd and Zn, respectively, and one group was a control one. In experiment I, samples of liver, kidney, pancreas, myocardium, small intestine, diaphragm, ovary, testes, oviduct, vesicular gland and skeletal muscle were collected for examination. In experiment II, sampling was reduced to liver, kidney, pancreas, testis, diaphragm and small intestine. The method was based on the detection of heavy metal sulphides developed by a modified procedure using a hydroquinone developer. Heavy metals first changed into sulphides by the action of gaseous hydrogen monosulphide in a fixation medium and then, during developing, silver was reduced on sulphide molecules and thus made the accumulated metals visual in the light microscope as dark granules. In experiment I, the highest amounts of granules were present in the samples of liver, small intestine and vesicular gland of all the exposed groups; in experiment II, the most affected organs were livers, kidneys and small intestines. The other organs showed levels approaching detectability or no findings with the use of this method.

xenobiotics; cadmium; zinc; selenium; copper; localisation in tissues and cells

ABSTRAKT: Modifikovanou histochemickou metodou byla stanovena distribuce těžkých kovů a jejich lokalizace v buňkách a tkáních některých orgánů telat ve světelném mikroskopu. Těžké kovy byly podávány ve dvou experimentech buď samostatně, nebo v kombinaci injekčně, a nebo *per os*. I. experiment: 32 telat obojího pohlaví ve věku tří měsíců bylo rozděleno do šesti skupin, jimž bylo aplikováno Cd (dvě skupiny) v různě vysoké dávce, Zn, Cd + Zn, Cd + Se (dvě skupiny), jedna skupina byla kontrolní. II. experiment: 21 býčků ve věku tří měsíců bylo rozděleno do čtyř skupin, které dostávaly Cd, Cd + Cu, Cd + Zn. Čtvrtá skupina byla kontrolní. U I. experimentu byly odebrány vzorky jater, ledviny, pankreatu, myokardu, tenkého střeva, bránice, ovaria, testes, tuba uterina, glandula vesiculosa, kosterního svalu. Ve II. experimentu byly odebrány vzorky jater, ledviny, pankreatu, varlete, bránice a tenkého střeva. Použitá metodika je založena na principu průkazu sulfidů těžkých kovů pomocí modifikovaného fyzikálního vyvolávání hydrochinonovou vývojkou. Těžké kovy se působením plynného sirovodíku ve fixačním médiu mění na sulfidy, na jejichž molekulách se při vyvolávání redukuje stříbro. Jeho ložiska jsou patrna ve světelném mikroskopu jako tmavý granulární produkt. V experimentu I bylo největší množství reakčního produktu přítomno u všech skupin v játrech, tenkém střevě a glandula vesiculosa, ve II. experimentu v játrech, ledvinách a tenkém střevu. V ostatních orgánech byl obsah reakčního produktu na hranici detekovatelnosti, popřípadě nebyly těžké kovy touto metodou prokazatelné.

xenobiotika; kadmium; zinek; selenium; lokalizace ve tkáních a buňkách

INTRODUCTION

The presence and content of heavy metals in animal and human organs have formerly been determined using biochemical methods. This approach made it possible to assess the total amount of heavy metals but not

their localisation in tissues and cells. The detection of heavy metal binding sites in cells was facilitated only after suitable histochemical methods were developed. The first technique used by Timm in 1958 was later modified (Timm, 1963; Danscher, 1981) and eventually adapted to serve the requirements of elec-

* Supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Grant No. 507/95/0531).

tron microscopy (Kodama et al., 1993). This was in much use in the 70s and 80s and recently it has been combined with biochemical methods to allow quantitative assessment. Using histochemical methods, the distribution of heavy metals in mammalian organs has been demonstrated under physiological conditions as well as after experimental administration (for review see Danscher, 1981; Danscher et al., 1994; Ficek, 1994; Li Jin et al., 1995 and others) or ingestion (Martin et al., 1994; Cigánková et al., 1994; Watanabe and Endo, 1991; Tanaka et al., 1995). It should be mentioned that the majority of studies on the effects of heavy metals on animal organs and their function has been carried out in small laboratory mammals or birds (Ahn and Park, 1995; Farina et al., 1996; Dean et al., 1991; Fahim et al., 1993; Maretta et al., 1995; Theocharis et al., 1991; Behne, 1996) and only occasionally in dogs (Hamada et al., 1991; Patra and Bose, 1990), calves (O'Toole and Raisbeck, 1995), sheep (Smyth et al., 1990), bulls (Cigánková et al., 1994), foetal tissue (Abdelrahman and Kincaid, 1993) and exceptionally in human accessory embryonic organs (Berlin et al., 1992).

Recently, studies concerned with the distribution of heavy metals in and their effects on cell populations *in vitro* have appeared (Jiang et al., 1996; Markov et al., 1992; Bucio et al., 1995; Palkovičová et al., 1995). Since data on the distribution and accumulation of heavy metals in organs and tissues of large farm animals have been sparse, we designed a study, which was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, grant No. 507/95/0531, with the aim to provide histochemical evidence of the presence of heavy metals in selected organs of calves fed on a diet containing Cd, Zn, Se and Cu and to compare the results with the quantitative findings reported elsewhere.

MATERIAL AND METHODS

The distribution of heavy metals and their localisation in the cells of selected organs and tissues of calves was studied in two experiments.

Experiment I: 32 calves of both sexes received, singly or in combination, Cd, Zn, Se and Cu during a period of 94 days from age two to 14 weeks. Cadmium was given to all groups as CdCl₂ in their diet, zinc (Zindep) at a subcutaneous dose of 0.8 ml/10 kg live weight and selenium (Selevit) at a subcutaneous dose of 20 ml/100 kg live weight. The experimental animals were allocated to 7 groups:

Group 1 (7 animals) – received 1 mg Cd/animal/day and 2 doses of Zindep,

Group 2 (3 animals) – received 2 doses of Zindep,

Group 3 (2 animals) – received 1 mg Cd/animal/day and 1 Selevit dose,

Group 4 (6 animals) – received 1 mg Cd/animal/day,

Group 5 (3 animals) – received 2 mg Cd and 1 Selevit dose,

Group 6 (3 animals) – received 2 mg Cd/animal/day, Group 7 (8 animals) – controls. The calves were fed on an diet equal to the experimental one but without heavy metal addition.

The average weight of animals at the end of the experiment was: control group, 100.3 kg; groups receiving Zn, 101 kg; groups given Cd and Zn, 94 kg.

Experiment II: It included 21 bulls, allocated to 4 groups, receiving heavy metals in a period of 92 days from age three to 16 weeks. Cadmium, as CdCl₂, was given at a dose of 5 mg Cd/kg feed dry weight, copper (Cu Bioplex) at a dose of 10 mg/kg feed dry weight and zinc (Zn Bioplex) at a dose of 100 mg/kg feed dry weight. The intake of heavy metals increased as the growing bulls consumed more feed.

Group 1 (6 animals) – received 5 mg Cd/kg feed dry weight. The total amount of Cd was 900 mg.

Group 2 (6 animals) – received 5 mg Cd/kg feed dry weight and Cu Bioplex. The total amounts of Cd and Cu were 900 mg and 1.8 g, respectively.

Group 3 (6 animals) – received 5 mg Cd/kg feed dry weight and Zn Bioplex. The total amounts of Cd and Zn were 900 mg and 18 g, respectively.

Group 4 (3 animals) – received equal feed rations but without heavy metal addition.

The average weight of animals at the end of the experiment was: control group, 146 kg; Cd-Cu group, 133.6 kg; Cd-Zn group, 140 kg; Cd group, 139 kg.

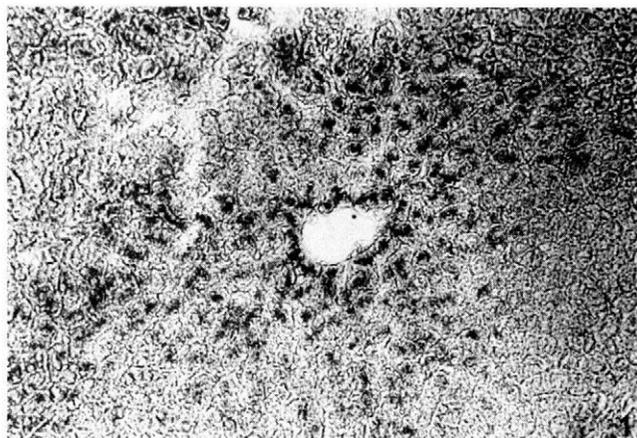
For histochemical examination in experiment I, liver, kidney, pancreas, myocardium, small intestine, testis or ovary, diaphragm, oviduct, vesical gland, skeletal muscle and prostate gland samples were collected. In experiment II, after preliminary evaluation of the results from experiment I, the number of organs sampled for examination was reduced to liver, kidney, small intestine, pancreas, diaphragm and testis.

Immediately after collection, the samples were fixed for 24 hours in 10% formaldehyde solution saturated with hydrogen monosulphide, then washed twice for 24 hours in 300 mmol/l saccharose with sodium azide and embedded in paraffin. Sections were subjected to a modified hydroquinone developer with AgNO₃ but no subsequent incubation in 5% sodium thiosulphate or additional staining were performed.

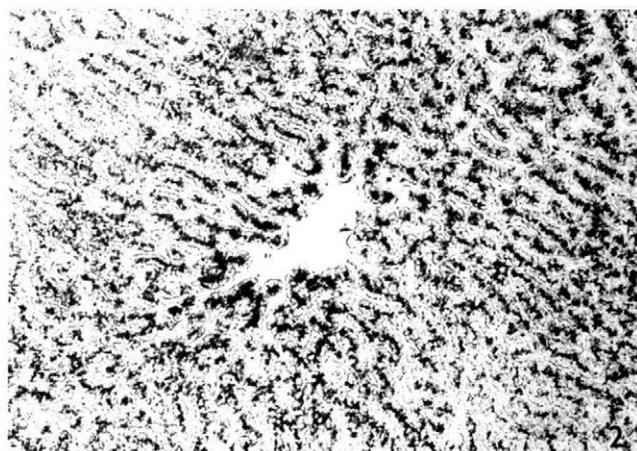
RESULTS

Experiment I

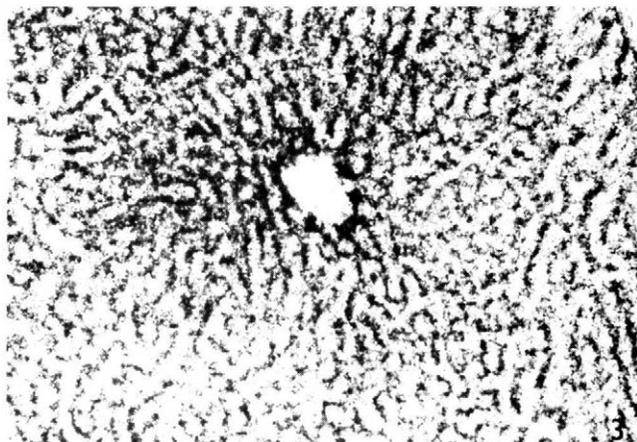
Heavy metals presented as dark granules of reduced silver in the tissues examined. In the liver, they appeared in all experimental groups but in different amounts. Administration of CdCl₂ and Zn resulted in the presence of granules in the nuclei and cytoplasm of hepatocytes of the liver plates situated close to the central vein and of individual cells near the periphery of the lobule (Fig. 1). Granule distribution was irregular,



1. Reduced silver granules in a liver lobule. Calves received 1 mg CdCl_2 and Zn; 380x



2. Granules in the liver plates. Calves received 1 mg Cd; 380x



3. Part of a liver lobule. Dark granules in hepatocytes. Calves received 1 mg Cd and Se; 380x

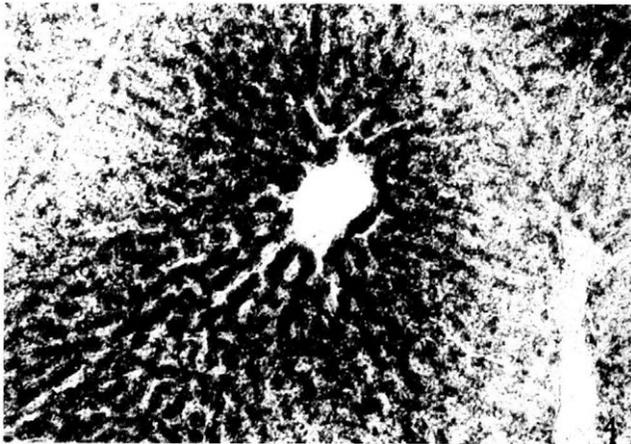
some lobules showing the absence of granules. Following administration of CdCl_2 at 1 mg doses, increased amounts of granules were observed in all hepatocytes in which granules accumulated in nuclei. The largest amounts were seen in hepatocytes close to bile capillaries (Fig. 2). Due to this, liver plates could be clearly distinguished. As in the combined Cd and Zn administration, the majority of reduced silver granules were found near the central vein but some granules were observed in all the lobules.

Even larger amounts of reduced silver granules were seen in hepatocytes after combined administration of 1 mg CdCl_2 and Se. The granules filled nearly the whole cytoplasm and, in the area close to the central vein, caused that individual cells could not be distinguished (Fig. 3). The radial pattern of the sponge-like texture of lobular liver plates was clearly marked. The number of granules gradually decreased towards the periphery of lobules.

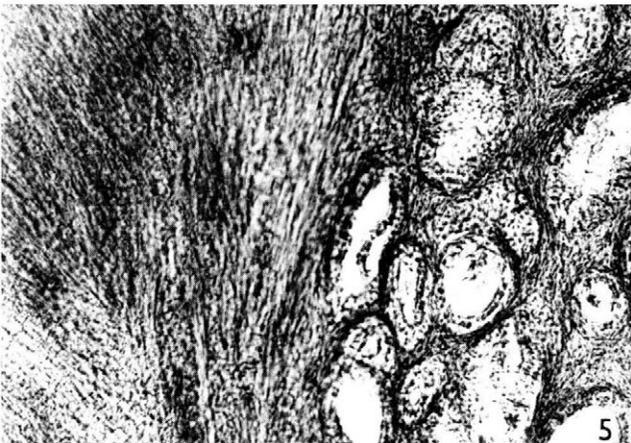
The highest amounts of granules were seen in the liver after administration of 2 mg CdCl_2 (Fig. 4). The

granules accumulated in the cytoplasm completely masked the nuclei and liver plates appeared as nearly homogeneous cords connected with anastomoses. The cords converged towards the central vein of the lobule. Light stripes involving sinusoids were seen between liver plates. The number of granules gradually decreased towards lobule peripheries and the borders between adjacent lobules could be discerned. Occasional granules were also observed in major connective tissue septa (Fig. 4).

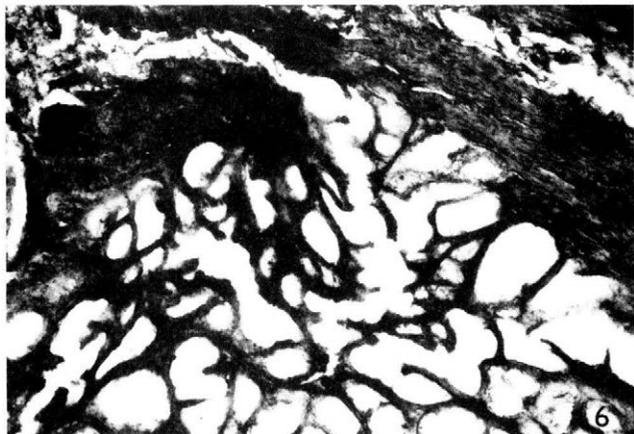
In the gl. vesiculosa, a small amount of granules was recorded after administration of a combined dose of 1 mg CdCl_2 and Se (Fig. 5). The metals were accumulated mainly in the nuclei of glandular epithelium and in interstitial connective tissue; in the latter they produced foci by aggregation and a change in colour by diffuse distribution of reduced silver granules. The combined doses of 2 mg CdCl_2 and Se were followed by large amounts of granules accumulated in the glandular cells and interstitial connective tissue of the vesicular gland (Fig. 6). The presence of heavy metals led to a reduc-



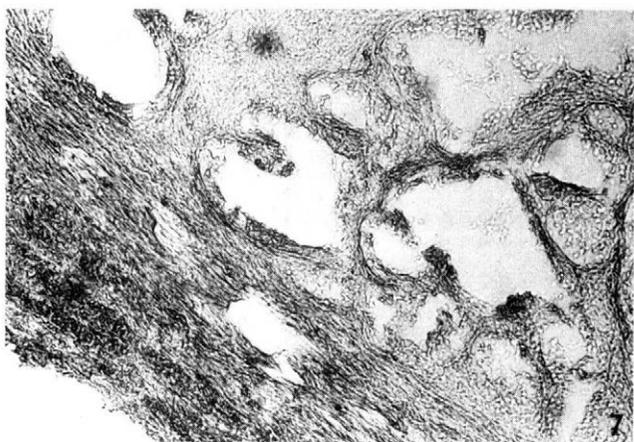
4. A liver lobule with hepatocytes completely filled with reduced silver granules. Calves received 2 mg Cd. 380x



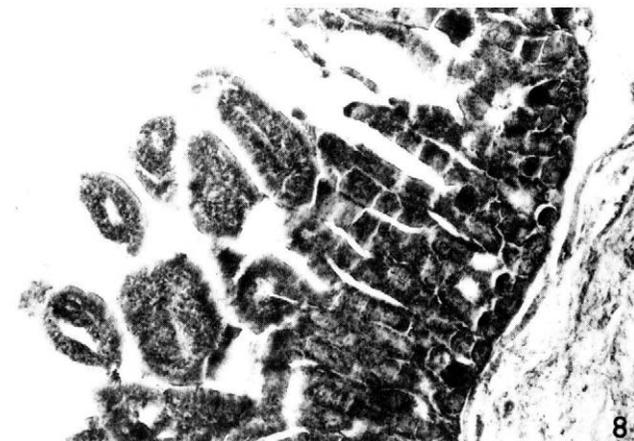
5. Part of the capsule and glandular tubules of the glandular vesiculosa. Glandular cells show black nuclei and connective tissue is tinged by diffusely distributed granules. Calves received 1 mg Cd and Se; 380x



6. Part of the capsule and glandular tubules of the vesicular gland with granules filling the cells; connective tissue is tinged by diffusely distributed granules. Calves received 2 mg Cd; 150x



7. Part of the capsule and glandular tubules of the glandular vesiculosa; granules in the groups of glandular cells and connective tissue with diffusely distributed granules. Calves received 1 mg Cd and Zn; 850x



8. Small intestine mucosa. Diffusely distributed granules in the epithelium of crypts; granules in the nuclei of enterocytes. Calves received 1 mg Cd and Se; 150x

tion in the epithelial layer and to the effacement of intercellular boundaries. The connective tissue of plicae was completely filled with granules and acquired black tinge; interstitial connective tissue was also homogeneously impregnated with the granules.

Following administration of 1 mg CdCl_2 and Zn, granules were always accumulated in a group of several glandular cells, in the adjacent area of the glandular tubule wall and in the connective and muscular tissue of the gland (Fig. 7); in the latter, apart from a tinge produced by diffuse distribution of granules, dark foci could also be seen.

In the small intestine mucosa after combined doses of 1 mg CdCl_2 and Se, granules were present predominantly in the nuclei and cytoplasm of Lieberkuhn's crypts (Fig. 8) and in the nuclei of enterocytes of the villus wall. The lamina propria mucosae and tela submucosa were free from any granules.

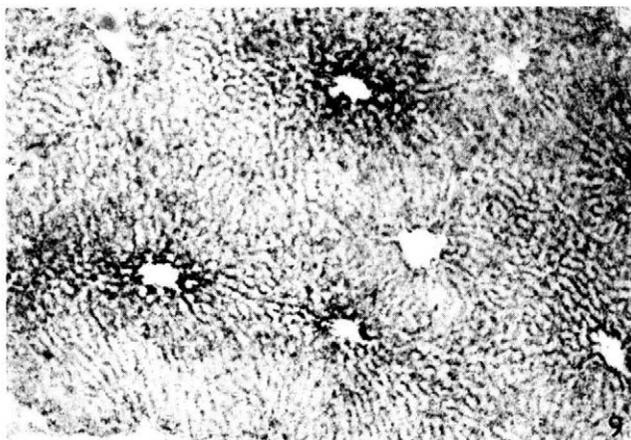
From the remaining organs, the administration of heavy metals at the doses mentioned above produced

only diffuse reactions in the prostate gland, diaphragm and skeletal muscle, in which heavy metals were present at levels approaching detectability failing to give consistent results; the kidney, myocardium, pancreas, oviduct and ovary showed no presence of reduced silver granules at all.

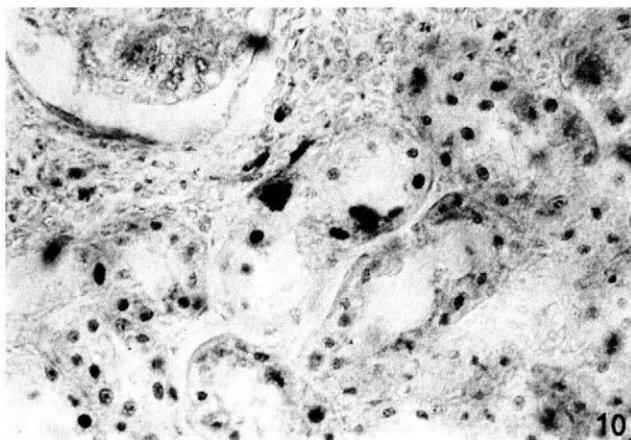
Experiment II

The administration of increased doses of heavy metals, singly or in combination, invariably resulted in massive accumulation of granules in the kidney and liver.

A combination of CdCl_2 and Cu produced the presence of granules in all hepatocytes but in amounts greatly varying between adjoining lobules (Fig. 9). Some of these contained only labelled nuclei and thus liver plates were poorly discernible, other hepatocytes accumulated granules also in the cytoplasm.



9. Liver parenchyma with lobules differently tinged by the presence of reduced silver granules. Calves received 5 mg Cd and Cu; 150x



10. Part of the renal cortex with the renal corpuscle and proximal and distal tubules of the nephron. Dark foci of reduced silver granules. Calves received 5 mg Cd and Cu; 850x

The kidney parenchyma, following the dosage mentioned above, showed the presence of granules predominantly in the nuclei and nucleoli of cells of the proximal and distal renal tubules (Fig. 10). In some cases, granules were also seen in the cytoplasm, thus giving the cells tinge of varying density. The cells of the outer parietal layer of Bowman's capsules rarely contained any granules.

Small intestine villi and some crypts of Lieberkuhn (Fig. 11) showed a change in colour due to diffuse distribution of granules. The nuclei of enterocytes were made distinct by the presence of granules only occasionally but the lamina muscularis was tinged by their diffuse distribution.

Administration of $CdCl_2$ and Zn resulted in granule accumulation in liver plates situated close to the central vein (Fig. 12). The amount of granules decreased towards lobule peripheries and the boundaries between lobules were visible. The connective tissue of major septa and portobiliary spaces were free of any granules.

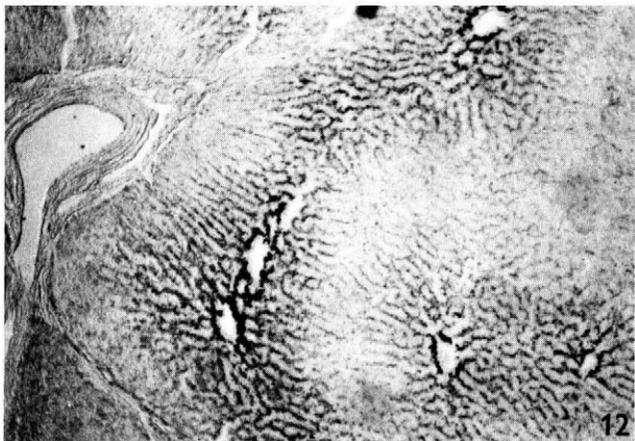
In the kidney parenchyma, this metal combination produced massive accumulation of reduced silver granules (Fig. 13). These were present in the nuclei of all types of renal tubules in such an amount that it was not possible to identify nucleoli. The cytoplasm of cells of the proximal and distal tubules of the nephron was filled with granules completely and the squamous epithelial cells of the parietal layer of Bowman's capsules were also dark in appearance. Only the cells of the thin segment of Henle's loop did not contain any granules.

After administration of Cd alone, granules were accumulated in all the cells of liver plates both in nuclei and cytoplasm (Fig. 14). The highest number of granules was seen close to the central vein and hepatocytes were filled with granules to such an extent that boundaries between lobules could not be distinguished.

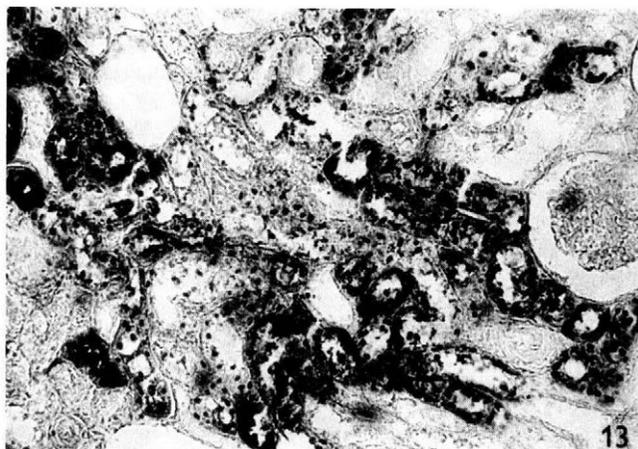
Large accumulation of granules following doses of Cd was also seen in the nuclei and cytoplasm of cells of the proximal and distal tubules of the nephron (Fig. 15). The density of granules in nuclei overshadowed the



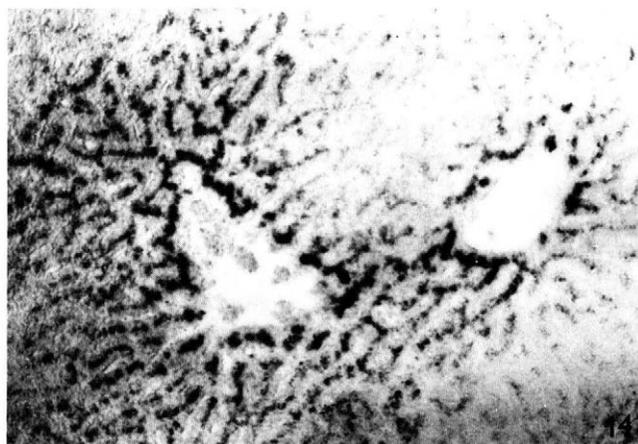
11. Part of small intestine mucosa with areas darkened by the presence of granules. Calves received 5 mg Cd and Cu; 380x



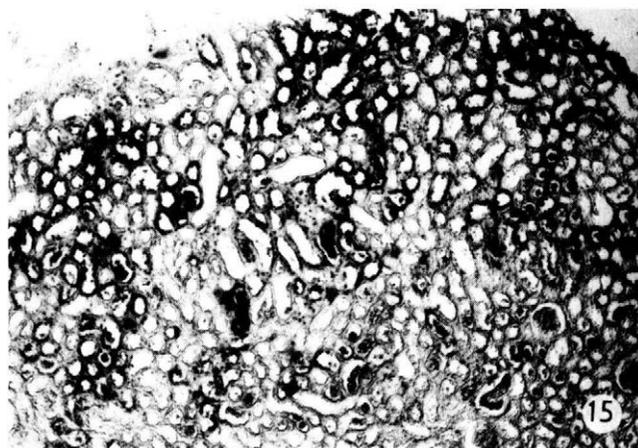
12. Part of liver parenchyma with several lobules. Hepatocytes near the central vein are filled with dark granules; towards the lobule periphery, the density of granules decreases. Calves received 5 mg Cd and Zn; 150x



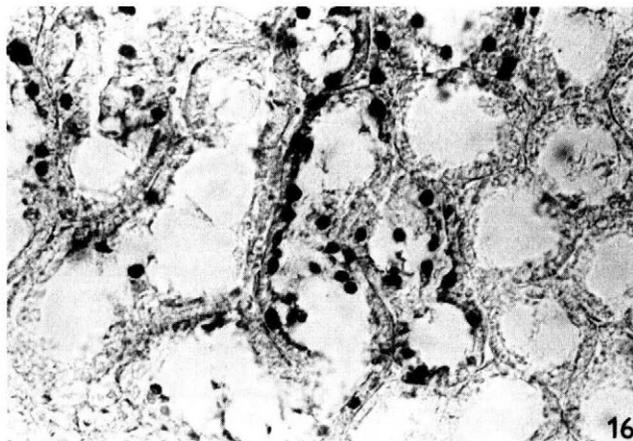
13. Part of the renal cortex. Granules are accumulated in the cells of proximal and distal tubules and in nuclei of the other tubules of the nephron. Calves received 5 mg Cd and Zn; 380x



14. Two adjoining liver lobules with hepatocytes filled with granules. Calves received Cd; 380x



15. Part of the renal cortex and core. Granules appear in the nuclei of cells of all tubules and in the cytoplasm of cells of the parietal layer of Bowman's capsula and in cells of the proximal and distal tubules. Calves received 5 mg Cd; 150x



16. The nuclei and cytoplasm of cells of the proximal and distal tubules of the nephron show reduced silver granules. Calves received 5 mg Cd; 850x

nucleoli (Fig. 16) but the cells of adjoining thin segments of Henle's loop were free from any granules.

The other organs examined after administration of the selected heavy metals showed only slight changes in colour due to diffuse distribution of granules but the results were not consistent enough to allow any conclusions.

DISCUSSION

The assessment of the presence of heavy metals in animal tissue by a histochemical technique was used in 1958 by Timm; since then the method has been modified by both the author and other researchers (Li Jin, 1995; Danscher et al., 1994; Kodama et al., 1993). This approach has facilitated the detection of heavy metals in almost all organs and tissues of laboratory animals. However, apart from few data, comprehensive information on the presence of heavy metals in the organs of farm animals has been missing.

In this work, the localisation of heavy metals was studied by a histochemical method in the organs and tissues of calves, average age 3 months, following a period of Cd, Zn, Cu and Se administration in single or combined doses. In agreement with literature data, Cd was detected in the livers of all exposed animals; similar results have been reported in rats by Theocharis et al. (1991), who have found increased levels of Cd in sera and livers as early as 6 hours after intraperitoneal injection, and by Chishti and Rotkiewicz (1993); Hamada et al. (1991) in cocks and dogs, respectively. Cadmium also accumulates in the kidney where it is present predominantly in the cytoplasm of cells of the proximal and distal tubules of the nephron (Hamada et al., 1991; Jiang, 1996) and, as reported by Ahn and Park (1995), in the brush border. Cadmium toxicity has been demonstrated by increased amounts of micronuclei in bone marrow cells (Jagetic and Adiga, 1994). The effects of Cd on

testes and epididymis (Caflish, 1994) could not be confirmed by our experiments because the samples of testes from the bulls fed on Cd-contaminated diet did not show any Cd accumulation. We cannot argue with the observations made by Hewet et al. (1993) on disturbed spermatogenesis in rats or with the data reported by Patra and Bose (1990) in rats which received Cd intraperitoneally or intragonadally because, in these experiments, the effects of metals are based on a different mechanism. The absence of reduced silver granules in the testes as well as a low concentration of Cd and Se in the vesicular and prostate glands can be explained by sexual immaturity of the bulls in our study. There are no literature data on the detection of Cd in intestine mucosa even if its presence there can be expected. Our results suggest that cadmium is rapidly absorbed by the small intestine mucosa and, subsequently, transported to and deposited in the liver and kidneys where, particularly after increased doses, reduced silver granules were observed in nearly all of the distal and proximal tubules of the nephron. In extracellular structures (interfibrillar and fibrillar components of connective tissue), the granules accumulated on collagen fibres, which is related to the ability of Cd ions to bound to sulphate and other acidic groups present in the amorphous matter covering collagen fibres or to the heterocyclic groups of proline or hydroxyproline contained in collagen.

The toxicity of selenium has been known since 1993 when it was first recorded in cattle grazing on plants contaminated with high levels of Se. In 1957, selenium was identified as an essential element in laboratory rats, chicks and sheep. Its necessity for mammals was discovered in 1973 after defining the structure of glutathion peroxidase. In the same period, papers began to appear which suggested that selenium compounds had carcinostatic effects at low levels but were toxic to humans at high levels (O'Toole and Raisbeck, 1995). Experimental lambs with induced acute Se intoxication showed clinical evidence suggesting that the

cardiovascular, respiratory and urinary systems and lymphoreticular tissue of different organs had been afflicted (Smyth et al., 1990). In that study, the histochemical changes were in correlation with the histochemical findings but, interestingly enough, the authors regarded the impairment as non-specific and minimal in extent. On the other hand, an insufficient supply of Se with the diet can produce changes in several organs, as shown by the work of Behne et al. (1996) who reported changes in the size of testes during sexual maturation in rats but not in adult males of the first generation. In the fourth generation, however, testis atrophy, reduction in the size of tubuli seminiferi and decreased numbers of Sertoli's cells were recorded. These changes were reversible and spermatogenesis was restored after an appropriate diet was introduced.

The affinity of zinc to glandular tissue was used by Dean et al. (1991) to demonstrate the effect of Zn on the levels of thyroid hormones and cholesterol in chickens. These levels were decreased and histological findings showed a reduction in size of thyroid follicles by 63%. However, the study does not indicate whether damage to the thyroid gland was direct or mediated.

Fahim et al. (1993) used arginine zinc salts to sterilise dogs by injecting 0.5 ml of salt solution to the cauda epididymidis. At 90 days they found azoospermia, atrophy of the rete testis, proliferation of connective tissue and disappearance of sperm in the epididymis. The authors state that zinc has produced the changes described but that it is non-mutagenic, non-carcinogenic and non-teratogenic. Changes in the germinative epithelium of testes in bulls following a diet deficient in Zn were described by Čigánková et al. (1994). They found tissue degeneration and necrosis, tubule atrophy and a decrease in the number of Sertoli's cells. One dose of Zindep resulted in normal spermatogenesis within 60 days. This suggests a direct involvement of Zn in the process of spermatogenesis similarly to the results of Tanaaka et al. (1995) who fed rats on a diet supplemented with Cd but deficient in Zn. Adverse effects of a diet deficient in Zn on the level of sexual hormones, growth of testes and secretion of inhibine in rams were published by Martín et al. (1994). Since in these papers clinical observations were not supported by histological evidence of the presence of Zn and Cd, their results can be compared with our findings only to a certain extent.

REFERENCES

- ABDELRAHMAN, M. M. – KINCAID, R. L. (1993): Deposition on copper, manganese, zinc, and selenium in bovine fetal tissue at different stages of gestation. *J. Dairy Sci.*, **76**, 3588–3593.
- AHN, D. W. – PARK, Y. S. (1995): Transport of inorganic phosphate in renal cortical brush-border membrane vesicles of cadmium-intoxicated rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **133**, 239–243.
- BEHNE, D. – WEILER, H. – KYRIAKOPOULOS, A. (1996): Selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. *J. Reprod. Fertil.*, **106**, 291–297.
- BERLIN, M. – BLANKS, R. – CATTON, M. – KAZANTZIS, G. – MOTTE, N. K. – SAMIULLAH, Y. (1992): Birth weight of children and cadmium accumulation in placentas of female nickel-cadmium (long life) battery workers. *IARC. Sci. Publ.*, **118**, 257–262.
- BUCIO, L. – SOUZA, V. – ALBORES, A. – SIERRA, A. – CHAVEZ, E. – CARABEZ, A. – GUTIERREZ-RUIZ, M. C. (1995): Cadmium and mercury toxicity in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cell). *Toxicology*, **102**, 285–299.
- CAFLISCH, C. R. (1994): Effect of orally administered cadmium on *in situ* pH, PCO₂, and bicarbonate concentration in rat testis and epididymis. *J. Toxicol. Environ. Hlth.*, **42**, 323–330.
- CIGÁNKOVÁ, V. – MESÁROŠ, P. – BIREŠ, J. – TOMÁJKOVÁ, E. – ČERNOTA, S. (1994): Morphological structure of the testes of bulls with zinc deficiency and the effect of administering Zindep inj. on the recovery of spermatogenesis. *Slov. Vet. Čas.*, **19**, 134–138.
- CHISHTI, M. A. – ROTKIEWICZ, T. (1993): Hepatic and renal ultrastructural changes in cockerels exposed to cadmium chloride and subsequent interaction with organophosphate insecticide. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, **12**, 35–45.
- DANSCHER, G. (1981): Histochemical demonstration of heavy metals. *Histochemistry*, **71**, 1–16.
- DANSCHER, G. – STOLTENBERG, M. – JUHL, S. (1994): How to detect gold, silver and mercury in human brain and other tissues by autometallographic silver amplification. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **20**, 454–467.
- DEAN, C. E. – HARGIS, B. M. – HARGIS, P. S. (1991): Effects of zinc toxicity on thyroid function and histology in broiler chicks. *Toxicol. Lett.*, **57**, 309–318.
- FAHIM, M. S. – WANG, M. – SITCU, M. F. – FAHIM, Z. – YOUNGQUIST, R. S. (1993): Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. *Contraception*, **47**, 107–122.
- FARINA, J. – RIBAS, B. – FERNANDEZ-ACENERO, M. J. – GASCON, C. (1996): Pulmonary toxicity of cadmium in rats: a histologic and ultrasound study. *Gen. Diagn. Pathol.*, **141**, 365–369.
- FICEK, W. (1994): Heavy metals and the mammalian thymus: *in vivo* and *in vitro* investigations. *Toxicol. Ind. Hlth.*, **10**, 191–201.
- HAMADA, T. – NAKANO, S. – IWAI, S. – TANIMOTO, A. – ARIYOSHI, K. – KOIDE, O. (1991): Pathological study on beagles after long-term oral administration of cadmium. *Toxicol. Pathol.*, **19**, 138–47.
- HEW, K. W. – ERICSON, W. A. – WELSH, M. J. (1993): A single low cadmium dose causes failure of spermiation in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **121**, 15–21.
- JAGETIA, G. C. – ADIGA, S. K. (1994): Cadmium chloride induces dose-dependent increases in the frequency of micronuclei in mouse bone marrow. *Mutat. Res.*, **306**, 85–90.
- JIANG, T. – FAN, J. – TAN, B. (1996): Toxicity of cadmium and its mechanism on renal tubular epithelial cells *in vitro*. *Chung-Hua-Yu*, **30**, 84–87.
- KODAMA, H. – ABE, T. – TAKAMA, M. – TAKAHASHI, I. – KODAMA, M. – NISHIMURA, M. (1993): Histochemi-

- cal localization of copper in the intestine and kidney of Malar mice: light and electron microscopic study J. Histochem. Cytochem., 41, 1529–1535.
- LI Jin – MURAKAMI, H. T. – JANJUA, N. A. – ITANO, T. (1995): Histochemical demonstration of heavy metals in mouse skin. Acta Histochem. (Jena), 97, 383–388.
- MARETTA, M. – MARETTOVÁ, A. – ŠKROBÁNEK, P. – LEDEČ, M. (1995): Effect of mercury on the seminiferous epithelium of the fowl testis. Acta Vet. Hung., 43, 153–161.
- MARKOV, I. G. – BERZIN, N. I. – VALDMAN, A. R. (1992): Morphofunctional analysis of zinc – accumulating capacity of digestive system organs. Bull. Eksp. Biol. Med., 113, 324–327.
- MARTIN, G. B. – WHITE, C. L. – MARKEY, C. M. – BLACKBERRY, M. A. (1994): Effects of dietary zinc deficiency on the reproductive system of young male sheep: testicular growth and the secretion of inhibin and testosterone. J. Reprod. Fertil., 101, 87–96.
- O'TOOLE, D. – RAISBECK, M. F. (1995): Pathology of experimentally induced chronic selenosis (alkali disease) in yearling cattle. J. Vet. Diagn. Invest., 7, 364–373.
- PALKOVIČOVÁ, H. – WSOLOVÁ, L. – SLAMĚNOVÁ, D. (1995): Evaluation of cadmium chloride cytotoxicity in Chinese hamster fibroblast cultured *in vitro*. Folia Biol. Praha, 41, 31–40.
- PATRA, S. P. – BOSE, P. K. (1990): A new approach for intraovarian injection of cadmium chloride to perform mass sterilization in adult bitches. Indian journal of animal health, 29, 115–117.
- SMYTH, J. B. A. – WANG, J. H. – BARLOW, R. M. – HUMPHREYS, D. J. – ROBINS, M. – STODULSKI, J. B. J. (1990): Experimental acute selenium intoxication in lambs. J. Compar. Path., 102, 197–209.
- SPALLHOLZ, J. E. (1994): On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. Free Radiac. Biol. Med., 17, 45–64.
- TaNAKA, M. – YANAGI, M. – SHIROTA, K. – UNE, Y. – NOMURA, Y. – MASAOKA, T. – AKAHORI, F. (1995): Effect of cadmium in the zinc deficient rat. Vet. Hum. Toxicol., 37, 203–208.
- THEOCHARIS, S. – MARGELI, A. – FASITSAS, C. – LOIZIDOU, M. – DELIKONSTANTINOS, G. (1991): Acute exposure to cadmium causes time-dependent liver injury in rats. Comp. Biochem. Physiol.-C., 99, 127–130.
- TIMM, F. (1958): Zur Histochemie der Schwermetalle mit dem Sulfid-Silber-Verfahren. Dtsch. Z. Gerichtl. Med., 46, 706–711.
- TIMM, F. (1963): Histochemische Lokalisation and Nachweis der Schwermetalle. Acta Histochem. Suppl., 3, 142–158.
- WATANABE, T. – ENDO, A. (1991): Effects of selenium deficiency on sperm morphology and spermatocyte chromosomes in mice. Mutat. Res., 262, 93–99.

Received: 98–05–04

Accepted after corrections: 98–08–18

Contact Address:

Prof. MUDr. Drahomír Horký, DrSc., Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Joštova 10, 662 43 Brno, Česká republika
Tel. +420 5 42 12 62 13, fax +420 5 42 12 62 00, e-mail: dhorky@med.muni.cz

Subscription list of scientific journals published in 1999 in the Institute of Agricultural and Food Information, Prague, Czech Republic

In this institute scientific journals dealing with the problems of agriculture and related sciences are published on behalf of the Czech Academy of Agricultural Sciences. The periodicals are published in the Czech or Slovak languages with abstracts in English or in English with abstracts in Czech or Slovak.

Journal	Number of issues per year	Yearly subscription in USD (including postage)	
		Europe	overseas
Rostlinná výroba (Plant Production)	12	195,-	214,-
Czech Journal of Animal Science (Živočišná výroba)	12	195,-	214,-
Zemědělská ekonomika (Agricultural Economics)	12	195,-	214,-
Journal of Forest Research (Lesnictví-Forestry)	12	195,-	214,-
Veterinární medicína (Veterinary Medicine – Czech)	12	159,-	167,-
Czech Journal of Food Sciences (Potravinařské vědy)	6	92,-	97,-
Plant Protection Science (Ochrana rostlin)	4	62,-	64,-
Czech Journal of Genetics and Plant Breeding (Genetika a šlechtění)	4	62,-	64,-
Zahradnictví (Horticultural Science)	4	62,-	64,-
Zemědělská technika (Agricultural Engineering)	4	62,-	64,-

Please send your order to the address: Editorial Office of scientific journals
Ústav zemědělských a potravinářských informací
(Institute of Agricultural and Food Information)
Slezská 7
120 56 Praha 2
Czech Republic

Tel.: +420 2 24 25 79 39, Fax: +420 2 24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz
Subscriptions to be sent to Acc. No. 86335-011/0100, KB nám. Míru, Praha 2



We order the journals:

	Number of issues
Rostlinná výroba (Plant Production)	—
Czech Journal of Animal Science (Živočišná výroba)	—
Zemědělská ekonomika (Agricultural Economics)	—
Journal of Forest Research (Lesnictví-Forestry)	—
Veterinární medicína (Veterinary Medicine – Czech)	—
Czech Journal of Food Sciences (Potravinařské vědy)	—
Plant Protection Science (Ochrana rostlin)	—
Czech Journal of Genetics and Plant Breeding (Genetika a šlechtění)	—
Zahradnictví (Horticultural Science)	—
Zemědělská technika (Agricultural Engineering)	—

Name or organization:

Address + Postal Code:

SURVIVABILITY OF *MYCOPLASMA AGALACTIAE* STRAINS IN CAPRINE MILK*

PŘEŽÍVÁNÍ KMENŮ *MYCOPLASMA AGALACTIAE* V KOZÍM MLÉKU

G. O. Egwu¹, M. M. Aliyu¹, J. A. Ameh²

¹Department of Veterinary Medicine, ²Department of Veterinary Microbiology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Maiduguri, Maiduguri, Nigeria

ABSTRACT: The survivability of five strains of *Mycoplasma agalactiae* (2290, X-teramo, 4941, 6/5277 and 549) causing caprine mastitis from different geographical locations, in artificially infected goat milk were investigated. The assay was carried out using colour changing units (ccu/0.05 ml) in microplates as indicators of residual *M. agalactiae* at thermostatically controlled temperatures of 4, 18.2, 37 and 41 °C except for the room temperature from 0 to 5 days. All the strains tested were more viable at 4 °C throughout the incubation period but showed decline in number(s) by more than 4 logs at days 4–5. Similar patterns of decline were also noticed at temperatures of 37–41 °C, at which time no organism survived, beyond day 3. Three strains 2290, X-teramo and 6/52.27 survived at temperatures of 37 and 41 °C, respectively. The gradual fall in the mean pH value of the infected milk from 6.90 ± 0.04 at day 0 of infection to 4.10 ± 0.69 at 41 °C did not appear to adversely affect the survival of the strains. It is concluded that there is a likely chance of recovery of some strains of *M. agalactiae* in milk at a temperature of 41 °C within 3 days.

caprine milk; *Mycoplasma agalactiae*; survivability

ABSTRAKT: Bylo sledováno přežívání pěti kmenů *Mycoplasma agalactiae* (2290, X-teramo, 4941, 6/5277 and 549) v kozím mléce po dobu pěti dnů při teplotách 4, 18,2, 37 a 41 °C a při laboratorní teplotě mimo termostat. Při teplotě 4 °C všechny kmeny přežily, ale čtvrtý až pátý den došlo k poklesu až o čtyři řády. Při teplotách 37 a 41 °C nepřežil žádný kmen déle než tři dny. Postupný pokles pH mléka z 6,9 na 4,1 neovlivnil přežívání testovaných kmenů. Z výsledků vyplývá, že při teplotě 41 °C není přežití *M. agalactiae* po dobu tří dnů vyloučeno.

kozi mléko; *Mycoplasma agalactiae*; přežívání

INTRODUCTION

Mycoplasma agalactiae was historically the first species of mycoplasma of sheep and goats to be isolated (Cottew, 1979; Lambert, 1987). This agent is responsible for contagious agalactia (CA), mastitis, arthritis and keratitis of sheep and goats (Gousslay, 1981; Da Massa et al., 1992). Although two other mycoplasmas (*M. capricolum* subsp. *capricolum* and *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC) are also responsible for this mastitis syndrome (Jones, 1983; Da Massa et al., 1992), *M. agalactiae* is the most incriminated aetiological agent of contagious agalactia (Atalara et al., 1986). However, a fourth mycoplasma, *M. putrefaciens*, has also been reported to cause mastitis in goats particularly in the U.S.A., Australia and France (Adler et al., 1980; Da Massa et al., 1984).

The economic importance of this disease manifested by a fall in milk production, anorexia, depression and

short febrile period, are considerable in affected region (Da Massa et al., 1992).

The reservoir of *M. agalactiae* is usually the infected animal in which the organism can persist following clinical recovery for upto one year (Cottew, 1979). Also young animals become infected directly at suckling and adults by means of the milker's hands or through litter by contaminated milk (Lambert, 1987).

CA is known to occur in many different countries of the world with varying climatic conditions (Lambert, 1987).

The persistence and survivability of *M. agalactiae* in clinical specimens such as milk at different temperatures are unknown, though it has been shown that the organism survived at 50 °C but was unable to survive at 53 °C in infected exudates or milk beyond 10 mins (Bridre and Donatien, 1925).

There may be some delays at times in transporting suspect clinical samples such as milk to laboratories at different geographical temperatures as well as delays in

* Supported by the Rockefeller Foundation Grant.

laboratories prior to processing of specimens. This is particularly true of most developing countries where erratic electricity supplies constitute a hindrance to routine laboratory investigation and analysis. Based on this premise, there is therefore the need to investigate the survivability in milk of various geographical isolates of *M. agalactiae* at different temperatures, so as to determine the most suitable detectable temperature threshold of *M. agalactiae* in clinical specimens such as milk.

This may further shed more light on the epidemiology of this disease, since there is scarcity of reports on the survival of *M. agalactiae* in milk and other superficial exudates.

MATERIALS AND METHODS

Source of goat milk

Pasteurised goat milk was obtained from Laver Basin farm, Cowden Kent IMB, 7JU, England. It was found on analysis by the manufacturers to contain: fat 3.5%; protein 3.3%; and lactose 3.8%.

Infection of milk with test strains

Five hundred millilitres of pasteurised goat milk which has previously been screened for *M. agalactiae* and other milk borne mycoplasmas and bacteria were dispensed in 30 ml amount in sterile containers. This was further divided into aliquots of 2 ml in small serum vials. Aliquots of each strain (totalling 5; Tab. I) were kept at various temperatures of 4 °C, mean room temperature of 18.2, 37 and 41 °C at days 0 (day of infection), to day 5. All temperatures apart from the room temperature were thermostatically maintained.

pH values of the infected milk at day 0 of infection and other subsequent days for each temperature were also taken.

The residual survivability in milk of each test strain at day 0 of infection and other subsequent days at each temperature were assayed in micro-titre plates (ccu/ml) as previously described by Senterfit (1983). Briefly 0.025 ml of the test broth medium was added to all wells in micro-titre plates along a row in duplicate followed by the addition of 0.025 ml each of a 10 fold dilution of the test strain. This was followed by the addition of 0.125 ml of the test broth medium to all test wells.

Medium and antigen controls were set up in four wells containing 0.2 ml and 0.05 ml antigen plus 0.15 ml broth medium, respectively.

Plates were incubated at 37 °C for up to 4 days. Plates were read using Titre-tek Mirrow plate reader^R (Titertek, U.S.A.) since glucose fermentation can be partial with *M. agalactiae*.

Wells with the highest dilution of colour change along the row of the micro-titre plate were taken as the

residual titre of surviving *M. agalactiae* at the temperature for each day of incubation.

RESULTS

The log₁₀ titres expressed in ccu/0.05 ml of strains *M. agalactiae* at different temperatures for each day of incubation as well as their mean pH values in parentheses are shown in Tab. II. At 4 °C all strains were still viable throughout the incubation period even though titres of *M. agalactiae* have dropped by more than 4 logs₁₀ by days 4–5 of incubation.

The mean pH of the infected milk sample at 4 °C slightly dropped from 6.90 ± 0.04 to 6.80 ± 0.06 and did not adversely effect the organisms up to day 3.

At a mean room temperature of 18.2 °C, some strains survived for up to day 4 but a gradual decline in titres was noticed from day 1 from their preinfection dose at day 0.

The fall in pH from 6.90 ± 0.04 to 4.70 ± 0.19 must have contributed immensely to the rapid decline of the surviving organisms up to day 4.

Similar patterns of decline in numbers of *M. agalactiae* were noticed at temperature of 37–41 °C at which time no organism survived beyond day 3. However, *M. agalactiae* strains 2290, X-teramo, and 6/5227 were more heat stable at temperatures of 37 and 41 °C and were more in numbers up to day 3.

There was also a slight pH drop of the infected milk with a mean value of 4.20 ± 0.51 from 6.90 ± 0.04 value at day 0 of infection.

The mean log₁₀ ± SD titres of all strains for each temperature at each day of incubation is shown in Fig. 1. The highest temperatures at which threshold numbers of surviving organisms for all strains tested can still be cultured were at 37 and 41 °C at day 2, at which time log 10^{2.2} and log 10^{2.0} numbers of test strains were still alive.

DISCUSSION

Mycoplasma agalactiae is commonly incriminated in epizootica of caprine mastitis (Da Massa et al., 1992; Real et al., 1994). Since mastitis is a limiting factor in goat husbandry, and production, reliability in collection and transportation of clinical specimen(s) such as milk at suitable temperatures is necessary for prompt identification of causative udder pathogens (such as *M. agalactiae*) known to persist for long periods in the affected animal (Cottew, 1979).

The present study which describes the survivability of strains of *M. agalactiae* from different geographical regions at different temperatures has shown that organisms were still recoverable at 41 °C even though the number of live organisms dropped by 4 logs within the last two to five days of incubation. It further shows that storage at 4 °C for up to two days during which some strains still had counts of 10⁴ appears to offer better

I. Origin of strains, mean colony count and infecting dose of *M. agalactiae*

Strains of <i>M. agalactiae</i>	Origin	Mean plate colony count (CFU/ml)	Infecting dose $\frac{3 \times \text{cfu/ml}}{30}$
549	France	1.59×10^8	0.15×10^7
6/5227	Portugal	3.06×10^7	0.30×10^6
4941	Portugal	2.57×10^7	0.25×10^6
X-teramo	Italy	3.3×10^7	0.33×10^6
2290	France	3.08×10^8	0.30×10^7

II. Survivability of strains of *M. agalactiae* in artificially infected caprine milk at different temperatures

Strains of <i>M. agalactiae</i> tested	Log ₁₀ titres (CCU/0.05 ml) of <i>M. agalactiae</i> et each day of incubation					
	0	1	2	3	4	5
4 °C (6.80 ± 0.06; 6.90 ± 0.04)						
2290	7	4	4	3	1	1
X-teramo	6	5	3	2	2	1
4941	6	4	3	3	3	2
6/5227	6	3	2	2	2	2
549	7	4	4	3	2	2
Mean log ₁₀ ± SD	6.40 ± 0.54	4 ± 0.70	3.2 ± 0.80	2.6 ± 0.59	2 ± 0.70	1.6 ± 0.54
Mean room temperature 18.2 °C (4.70 ± 0.19)						
2290	7	4	4	2	2	0
X-teramo	6	3	3	2	1	0
4941	6	2	2	1	0	0
6/5227	6	3	3	1	0	0
549	7	4	3	2	0	0
Mean log ₁₀ ± SD	6.4 ± 0.54	3.2 ± 0.83	3 ± 0.70	1.6 ± 0.83	1.5 ± 0.70	
37 °C (4.20 ± 0.51)						
2290	7	3	3	1	0	0
X-teramo	6	3	2	2	0	0
4941	6	2	1	0	0	0
6/5227	6	2	2	2	0	0
549	7	4	3	0	0	0
Mean log ₁₀ ± SD	6.4 ± 0.54	2.8 ± 0.83	2.2 ± 0.83	1.6 ± 0.57		
41 °C (4.10 ± 0.69)						
2290	7	3	3	2	0	0
X-teramo	6	3	2	2	0	0
4941	6	2	1	0	0	0
6/5227	6	2	2	2	0	0
549	7	3	2	0	0	0
Mean log ₁₀ ± SD	6.4 ± 0.54	2.6 ± 0.54	2 ± 0.70	1.2 ± 1.00		

() = figures in parentheses denotes pH value of infected milk at each temperature

day 0 = day of infection

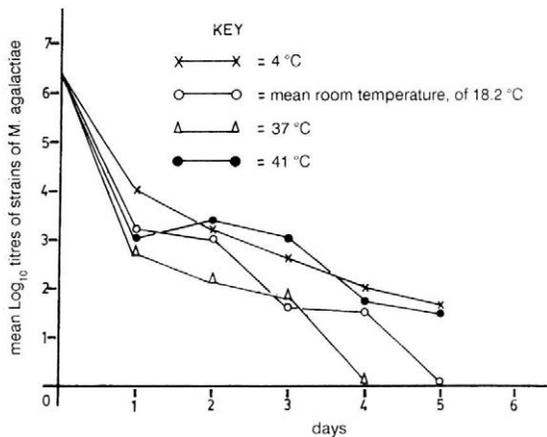
* = mean pH value of infected milk at day 0 = 6.90 ± 0.04

channels of recovery of organisms in infected milk. This is because this count 10^4 (dilution) of the test organisms is usually within the range expected in clinical situations (Andrews and Wise, 1978). Similar observations hold for mean room temperature of 18.2 °C, although the fall in pH of the infected milk to 4.70 ± 0.19 appeared to have affected the survivability of these strains at this temperature.

The deleterious effects of pH on the growth of animal mycoplasmal pathogens has been reported (Rodwell and Mitchell, 1979). Moreover, drop in counts from 10^1 – 10^4 within five months of storage at

23 °C of *M. mycoides* T1–44 vaccine strain has been reported (Ngbede et al., 1994).

The survivability of the test strains at 37 °C and 41 °C do not seem to differ remarkably as other mycoplasmas (*M. mycoides* subsp *mycoides* LC) have survived temperature extremes of 45 °C (Brown and Ambrose, 1990). Although all the strains hardly survived beyond day 3, the gradual decline in count(s) may also have similarly been affected by drop in pH. The likely chances of recovering these strains of mycoplasmas could be due to their mesophilic property like other bacterial organisms (Jawetz, 1991).



1. Mean \log_{10} survivability of all strains tested at different temperatures

The slight variation among strains in their thermostability could perhaps be linked to their genetic composition which could probably account for slight differences in strains in terms of virulence. This observation needs further experimental corroboration and genetic studies.

It is concluded that *M. agalactiae* can possibly be recovered from infected milk and exudates at a temperature of 41 °C.

Acknowledgement

The authors are grateful to R. A. J. Nicholas of the Central Veterinary Laboratory, England who provided the test strains used for this work.

REFERENCES

ADLER, H. E. – DAMASSA, A. J. – BROOKS, D. L. (1980): Caprine mycoplasmosis *Mycoplasma putrefaciens*: A new cause of mastitis in goats. *Am. J. Vet. Res.*, **41**, 1677–1679.

ANDREWS, J. M. – WISE, R. (1978): Antibiotic sensitivity testing. In: REEVES, D. S. – PHILIPS, I. – WILLIAMS, J. A. – WISE, R. (eds.): *Laboratory Methods in Antimicrobial Chemotherapy*. 1st ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, pp. 179–536.

ATALARA, V. – BRANDAO, E. – MACHADO, M. (1986): Contagious agalactiae in Portugal. *Repos. Lab. Nac. Invest. Vet.*, **18**, 13–19.

BRIDRE, J. – DONATIEN, A. (1925): Contagious agalactia. *Ann. Inst. Pasteur. (Paris)*, **39**, 925–951.

BROWN, M. B. – AMBROSE, M. (1990): Caseolytic activity of *M. mycoides* subspecies *mycoides* LC. *Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg.*, **20**, 656–659.

COTTEW, G. S. (1979). In: TULLY, J. G. – WHITCOMB, W. (eds.): *Human and Animal Mycoplasmas*. New York, Academic Press, pp. 106–108.

DaMASSA, A. J. – BROOKS, D. L. – HOLMBERG, C. A. (1984): Pathogenicity of *Mycoplasma capricolum* and *Mycoplasma putrefaciens*; *Israel J. Med. Sci.*, **20**, 975–978.

DaMASSA, A. J. – WAKENELL, P. S. – BROOKS, D. L. (1992): Mycoplasmas of goats and sheep. *J. Diagn. Invest.*, **4**, 101–113.

GOUSLAY, R. N. (1981): Mycoplasmosis in cattle, sheep and goats. *Israel J. Med. Sci.*, **17**, 531–536.

JAWETZ, E. (1991): *A Textbook of Medical Microbiology*. 19th ed. U.S.A., Prentice Hall International Inc., pp. 52–54.

JONES, G. E. (1983): Mycoplasmas of sheep and goats; *A synopsis. Vet. Rec.*, **113**, 619–620.

LAMBERT, M. (1987): Contagious agalactia of sheep and goats. *Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz.*, **6**, 699–711.

NGBEDE, J. E. – GARBA, S. A. – HARUNA, G. – LARMODE, A. G. (1994): The influence of storage temperatures on free-dried T₁ strain of CBPP. *Biomed. Lett.*, **50**, 117–120.

REAL, F. – DENIZ, S. – ACUSTA, B. – FERRER, O. – PROVEDA, J. B. (1994): Caprine contagious agalactia caused by mycoplasma agalactiae in camery Islands. *Vet. Rec.*, **135**, 15–16.

RODWELL, A. W. – MITCHELL, A. (1979): Nutrition, growth and reproduction of mycoplasmas. In: BARILE, M. F. – RAZIN, S. (eds.): *The Mycoplasmas*. New York, Academic Press, pp. 103–139.

SENERFIT, L. B. (1983): Antibiotic sensitivity of mycoplasmas. In: RAZIN, S. – TULLY, G. (eds.): *Methods in Mycoplasmaology*. Vol. 2. New York, Academic Press Inc., pp. 397–401.

Received: 97–10–24

Accepted after correction: 97–12–30

Contact Address:

G. O. Egwu, D.V.M., PhD, M.A.S.M. Faculty of Veterinary Medicine, University of Maiduguri, P.M.B. 1069, Maiduguri, Nigeria
Tel.: + 234 76 23 21 50 ext 30 00

**METHODS OF DETECTION OF ANTHELMINTIC RESISTANCE
IN NEMATODES OF DOMESTIC ANIMALS****METÓDY DETEKČIE ANTIHELMINTICKEJ REZISTENCIE
NEMATÓDOV HOSPODÁRSKÝCH ZVIERAT****M. Várady, J. Čorba***Parasitological Institute of the Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic*

ABSTRACT: The aim of the paper is to review and compare the most important *in vitro* and *in vivo* techniques used for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of domestic animals. The possible routine application of *in vitro* methods in the diagnosis of resistance in field conditions is discussed. In each method its relative advantages and limitations are described. To measure relatively small differences in resistance between parasite strains or to quantitate the level of resistance under field conditions, we recommend the use of the egg hatch assay and larval development assays, which appeared to be the most suitable *in vitro* methods for field screening of anthelmintic resistance. Tests would be carried out together with *in vivo* faecal egg count reduction test to compare and correlate the *in vivo* and *in vitro* results.

anthelmintic resistance; *in vitro/in vivo* methods; nematodes

ABSTRAKT: Cieľom tejto práce je prehľad a porovnanie najdôležitejších *in vitro* a *in vivo* metód, ktoré sa používajú na detekciu rezistencie voči antihelmintikám u nematódov hospodárskych zvierat. Pri každej metóde sú uvedené jej relatívne výhody a nevýhody, ako aj možné využitie v diagnostike rezistencie v terénnych podmienkach. Pri kvantitatívnom určovaní rezistencie v terénnych podmienkach odporúčame používať test liahnutia vajíčok a test vývinu lariev, ktoré sú najvhodnejšími *in vitro* metódami v terénnom prieskume antihelmintickej rezistencie. Obe testy by sa mali používať súčasne s *in vivo* testom redukcie počtu vajíčok v truse pre vzájomné porovnanie *in vivo* a *in vitro* výsledkov.

rezistencia voči antihelmintikám; *in vitro/in vivo* metódy; nematódy**CONTENTS**

1. Introduction
2. *In vivo* methods
 - 2.1. Faecal egg count reduction test
 - 2.2. Controlled test
3. *In vitro* methods
 - 3.1. Egg hatch assay
 - 3.2. Egg hatch paralysis assay
 - 3.3. Larval development assay
 - 3.4. Larval paralysis test
 - 3.5. Larval micromotility test
 - 3.6. Tubulin binding assay
 - 3.7. Biochemical tests
 - 3.8. [¹⁴C] thiabendazole uptake assay
4. Conclusions
5. References

OBSAH

1. Úvod
2. *In vivo* metódy
 - 2.1. Test redukcie počtu vajíčok v truse
 - 2.2. Kontrolovaný test
3. *In vitro* metódy
 - 3.1. Test liahnutia vajíčok
 - 3.2. Test liahnutia a paralýzy lariev
 - 3.3. Test vývinu lariev
 - 3.4. Test paralýzy lariev
 - 3.5. Test pohyblivosti lariev
 - 3.6. Test naviazania larválneho tubulínu
 - 3.7. Biochemické testy
 - 3.8. Test naviazania [¹⁴C] tiabendazolu na larvy
4. Záver
5. Literatúra

1. ÚVOD

Rezistencia voči antihelmintikám u parazitických nematódov hospodárskych zvierat sa stala závažným problémom s ktorým sa v súčasnosti stretáva veterinárna parazitológia. Rezistencia voči antihelmintikám sa týka najmä nematódov malých prežúvavcov a koní (Conder a Campbell, 1995), ale bola tiež zaznamenaná u helmintov hovädzieho dobytku (Eagleson a Bowie, 1986; Jackson a i., 1987) a ošípaných (Roepstorff a i., 1987; Bjørn a i., 1990). Vzhľadom na rýchle rozšírenie antihelmintickej rezistencie vo svete, bolo vyvinutých viacero *in vitro* a *in vivo* metód na jej detekciu. Vo všeobecnosti *in vivo* testy sú časovo náročnejšie, cenovo drahšie a niekedy charakterizované nízkou preukázanosťou výsledkov (presnosť, reprodukovateľnosť), ktorá môže byť zapríčinená rozdielmi vo farmakodynamike liečiv u zvierat. Najpresnejšou metódou na odhad účinnosti antihelmintík je v súčasnosti kontrolovaný test, pri ktorom je percento redukcie počtu adultov nematódov zistené helmintologickou pitvou. Ak berieme do úvahy, že minimálny potrebný počet zvierat v jednej skupine je sedem, čím stanovíme účinnosť jedného typu antihelmintika a údaje porovnáme s kontrolnou skupinou (ďalších sedem zvierat), potom na stanovenie účinnosti jedného liečiva potrebujeme pri tomto teste minimálne 14 zvierat, čo z cenového hľadiska nie je zanedbateľné.

In vitro testy môžeme rozdeliť na dve skupiny, a to farmakologické, kde výsledný efekt je dosiahnutý priamym pôsobením na fyziologické funkcie parazitov (napr. na vajíčka alebo larvy parazitov) a biochemické, pri ktorých vyhodnocujeme vplyv antihelmintika na niektoré biochemické pochody (naviazanie antihelmintika na tubulín lariev alebo naviazanie eserínu na receptory). V zahraničnej odbornej literatúre môžeme nájsť viacero prác, ktoré pojednávajú o využití metód na detekciu rezistencie voči antihelmintikám (Presidente, 1985; Johansen, 1989; Taylor a Hunt, 1989; Hazelby a i., 1994). Cieľom našej práce preto nie je opakovanie známych skutočností, ale poskytnutie informácií o našich skúsenostiach s využitím metód na detekciu rezistencie voči antihelmintikám.

2. IN VIVO METÓDY

2.1. Test redukcie počtu vajíčok v truse

Tento test je najbežnejšou *in vivo* metódou na zisťovanie rezistencie voči antihelmintikám. V terénnej praxi sa používa na detekciu rezistentných kmeňov nematódov voči všetkým druhom antihelmintík. Coles a i., (1992) podrobne opísali postup vykonania testu. Pri teste sa používajú mladé 13 až 16 mesačné zvieratá. Môžu sa použiť aj staršie, ale ovoskopický nález musí byť vyšší ako 150 vajíčok na gram trusu (epg). Osem až desať týždňov pred vykonaním testu nesmie byť zvieratám podané žiadne antihelmintikum. Podľa toho, koľ-

ko antihelmintík chceme testovať, sa zvieratá rozdelia do skupín. V každej skupine je 10 až 15 zvierat. Do pokusu je tiež zahrnutá kontrolná skupina. Od každého zvierata je rektálne odobratý trus v množstve minimálne päť gramov. Vzorky trusu sa dopravujú do laboratória, kde sa presne určí množstvo vajíčok na gram trusu (epg) od každého zvierata modifikovanou metódou podľa McMastera (Coles a i., 1992). Zvieratá sú liečené odporúčanou terapeutickou dávkou v mg na kg živej hmotnosti, ktorú udáva výrobca. Každé zviera musí byť individuálne zvažované.

Vzorky trusu sú po 10 až 14 dňoch znovu odoberané a následne je v laboratóriu stanovené epg. Z dosiahnutých hodnôt sa vypočíta aritmetický priemer, percento redukcie a 95% koeficient spoľahlivosti. Rezistencia je prítomná, ak hodnota percenta redukcie vajíčok v truse je menšia ako 95 a 95% koeficient spoľahlivosti je menší ako 90 %. Ak len jeden z parametrov je pozitívny, možno hovoriť o podozrení na prítomnosť rezistentných kmeňov. Pri pozitívnom výsledku je dôležité určiť rod a druh rezistentného nematóda. Preto sa v oboch prípadoch odoberie aj trus na larválnu kultiváciu a stanoví sa percentuálne zastúpenie jednotlivých druhov nematódov pred aj po odčervení.

2.2. Kontrolovaný test

Test redukcie počtu vajíčok v truse nám však neposkytne informáciu o úbytku pohlavne zreých nematódov, ale len o účinku na plodnosť dospelých samičiek. Pri kontrolovanom teste sa experimentálne zvieratá po invadovaní a odčervení odporážajú a rozdiely sú stanovené na základe pitevného nálezu.

3. IN VITRO METÓDY

3.1. Test liahnutia vajíčok

Názov egg hatch assay je spoločným názvom pre viaceré metódy, ktoré sa používajú na detekciu benzimidazolovej rezistencie. Všetky tieto metódy sú založené na ovoidnej vlastnosti benzimidazolov a schopnosti vajíčok rezistentných kmeňov embryonovať a liahnuť sa vo vyššej koncentrácii benzimidazolového antihelmintika než je to u citlivých kmeňov. Pôvodný test opísal Le Jambré (1976). Odvetvy túto metódu s malými modifikáciami zaviedlo niekoľko ďalších autorov. Súčasne najpoužívanejšou modifikáciou testu, ktorú odporúča Svetová asociácia pre rozvoj veterinárnej parazitológie (W.A.A.V.P.), je metóda podľa autorov Coles a i. (1992). Test liahnutia lariev je najviac používaná *in vitro* metóda na detekciu benzimidazolovej rezistencie v terénnej diagnostike. Kemp a Smith (1982), Cawthorne a Cheong (1984), Boersma a i. (1987), Hong a i. (1992), Praslička a i. (1994) a Várady a i. (1994) používali tento test na stanovenie rezistencie voči benzimidazolovým prí-

ravkom v terénnom prieskume. Jednou zo základných podmienok vykonania testu je schopnosť udržať vajíčka v skorom ranom štádiu vývoja. Coles a Simpkin (1977) odporúčajú používať vajíčka maximálne štyri hodiny staré. Smith-Buijs a Borgsteede (1986) uskladňovali vzorky trusu pri teplote 4 °C. Dokázali, že uskladnenie trusu na 72 hodín nemalo negatívny účinok na vykonanie testu, ani na hodnoty ED₅₀. Hunt a Taylor (1989) odporúčajú k tomuto účelu použiť anaeróbne uskladnenie. Ich výsledky ukázali, že anaeróbne uskladnenie vajíčok nematódov až na sedem dní nemalo významný efekt na hodnoty ED₅₀ v porovnaní s čerstvými vzorkami. Tento spôsob uskladnenia vzoriek sa plne osvedčil pri prieskume výskytu rezistencie voči benzimidazolovým antihelmintikám v chovoch malých prežúvavcov na Slovensku (Praslička a i., 1994). Vajíčka sa z trusu získavajú flotáciou nasýteným roztokom NaCl. Po tejto procedúre sa vajíčka inkubujú pri teplote 27 °C 48 hodín v rôznych riedeniach antihelmintika. Najčastejšie používaným typom antihelmintika je tiabendazol. Po tomto čase je odhadnutý vzájomný percentuálny pomer vyliahnutých lariev a nevyliahnutých vajíčok v jednotlivých riedeniach tiabendazolu. Do testu je zahrnutá aj kontrola, pri ktorej sa vajíčka inkubujú v destilovanej vode. Aby sme vedeli stanoviť koncentráciu tiabendazolu, pri ktorej dochádza k 50% liahnutiu vajíčok (ED₅₀), musíme použiť najmenej päť koncentrácií antihelmintika. Hraničná hodnota podľa autorov Whitlock a i. (1980) je 0,1 mg/ml tiabendazolu. Testované kmene nematódov, ktoré presahujú túto hodnotu, sú všeobecne považované za rezistentné voči benzimidazolom, a kmene ktorých hodnota je pod touto hranicou, sú citlivé na benzimidazolové antihelmintiká. Le Jambre (1979), Barton (1980, 1983), Martin a i. (1982, 1984) a Presidente (1985) opisujú metódu ako citlivú a vhodnú pre zisťovanie benzimidazolovej rezistencie. Na druhej strane Martin a i. (1989) uvádzajú nemožnosť detekovať rezistenciu týmto testom, ak sa v populácii testovaných helmintov nachádza menej ako 25 % (*Trichostrongylus* spp.) a menej ako 50 % (*Ostertagia* spp.) rezistentných jedincov. Z tohto dôvodu skoré štádia rezistencie s nízkym počtom rezistentných helmintov sú týmto testom prakticky nedokázateľné. Donald (1985) uvádza, že test je vhodnejší na laboratórnu diagnostiku rezistencie než na terénny prieskum. Presidente (1985) uprednostňuje test liahnutia lariev pred *in vivo* testom redukcie počtu vajíčok v truse a uvádza, že je rýchlejší, citlivejší a ekonomickejší. Na základe našich skúseností s týmto testom môžeme potvrdiť predchádzajúce tvrdenia s tým, že nakoľko pri nízkych hladinách rezistencie test nie je schopný odhaliť rezistenciu (Váraday a i., 1995b) je potrebné pri terénnom prieskume použiť aj iné *in vitro* a *in vivo* testy.

3.2. Test liahnutia a paralýzy lariev

Dobson a i. (1986) opísali test, ktorý je založený na paralýze lariev prvého štádia. V kontraste s pred-

chádzajúcim testom sú vajíčka inkubované v prírodných podmienkach až do počiatku liahnutia lariev. Po získaní vajíčok z trusu sa tieto inkubujú pri teplote 26 °C v destilovanej vode. Asi po 16 hodinách pri druhoch *Haemonchus contortus* a *Trichostrongylus colubriformis* a 15 hodinách u druhov *Ostertagia* spp. sa začnú liahnuť larvy prvého štádia (Dobson a i., 1986). Optimálny čas pre prídanie antihelmintika je približne jedna hodina pred počiatkom liahnutia. Pri teste je dôležité, aby všetky vajíčka boli v rovnakom štádiu vývinu, preto aby bol presne odhadnutý počiatok liahnutia. To sa zabezpečuje uskladnením trusu pri teplote 4 °C (*Haemonchus contortus* 10 °C). Všetky roztoky, s ktorými pracujeme, musia mať tiež túto teplotu. Po pridaní liečiva sa inkubácia predĺži o šesť hodín. Po tomto čase sa odčítá percento vyliahnutých lariev a nevyliahnutých vajíčok. Z údajov sa vypočíta hodnota ED₅₀. Hraničná hodnota pri tomto teste je 1,0 mg/ml levamisolu. Hodnoty pod touto koncentráciou odpovedajú citlivým kmeňom, kým hodnoty nad rezistentným kmeňom nematódov. Okrem spomínaných autorov, je v literatúre veľmi málo údajov o používaní tohto *in vitro* testu. Jedine Sangster a i. (1988), Bjørn a i. (1991) a N'damukong a Sewell, (1992) použili tento test na stanovenie rezistencie na levamisol. Test sa zdá byť pomerne presný, ale náročný na odhad časového úseku pre prídanie liečiva, čo sa nedá urobiť bez predchádzajúcich skúseností s prevedením tohto testu. Metóda je pomerne rýchla s jednoduchým pracovným postupom, ale limitujúcimi faktormi pri použití tohto testu sú správne načasovanie prídania liečiva k testovanej vzorke vajíčok, ako aj značná variabilita dosiahnutých výsledných hodnôt ED₅₀ (Váraday a i., 1995a, 1996). Z týchto dôvodov test neodporúčame používať pre terénnu diagnostiku rezistencie.

3.3. Test vývinu lariev

Metóda je založená na schopnosti lariev prežívať a vyvíjať sa v prostredí s rôznou koncentráciou antihelmintika. Coles a i. (1988) prvýkrát opísali test, pri ktorom sa vajíčka získané z trusu inkubujú 24 hodín vo vodných roztokoch pri teplote 27 °C. Po tejto perióde je pridané antihelmintikum spolu so živým médiom pre vyvíjajúce sa larvy. Ako médium sa používa lyofilizovaný kmeň *E. coli* (kmeň W). Vývin lariev prebieha v plastických Petriho miskách o priemere 5 cm ešte ďalších päť dní pri teplote 27 °C. Priemer Petriho misiek je v tomto prípade dôležitý z dôvodu dodržania výšky vodného stĺpca inkubovanej kvapaliny. Pri dodržaní tohoto parametra majú vyvíjajúce sa larvy dostatočný prístup vzdušného kyslíka čo je rozhodujúcim faktorom ich vývinu (Taylor, 1990). Po skončení inkubácie sa určí percentuálne zastúpenie lariev L1, L2 a L3 štádia v jednotlivých koncentráciách antihelmintika, ako aj v kontrolách bez antihelmintika. Taylor (1990) použil v teste ako zdroj potravy médium zložené z Earle's rovnovážneho soľného roztoku a kvasinkové-

ho extraktu. Výsledky testu sa vyjadrujú ako minimálna inhibičná koncentrácia, ktorá zabráni vývoju lariev do L3 invázneho štádia – M.I.C. (minimum inhibitory concentration). Test spoľahlivo detekuje benzimidazolovú a levamizolovú rezistenciu. Hraničná minimálna inhibičná koncentrácia pre benzimidazol je 0,1 mg/ml tiabendazolu a pre levamizol 1,0 mg/ml. Znamená to, že larvy ktoré sa vyvinuli až do L3 invázneho štádia v koncentráciách vyšších ako sú uvedené hodnoty, sú považované za rezistentné na testované antihelmintikum.

Hubert a Kerboeuf (1992) a Lacey a i. (1991) opísali mikrolarválnu skúšku vývinu lariev, ktorá je založená na rovnakých princípoch s tým rozdielom, že po skončení testu sa vypočíta hodnota LD₅₀ pri ktorej 50 % lariev dospeje do tretieho invázneho štádia. Skúška spoľahlivo detekovala okrem benzimidazolej a levamizolovej rezistencie aj rezistenciu na ivermektín u druhu *Haemonchus contortus*. Test bol úspešne použitý na detekciu rezistencie u malých strongylátov u koní (Várady a Čorba, 1997) ako aj u nodulárnych červov *Oesophagostomum* spp. u ošipáných (Várady a i. 1996, 1997).

Výhoda tohto testu je v možnosti súčasne zistiť účinnosť dvoch širokospektrálnych antihelmintík. Nezanedbateľnou výhodou je aj skutočnosť, že vzorky trusu sa nemusí špeciálne uskladňovať nakoľko liečivo sa pridáva až k L1 larvám. Druhá, resp. rodová identifikácia L3 lariev, je omnoho jednoduchšia a presnejšia ako identifikácia vajčiek alebo L1 lariev enterostrongylátov. Z nevýhod je možné spomenúť časovú dĺžku testu (sedem dní), ako aj potrebu osvojenia postupu pri diferenciálnej diagnostike L3 lariev. Problémy môžu nastať aj pri premnožení bakteriálnej mikroflóry. Aj napriek týmto nevýhodám je to test podľa našich skúseností vhodný pre terénnu diagnostiku rezistentných nematódov malých prežúvavcov u koní.

3.4. Test paralýzy lariev

Bol to prvý test, ktorý bol vyvinutý na detekciu levamizolovej a morantel tartratovej rezistencie (Martin a Le Jambre, 1979). Základným princípom testu je určiť percento paralyzovaných lariev L3 štádia v rôznych koncentráciách antihelmintika. Odčítaniu testu predchádza 24 hodinová inkubácia lariev pri teplote 18 až 20 °C v roztokoch antihelmintika. Larvy sa pozorujú mikroskopicky pri 40 násobnom zväčšení a definujú sa ako žijúce (pohyb) alebo paralyzované (pohyb nie je pozorovaný v intervale päť sekúnd). Aby výsledky mohli byť navzájom porovnané je potrebné okrem rezistentného kmeňa otestovať aj citlivý kmeň. Geerts a i. (1989) za účelom štúdia spoľahlivosti testu larválnej paralýzy odhadli vplyv rôznych parametrov na výsledky testu za použitia rezistentného a citlivého kmeňa *Ostertagia ostertagi*. Skúmali nasledujúce parametre: vplyv rozličných osôb vykonávajúcich test, vplyv rôzneho množstva testovaných lariev, rôznej inkubačnej čas (24, 48 a 72 hodín), inkubačnú teplotu (20 a 25 °C),

a časový usek odhadujúci paralýzu lariev (5 alebo 15 sekúnd). Vo všetkých skúmaných parametroch nezistili štatisticky významné odchýlky od štandardného prevedenia testu. Odvtedy ako Martin a Le Jambre (1979) opísali *in vitro* test larválnej paralýzy, boli publikované viaceré práce s protichodnými výsledkami, ktoré spochybňovali spoľahlivosť testu. Boersema (1983) udáva určité problémy s reprodukovateľnosťou testu zapríčinenou reverzibilitou paralyzovaných lariev a tiež časovým intervalom, pri ktorom sa larvy pozorujú. Barton (1983) tiež uvádza netypickú odpoveď lariev na antihelmintikum, pri ktorej pri vyšších koncentráciách liečiva odpočítal nižšie percento paralytických lariev ako pri nižších koncentráciách. Barton (1983) test úspešne uskutočnil s kmeňom *Ostertagia* spp., avšak test nedal uspokojivé výsledky s ostatnými kmeňmi enterostrongylátov. V kontraste s týmito výsledkami Bauer (1983) a Geerts a i. (1989) neuvádzajú žiadne problémy v prevedení testu. Coles a i. (1975) poukazujú na reverzibilitu paralýzy pri *Nippostrongylus brasiliensis* vyvolanu levamizolom. Podľa našich meraní (Várady, nepublikované údaje), ak sa čas inkubácie predĺži na 42 alebo 72 hodín, dochádza k výraznej zmene percentuálnych pomerov živých a paralyzovaných lariev. Test je časovo nenáročný, lebo výsledky sa získajú do 24 hodín a samotné vykonanie testu si nevyžaduje predchádzajúci zácvik. Výsledné odčítavanie lariev môže byť ovplyvnené určitou subjektivitou v rozhodovaní či larva je alebo nie je paralyzovaná. Na základe našich skúseností nemôžeme odporúčať test pre terénnu diagnostiku rezistencie voči levamizolovým preparátom z dôvodu rôznej citlivosti testu na rôzne druhy gastrointestinálnych nematódov (Várady a i., 1998).

Gill a i. (1991) študovali vplyv ivermektínu na paralýzu lariev u druhu *Haemonchus contortus*. Invázne larvy L3 štádia rezistentné na ivermektín mali zníženú citlivosť na toto liečivo, čo viedlo k zníženej motilite, až k paralýze lariev. Larvy boli inkubované na agare obsahujúcom ivermektín. Výsledky vyjadrené ako hodnoty LP₅₀ (koncentrácia liečiva pri ktorej paralyzuje 50 % lariev) boli porovnané u štyroch citlivých a štyroch rezistentných kmeňov. Rezistentný faktor $RF = LP_{50}$ rezistentných kmeňov/LP₅₀ citlivých kmeňov bol u rezistentných kmeňov 3,4 až 22, čo predstavuje u tohoto testu pomerne presnú detekciu rezistentných kmeňov *Haemonchus contortus*. Ďalším testom ktorý je založený na schopnosti lariev pohybovať sa je migračno-inhibičný test (Wagland a i., 1992; Rothwell a Sangster, 1993). Pri tomto teste infekčné larvy, ktoré sú vystavené účinku antihelmintika svojou mobilnou schopnosťou voľne prechádzajú cez sitá z jednej komôrky do druhej. Rothwell a Sangster (1993) pomocou tejto metódy dokázali detekovať rezistenciu u druhu *H. contortus* voči všetkým trom širokospektrálnym antihelmintikám. Princíp metódy migrácie infekčných lariev *H. contortus* z agarového gélu použil d'Assonville a i. (1996) ako metódu pre detekciu ivermektín rezistentných línii.

3.5 Test pohyblivosti lariev

Test pohyblivosti lariev je založený na princípe merania pohyblivosti lariev špeciálnym prístrojom – mikromotilitymetrom. Princíp a príprava lariev je podobná ako pri teste paralýzy lariev podľa autorov Martin a Le Jambre (1979), kde infekčné larvy sú pred samotným meraním vystavené účinku antihelminatika po dobu 24 hodín.

Bennett a Pax (1986) opisujú vo svojej práci prístroj na meranie pohyblivosti lariev a dospelých nematódov. Aparátom bola meraná motilita u lariev parazitov *Nippostrongylus brasiliensis* a *Ascaris suum* v prítomnosti rôznych koncentrácií antihelminetik. Po 48 hodinovej expozícii boli namerané výrazne znížené hodnoty motility u obidvoch druhoch. Základný princíp práce mikromotilitymetra je nasledovný: Testovaná vzorka môže obsahovať médium s larvami alebo bez lariev (slepá vzorka slúžiaca ako kontrola). Bodový zdroj svetla, nachádzajúci sa pod skúmavkou, vysiela lúč svetla, ktorý prechádza cez vrstvu lariev umiestnených na dne skúmavky alebo len cez médium (kontrola) až k menisku kvapaliny. Keď svetlo narazí na meniskus, časť z neho sa odrazí smerom k fotodióde umiestnenej priamo oproti menisku. Signál z fotodiódy je potom zosilnený zosiľovačom a dostáva sa do digitálneho konvertora. Digitálny signál je tvorený napätím, ktoré je vysielať každých $15 \cdot 10^{-3}$ s mikroprocesorom. Mikroprocesor určí odchýlku od priemerného signálu, ktorý je tvorený pri prechode svetla cez médium (kontrola). Táto odchýlka je mikroprocesorom vyjadrená ako index pohyblivosti. Mikroprocesor je napojený na osobný počítač spracúvajúci štatistickú analýzu údajov. V prítomnosti lariev na dne skúmavky svetlo je viac alebo menej rozptýlené vrstvou pohybujúcich sa parazitov. Toto rozptýlenie vytvorí signál 10 až 100 násobne väčší ako signál vytvorený pri prestupe svetla v skúmavke bez parazitov. Preto aj výsledný index pohyblivosti môže byť 10 až 100 násobne väčší v závislosti od pohyblivosti testovaných lariev, čo má priamu súvislosť s odolnosťou lariev na testované liečivo.

Folz a i. (1987a,b) merali motilitu L3 lariev *Haemonchus contortus* a *Trichostrongylus colubriformis*. Vyhodnotením pomocou mikromotilitymetra poukázali na určité rozdiely v dosiahnutých výsledkoch. Pri porovnaní citlivých a benzimidazol rezistentných druhov *Haemonchus contortus* zaznamenali významné rozdiely len pri niektorých benzimidazolových derivátoch, a pri určitých koncentráciách antihelminatika. Coles a i. (1989) porovnávali motilitu citlivých a levamisol/benzimidazol rezistentných lariev *Haemonchus contortus*. Po inkubácii v levamisole nezaznamenali významné rozdiely medzi testovanými kmeňmi. Ak izoláty inkubovali, v ivermektíne dosiahli významné rozdiely pri dvoch koncentráciách, hoci obidva kmene boli na ivermektín citlivé. Na základe nami získaných výsledkov u *Oesophagostomum* spp., nodulárnych červov u ošpaných (Várady a i., 1998) ako aj u nematódov oviec *O. circumcincta* a *H. contortus* (Várady

a Čorba, v tlači) nemôžeme odporučiť test ako vhodnú metódu na detekciu rezistencie u nematódov malých prežúvavcov a ošpaných.

3.6. Test naviazania larválneho tubulínu

Skúška je založená na vlastnosti benzimidazolov naviazať rôzne množstvo tubulínu pripraveného z citlivých a rezistentných kmeňov nematódov (Lacey a Pritchard, 1986). Test opísali Lacey a Snowdon (1988). Rezistencia na benzimidazoly sa pri tejto metóde prejavuje zníženou schopnosťou liečiva naviazať štruktúrally protein (tubulín) u rezistentných izolátov. V teste sa používa čistý extrakt tubulínu, ktorý je vyrobený z adultov, infekčných lariev alebo z vajčiek. Tubulín sa inkubuje s benzimidazolovým karbamátom (mabendazolom), ktorý je značený trícium $[^3\text{H}]$ až do dosiahnutia rovnováhy. Voľné liečivo je potom odstránené uhlíkom a trícium-benzimidazol-tubulínový komplex je meraný pomocou kvapalinového spektrofotometra. Koncentrácia proteínu (mg/vzorku) je vypočítaná ako množstvo naviazaného, trícium značeného benzimidazolu. Tubulín z rezistentných izolátov naviaže menej liečiva než tubulín pripravený z citlivých kmeňov nematódov. Test je pomerne rýchly, prevedenie nevyžaduje viac ako dve hodiny, citlivý už pri malých zmenách v stave rezistencie parazitov, ale pomerne náročné na prístrojové vybavenie a chemikálie.

3.7. Biochemické testy

Porovnanie citlivých a rezistentných kmeňov *Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcincta* a *Trichostrongylus colubriformis* poukazuje na fakt, že u inváznych kmeňov rezistentných voči benzimidazolovým liečivám sa nachádzajú významne vyššie množstvá acetylcholinesterázy (AChE) než je to u lariev citlivých kmeňov nematódov (Sutherland a i., 1988; Sutherland a Lee, 1989, 1993). Sutherland a i. (1988) popísali štyri biochemické testy na detekciu benzimidazolovej rezistencie založené na porovnaní medzi nešpecifickými esterázami a acetylcholinesterázami rezistentných a citlivých kmeňov. Metódy sú pomerne presné, citlivé, nenáročné a ponúkajú možnosti detekcie rezistentných kmeňov aj u zmiešanej populácie.

Prvým biochemickým spôsobom stanovenia rezistentných kmeňov nematódov je izoelektrická fokusácia homogénatú pripraveného z lariev L3 štádia. Následné farbenie pre detekciu nešpecifickej aktivity esterázy má za následok zafarbenie pásov enzymatickej aktivity u rezistentných kmeňov. Tieto zóny u citlivých kmeňov chýbajú. Prítomnosť týchto zón poukazuje na kvantitatívne zvýšenie zafarbenia esteráz u kmeňov odolných k benzimidazolom. Na základe poznatku, že u rezistentných kmeňov je prítomná vyššia aktivita bola vyvinutá jednoduchá kolorimetrická skúška (Sutherland a Lee, 1989). Pri tejto metóde môžu byť výsledné vzorky porovnávané vizuálne alebo pomocou

denzometra. Princíp testu bol odvodený od testu, ktorý sa používa na detekciu rezistencie na organofosfátové alebo karbamátové insekticídy u dospelých múch. Esterázová aktivita je vyhodnotená prídáním vzorky homogenizovaných lariev k roztoku, ktorý ofarbujú nešpecifické esterázy.

Ďalšou kolorimetrickou metódou je test porovnávajúci acetylcholinesterázovú aktivitu u rezistentných a citlivých kmeňov. Enzymová aktivita je aj pri tomto teste signifikantne väčšia u rezistentných kmeňov.

Najjednoduchšou metódou založenou na princípe esterázových rozdielov je modifikácia testu larválnej paralýzy, ktorý bol pôvodne vyvinutý na zisťovanie rezistencie voči levamisolu a morantelu (Martin a Le Jambre, 1979). Sutherland a Lee (1989) inkubovali larvy rezistentných kmeňov v roztoku 1 mM eserínu (physostigmine). V päťminútových intervaloch po dobu 60 minút odčítavali všetky pohyblivé a nepohyblivé larvy pri teplote 18 až 20 °C. Rezistentné a citlivé kmene možno identifikovať podľa dĺžky časového intervalu pri ktorom nastáva paralýza lariev. Rezistentné kmene začínajú v roztokoch eserínu paralyzovať pomalšie než citlivé kmene, pretože obsahujú viac acetylcholinesterázy. Test je pomerne ľahko realizovateľný, rýchly, s výsledkami dosiahnutými do jednej hodiny. Zvýšenú pozornosť musíme venovať príprave 1 mM roztoku eserínu pretože, ide o jedovatú substanciu. U kmeňa *H. contortus* je citlivosť vyššia ako u *O. circumcincta* (Sutherland a Lee, 1990; Várady a Čorba, v tlači) čo môže byť zapríčinené medzidruhovými rozdielmi v množstvách AChE u spomínaných kmeňov (Ogilvie a i., 1973). Test v jeho terajšom prevedení nie je vhodný pre terénnu diagnostiku antihelmintickej rezistencie.

3.8. Test naviazania [¹⁴C] tiabendazolu na larvy

Sangster a Prichard (1984) pri tomto teste používali infekčné larvy *Trichostrongylus colubriformis*. Tieto boli inkubované pri 28 °C 24 hodín v prítomnosti uhlíkom rádioaktívne značeného tiabendazolu. Po inkubácii boli larvy štyrikrát premyté od zvyškov nenaviazaného [¹⁴C] tiabendazolu a vzorka bola odčítaná na scintilačnom spektrofotometri. Množstvo liečiva naviazaného na larvy bolo vyjadrené ako množstvo častíc na 100 lariev (cpm). Stupeň naviazania tiabendazolu u rezistentných kmeňov bol vyšší ako naviazanie na citlivé kmene.

4. ZÁVER

Správne a presné určenie rezistentných nematódov je prevenciou proti rozšíreniu rezistentných kmeňov parazitov, ako aj umožní vopred určiť opatrenia, ktoré spočívajú predovšetkým v dodržiavaní zásad správneho používania antihelmintík (Praslička a Čorba, 1995). Na našom pracovisku sme sa počas uplynulých rokov snažili nájsť také *in vitro* metódy, ktoré by bolo

možné použiť aj v našich podmienkach. Zistili sme, že pri terénnom prieskume rezistentných kmeňov nematódov malých prežúvavcov a koní musíme použiť viac *in vitro* testov a výsledok ešte potvrdiť *in vivo* testom redukcie počtu vajíčok v truse. Vhodným testom pre detekciu rezistencie voči antihelmintikám zo skupiny benzimidazolov a levamisolu v terénnych podmienkach sa ukázal test vývinu lariev (Taylor, 1990). Odporúčame ho používať súčasne s testom liahnutia lariev (Coles a i., 1992). V prípade, ak je aspoň jeden z nich pozitívny, je dôležité vykonať *in vivo* test redukcie počtu vajíčok v truse, ktorý potvrdí alebo vyvráti nálež rezistentných kmeňov nematódov.

5. LITERATÚRA

- BARTON, N. J. (1980): Emergence of *Haemonchus contortus* resistant to thiabendazole. Aust. Vet. J., 56, 46–47.
- BARTON, N. J. (1983): Development of anthelmintic resistance in nematodes from sheep in Australia subjected to different treatment frequencies. Int. J. Parasitol., 13, 125–132.
- BAUER, C. (1983): Anthelminthika – Resistenz: Problem-beschreibung und *in vitro* Untersuchungen. [Inaugural-Dis-sertation.] Hannover, pp. 166–207.
- BENNETT, J. L. – PAX, R. A. (1986): Micromotility meter: an instrument designed to evaluate the action of drugs on motility of larval and adult nematodes. Parasitology, 93, 341–346.
- BJORN, H. – ROEPSTORFF, A. – WALLER, P. J. – NANSEN, P. (1990): Resistance to levamisole and cross resistance between pyrantel and levamisole in *Oesophagostomum quadrispinulatum* and *Oesophagostomum dentatum* of pig. Vet. Parasitol., 37, 21–30.
- BJORN, H. – MONRAD, J. – NANSEN, P. (1991): Anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Denmark with special emphasis on levamisole resistance in *Ostertagia circumcincta*. Acta Vet. Scand., 32, 145–154.
- BOERSEMA, J. H. (1983): Possibilities and limitations in the detection of anthelmintic resistance. In: BORGSTEEDE, F. H. M. – HENRIKSEN, A. – OVER, H. J. (eds.): Facts and Reflections IV. Resistance of Parasites to Anthelmintic. Central Veterinary Institute, Netherlands, pp. 207–216.
- BOERSEMA, J. H. – BORGSTEEDE, F. H. M. – EYSKER, M. – HENDRIKX, W. M. L. – JANSEN, J. – SMITH-BUYS, C. M. C. (1987): Prevalence of benzimidazol resistance of nematodes in sheep in The Netherlands. Res. Vet. Sci., 43, 18–21.
- CAWTHORNE, R. J. G. – CHEONG, F. H. (1984): Prevalence of anthelmintic resistant nematodes in sheep in south-east England. Vet. Rec., 114, 562–564.
- COLES, G. C. – SIMPKIN, K. G. (1977): Resistance in nematode eggs to the oxicidal activity of benzimidazoles. Res. Vet. Sci., 22, 386–387.
- COLES, G. C. – EAST, G. M. – JENKINS, N. (1975): The mechanism of action of the anthelmintic levamisole. Gen. Pharmacol., 66, 309–313.
- COLES, G. C. – TRITSCHLER, I. J. P. – GIORDANO, D. J. – LASTE, N. J. – SCHMIDT, A. L. (1988): A larval de-

- velopment test for detection of anthelmintic resistant nematodes. Res. Vet. Sci., 45, 50–53.
- COLES, G. C. – FOLZ, D. – TRITSCHLER, I. J. P. (1989): Motility response of levamisole/benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* larvae. Vet. Parasitol., 31, 253–257.
- COLES, G. C. – BAUER, C. – BORGSTEEDE, F. H. M. – GEERTS, S. – KLEI, T. R. – TAYLOR, M. A. – WAALLER, P. J. (1992): World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Vet. Parasitol., 44, 35–44.
- CONDER, G. A. – CAMPBELL, W. C. (1995): Chemotherapy of nematode infections of veterinary importance, with special reference to drug resistance. Adv. Parasit., 35, 1–84.
- D'ASSONVILLE, J. A. – JANOVSKY, E. – VERSTER, A. (1996): *In vitro* screening of *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance. Vet. Parasitol., 61, 73–80.
- DOBSON, R. J. – DONALD, A. D. – WALLER, P. J. – SNOWDON, K. L. (1986): An egg hatch assay for resistance to levamisole in trichostrongyloid nematode parasite. Vet. Parasitol., 19, 77–84.
- DONALD, A. D. (1985): Research priorities in anthelmintic resistance. In: ANDERSON, N. – WALLER, P. J. (eds.): Resistance in nematodes to anthelmintic drug. Melbourne, CSIRO, pp. 171–186.
- EAGLESON, J. – BOWIE, J. Y. (1986): Oxfendazol resistance in *Trichostrongylus axei* in cattle in Australia. Vet. Rec., 119, 604.
- FOLZ, D. – PAX, R. A. – THOMAS, E. M. – BENNETT, J. L. – LEE, B. L. – CONDER, G. A. (1987a): Development and validation of an *in vitro* *Trichostrongylus colubriformis* motility assay. Int. J. Parasitol., 17, 1441–1444.
- FOLZ, D. – PAX, R. A. – THOMAS, E. M. – BENNETT, J. L. – LEE, B. L. – CONDER, G. A. (1987b): Motility response of benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* larvae to several anthelmintic. Proc. Helminthol. Soc. Wash., 54, 249–253.
- GEERTS, S. – BRANDT, J. – BORGSTEEDE, F. H. M. – VAN LOON, H. (1989): Reliability and reproducibility of the larval paralysis test as an *in vitro* method for the detection of anthelmintic resistance of nematodes against levamisole and morantel tartrate. Vet. Parasitol., 30, 223–232.
- GILL, J. H. – REDWIN, J. H. – VAN WYK, J. A. – LACEY, E. (1991): Detection of resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. Int. J. Parasitol., 21, 771–776.
- HAZELBY, C. A. – PROBERT, A. J. – ROWLANDS, D. A. T. (1994): Anthelmintic resistance in nematodes causing parasitic gastroenteritis of sheep in the UK. J. Vet. Pharmacol. Ther., 17, 245–252.
- HONG, C. – HUNT, K. R. – HARRIS, T. J. – COLES, G. C. – GRIMSHAW, W. T. R. (1992): A survey of benzimidazole resistance nematodes in sheep in three countries of southern England. Vet. Rec., 131, 5–7.
- HUBERT, J. – KERBOEUF, D. (1992): A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. Vet. Rec., 130, 442–446.
- HUNT, K. R. – TAYLOR, M. A. (1989): Use of the egg hatch assay on sheep faecal samples for the detection of benzimidazole resistant nematodes. Vet. Rec., 125, 153–154.
- JACKSON, R. A. – TOWNSEND, K. G. – PYKE, C. – LANCE, D. M. (1987): Isolation of oxfendazole resistant *Coope-ria oncophora* in cattle. New Zeal. Vet. J., 35, 187–189.
- JOHANSEN, M. V. (1989): An evaluation of techniques used for the detection of anthelmintic resistance in nematode parasites of domestic livestock. Vet. Res. Comm., 13, 455–466.
- KEMP, G. K. – SMITH, C. F. (1982): Anthelmintic resistance survey in New Zealand. New Zeal. Vet. J., 30, 141–144.
- LACEY, E. – PRICHARD, R. K. (1986): Interactions of benzimidazoles (BZ) with tubulin from BZ-sensitive and BZ-resistant isolates of *Haemonchus contortus*. Mol. Biochem. Parasit., 9, 171–181.
- LACEY, E. – SNOWDON, K. L. (1988): A routine diagnostic assay for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes using tritiated benzimidazole carbamate. Vet. Parasitol., 27, 309–324.
- LACEY, E. – REDWIN, J. M. – GILL, G. H. – DEMARGHERITI, V. M. – WALLER, P. J. (1991): A larval development assay for the simultaneous detection of broad spectrum anthelmintic resistance. In: BORAY, J. C. – MARTIN, P. J. – ROUSH, R. T. (eds.): Resistance of Parasites to Antiparasitic Drug. Rahway, MSD AGVET, pp.177–184.
- LE JAMBRE, L. F. (1976): Egg-hatch as *in vitro* assay of thiabendazole resistance in nematodes. Vet. Parasitol., 2, 385–391.
- LE JAMBRE, L. F. (1979): Effectiveness of anthelmintic treatments against levamisole-resistant *Ostertagia*. Aust. Vet. J., 55, 65–67.
- MARTIN, P. J. – LE JAMBRE, L. F. (1979): Larval paralysis as an *in vitro* assay of levamisole and morantel tartrate resistance in *Ostertagia*. Vet. Res. Commun., 3, 159–164.
- MARTIN, P. J. – ANDERSON, N. – JARRET, R. G. – BROWN, T. H. – FORD, G. E. (1982): Effects of a preventive and suppressive control scheme on the development of thiabendazole-resistance in *Ostertagia* spp. Aust. Vet. J., 58, 185–190.
- MARTIN, P. J. – ANDERSON, N. – LWIN, T. – NELSON, G. – MORGAN, T. E. (1984): The association between frequency of thiabendazole treatment and the development of resistance in field isolates of *Ostertagia* spp. of sheep. Int. J. Parasitol., 14, 177–181.
- MARTIN, P. J. – ANDERSON, N. – JARRETT, R. G. (1989): Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and *in vitro* assays. Aust. Vet. J., 66, 236–240.
- N'DAMUKONG, K. J. N. – SEWELL, M. M. H. (1992): Resistance to benzimidazole anthelmintics by trichostrongyles in sheep and goats in North-West Cameroon. Vet. Parasitol., 41, 335–339.
- OGLIVIE, B. M. – ROTHWELL, T. L. W. – BREMNER, K. C. – SCHNITZERLING, H. J. – NOLAN, J. – KEITH, R. K. (1973): Acetylcholinesterase secretion by parasitic nematode I. Evidence for secretion of the enzyme by a number of species. Int. J. Parasitol., 3, 589–597.
- PRASLIČKA, J. – ČORBA, J. (1995): Rezistencia voči antihelmintikám u nematódov oviec a kôz. Vet. Med. – Czech, 40, 257–260.
- PRASLIČKA, J. – VÁRADY, M. – ČORBA, J. – VESELÝ, L. (1994): The first survey of anthelmintic resistance in Slovakia. Vet. Parasitol., 52, 169–171.

- PRESIDENTE, P. J. A. (1985): Methods for detection of nematode resistance to anthelmintic. In: ANDERSON, N. – WALLER P. J. (eds.): Resistance in Nematodes to Anthelmintics drug. Melbourne, CSIRO, 13–28.
- ROEPSTORFF, A. – BJØRN, H. – NANSEN, P. (1987): Resistance of *Oesophagostomum* spp. in pigs to pyrantel citrate. *Vet. Parasitol.*, 24, 229–239.
- ROTHWELL, J. T. – SANGSTER, N. C. (1993): An *in vitro* assay utilizing parasitic larval *Haemonchus contortus* to detect resistance to closantel and other anthelmintics. *Int. J. Parasitol.*, 23, 573–578.
- SANGSTER, N. C. – PRICHARD, R. K. (1984): Uptake of thiabendazole and its effect on glucose uptake and carbohydrate levels in the thiabendazole-resistant and susceptible *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.*, 14, 121–126.
- SANGSTER, N. C. – RILEY, F. L. – COLLINS, G. H. (1988): Investigation of mechanism of levamisole resistance in trichostrongylid nematodes of sheep. *Int. J. Parasitol.*, 18, 813–818.
- SMITH-BUIJS, C. M. C. – BORGSTEEDE, F. H. M. (1986): Effect of cool storage of faecal samples containing *Haemonchus contortus* eggs on the results of an *in vitro* egg development assay to test for anthelmintic resistance. *Res. Vet. Sci.*, 40, 4–7.
- SUTHERLAND, I. A. – LEE, D. L. (1989): Colorimetric assay for the detection of benzimidazole resistance in trichostrongyles. *Res. Vet. Sci.*, 46, 363–366.
- SUTHERLAND, I. A. – LEE, D. L. (1990): A larval paralysis assay for the detection of thiabendazole resistance in trichostrongyles. *Parasitology*, 100, 131–135.
- SUTHERLAND, I. A. – LEE, D. L. (1993): Acetylcholinesterase in infective-stage larvae of *Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* resistant and susceptible to benzimidazole anthelmintics. *Parasitology*, 107, 553–557.
- SUTHERLAND, I. A. – LEE, D. L. – LEWIS, D. (1988): Detection of benzimidazole resistance in trichostrongylid nematodes. *Parasitol. Today.*, 4, 22–24.
- TAYLOR, M. A. (1990): A larval development test for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of sheep. *Res. Vet. Sci.*, 49, 198–202.
- TAYLOR, M. A. – HUNT, K. R. (1989): Anthelmintic drug resistance in the United Kingdom. *Vet. Rec.*, 125, 143–147.
- VÁRADY, M. – ČORBA, J. (1997): Resistance of equine small strongyles to benzimidazoles in Slovak Republic. *Helminthologia*, 34, 81–85.
- VÁRADY, M. – ČORBA, J.: Comparison of six *in vitro* tests in determining benzimidazole and levamisole resistance in *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* of sheep. *Vet. Parasitol.*, (v tlači)
- VÁRADY, M. – PRASLIČKA, J. – ČORBA, J. (1994): Treatment of multiple resistant field strain of *Ostertagia* spp. in cashmere and angora goats. *Int. J. Parasitol.*, 24, 335–340.
- VÁRADY, M. – PRASLIČKA, J. – ČORBA, J. (1995a): Changes of ED₅₀ in *in vitro* egg hatch assay for detection of benzimidazole and levamisole resistance of *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta*. *Helminthologia*, 32, 219–223.
- VÁRADY, M. – PRASLIČKA, J. – ČORBA, J. (1995b): The evaluation of *in vivo* faecal egg count reduction test and *in vitro* egg hatch test for detection of benzimidazole resistance in sheep nematodes. *Helminthologia*, 32, 225–228.
- VÁRADY, M. – BJØRN, H. – NANSEN, P. (1996): *In vitro* characterization of anthelmintic susceptibility of field isolates of the pig nodular worm *Oesophagostomum* spp. susceptible or resistant to various anthelmintics. *Int. J. Parasitol.*, 26, 733–740.
- VÁRADY, M. – BJØRN, H. – CRAVEN, J. – NANSEN, P. (1997): *In vitro* characterization of lines of *Oesophagostomum dentatum* selected or not selected for resistance to pyrantel, levamisole and ivermectin. *Int. J. Parasitol.*, 27, 77–81.
- VÁRADY, M. – ČORBA, J. – HRČKOVÁ, G. (1998): *In vitro* motility response of third stage larvae *Oesophagostomum* spp. of pigs to different anthelmintics. *Vet. Res. Commun.*, 22, 299–304.
- WAGLAND, B. M. – JONES, W. O. – HRIBAR, L. – BENDIXSEN, T. – EMERY, D. L. (1992): A new simplified assay for larval migration inhibition. *Int. J. Parasitol.*, 22, 1183–1185.

Received: 98–06–12

Accepted after corrections: 98–08–18

Kontaktná adresa:

MVDr. Marián Várady, CSc., Parazitologický ústav Slovenskej akadémie vied, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovenská republika

Tel. +421 95 633 14 11, fax +421 95 633 14 14, e-mail: varady@saske.sk

CONFERENCE ON THE PHYSIOLOGY OF FOOD AND FLUID INTAKE

KONFERENCE O ŘÍZENÍ PŘÍJMU POTRAVY A TEKUTIN

The Institute of Physiology, Medical School of the Pécs University in Hungary hosted the Joint Meeting of the XIIIth International Conference on the Physiology of Food and Fluid Intake and the Annual Meeting of the Society for the Study of Ingestive Behavior (ICPFFI XII-SSIB '98) on July 5 to 8, 1998. The program had a wide range of special symposia, covering new areas of research, several oral and two poster sessions. A total of 209 communications were presented to an audience of peers counting some 200 participants.

The symposia covered the following topics: roles of leptin in the central regulation of feeding, central mechanisms of sodium appetite, metabolism and appetite in humans, hormonal and transmitter regulation of salt and water intake, osmoregulation: food and fluid intake, molecular approaches to mechanisms of weight control system, cortical information processing of flavors in the primate brain, roles of bombesin in the regulation of ingestive behavior, microstructure of ingestive behavior, neuropeptide Y in the regulation of feeding, metabolic control of feeding, brainstem mechanisms of ingestive behavior and their relationship to hypothalamic and other forebrain areas, clinical

aspects of nutrition, clinical aspects of diabetes mellitus, anorexia by cytokines and immunomodulators, and mechanisms of food reward.

The conference brought new insights into many areas of research such as multiple functions of NPY, leptin, interactions among neurotransmitters, neuromodulators and cytokines, functions of brain nuclei, analyses of satiety, using state-of-the-art methods.

There were also several presentations dealing with farm animals such as horse, sheep, swine and poultry. Although the conference aimed at many basic topics – satiety and hunger, thirst, and questions largely connected with human ingestion problems such as obesity, anorexia nervosa, consumption of alcohol, there is no doubt that application of new knowledge is interesting for veterinary sciences as well.

The Local Organizing Committee headed by Professor László Lénárd and Dr. Zoltán Karádi did an excellent job in providing a good working atmosphere and pleasant location coupled with stylish social events and well-known Hungarian hospitality. All of this was appreciated by participants who travelled far for this exciting meeting.

Poznání procesů zapojených do regulace příjmu potravy a tekutin je důležité jak pro medicínu humánní, nejnověji zejména v souvislosti s léčbou obezity, tak pro medicínu veterinární. Významným ukazatelem zdravotního stavu zvířat jsou změny hmotnosti, podmíněné změnami konzumu krmiv. Proto je i pro nás zajímavá konference, která se konala ve dnech 5. až 8. července 1998 v maďarském Pécsi.

Bylo to spojené zasedání XII. mezinárodní konference o fyziologii příjmu potravy a tekutin a výroční zasedání Společnosti pro studium ingesčního chování (Joint Meeting of the XIIIth International Conference on the Physiology of Food and Fluid Intake and the Annual Meeting of the Society for the Study of Ingestive Behavior (ICPFFI XII-SSIB '98).

Organizace této náročné akce pro více než 200 účastníků se nejen velmi dobře zhostili pracovníci fyziologického ústavu Lékařské fakulty v Pécsi, ale předložili i řadu zajímavých sdělení.

Konference sestávala z řady sympozií, krátkých sdělení a dvou plakátových sekcí. Přednášky v sympoziích byly věnovány těmto okruhům otázek: úlohy leptinu

v centrální regulaci příjmu potravy, centrální mechanismy sodíkového apetitu, metabolismus a apetit člověka, řízení příjmu sodíku a vody hormony a neurotransmitery, umami (japonský výraz pro chuť monosodium glutamátu, tradičně užívaného v japonské kuchyni): receptory, percepce a konzum potravy, osmoregulace: příjem potravy a vody. Další den bylo jednáno o molekulárních přístupech k mechanismům kontrolních systémů hmotnosti: apetitu, nutričního chování a výdeje energie, o zpracování kortikálních informací o chuti v mozku primátů, o úlohách bombesinu v řízení ingesčního chování, o mikrostruktuře ingesčního chování, základních mechanismech a klinické aplikaci, o úloze neuropeptidu Y (NPY) v řízení příjmu potravy, o mozkových mechanismech podmíněné chuťové averze; poslední den pak byly přednášky sympozií věnovány metabolické kontrole příjmu potravy, periferním a centrálním mechanismům, mechanismům mozkového kmene v ingesčním chování a jejich vztah k hypothalamu a jiným oblastem mozku, klinickým aspektům výživy, diabetes mellitus, anorexii vyvolané cytokiny a imunomodulátory, mechanismy potravní odměny.

Zvláštní sympozium měli mladí vědečtí pracovníci, jejichž sdělení byla komisí SSIB vybrána a odměněna účastí na tomto zasedání. Krátká sdělení byla k témátům: chuť, orosenzorické funkce, příjem potravy a vody u člověka, neuropeptidy; metabolické kontroly, cytokiny a jiné regulační faktory, leptin, osmoregulace, aminokyseliny. Plakátových sdělení bylo 74, celkem bylo prezentováno přes 200 sdělení.

Mimo to proslovil James T. Fitzsimons slavnostní přednášku o úloze reninu a angiotenzinu u příležitosti svého vyznamenání SSIB za celoživotní dílo ve fyziologii a J. E. Steiner přehlednou přednášku o chemosenzorické hedonice člověka.

Sympozium věnované leptinu poukázalo na některé ze složitých interakcí tohoto proteinu, hormonu derivovaného z adipocytů bílé i hnědé tukové tkáně, odkud se dostává do krevního oběhu ve volné i vázané formě, vstupuje do mozku, váže se na receptory a působí na celé předivo faktorů řídících ingesční chování, hmotnost tukové tkáně a energetickou rovnováhu vedle neuroendokrinních funkcí. Jeho anorexigenní efekt se projevuje na několika místech v CNS. Zajímavá sdělení odezněla na sympoziu i ve volných přednáškách o NPY; vyplynulo z nich zapojení tohoto anabolického

neuropeptidu, ba celého NPY systému do dalších behaviorálních okruhů jako je reprodukce, odpověď na stress, chuťová averze, chování v nemoci. Oblast výzkumu cytokinů v nutričním chování byla na konferenci zastoupena pracemi, které dokládají vzájemné potencionování účinků cytokinů, jejich interakce s neurotransmitery i neuromodulátory při ovlivňování konzumu, analyzována byla komunikace mezi stěvem a mozkem během anorexie, indukce spánku a horečky. Konzum potravy byl popsán jako antigenní stimul pro lokální imunitní odpověď v GIT.

Jen několik studií se věnovalo vývojovým otázkám ingesčního chování člověka nebo zvířat. Mimo tradičních experimentálních druhů zvířat, potkanů, myší a opic odezněly referáty o skotu, koních, prasatech, ovčích a drůbeži. I do této oblasti fyziologie pronikly metody molekulární biologie, např. exprese cFos proteinu v různých oblastech mozku po indukci žízní nebo po aplikaci látek ovlivňujících konzum potravy či tekutin. Pozornost byla věnována analýze stavů sytosti a hladu.

Konference byla přehledkou stavu specializovaného poznání v oblasti fyziologie, která je dnes předmětem intenzivního zkoumání.

E. Baranyiová,

*Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno*

POKYNY PRO AUTORY

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

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

O uveřejnění práce rozhoduje redakční rada časopisu, a to se zřetelem k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu a kvalitě práce. Redakce přijímá práce imprinované 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 úhozů na řádku, mezi řádky dvojitě mezery). K rukopisu je vhodné přiložit disketu s textem práce, popř. s grafickou dokumentací pořízenou na PC s uvedením použitého programu. Tabulky, grafy a fotografie se dodávají zvlášť, nepodlepují se. Na všechny přílohy musí být odkazy v textu.

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

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

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

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

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

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

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

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

Literatura citovaná v textu práce se uvádí jménem autora a rokem vydání. Do seznamu se zařadí jen publikace citované v textu. Citace se řadí abecedně podle jména prvního 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 u 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 keywords and comprise base numerical data including statistical data.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

VETERINARY MEDICINE – CZECH

Volume 43, No. 11, November 1998

CONTENTS

Řeháček J., Kocianová E., Kováčová E., Kapitančík B., Jurčina A., Naď O., Ličko P.: Occurrence of bovine coxiellosis in the district of Bardejov, Eastern Slovakia.....	325
Horký D., Illek J., Pechová A.: Distribution of heavy metals in calf organs (in English).....	331
Egwu G. O., Aliyu M. M., Ameh J. A.: Survivability of <i>Mycoplasma agalactiae</i> strains in caprine milk (in English).....	343
REVIEW ARTICLE	
Várady M., Čorba J.: Methods of detection of anthelmintic resistance in nematodes of domestic animals	347
INFORMATION	
Baranyiová E.: Conference on the Physiology of Food and Fluid Intake.....	355

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 43, č. 11, Listopad 1998

OBSAH

Řeháček J., Kocianová E., Kováčová E., Kapitančík B., Jurčina A., Naď O., Ličko P.: Výskyt kokielózy hovädzieho dobytku v okrese Bardejov na východnom Slovensku.....	325
Horký D., Illek J., Pechová A.: Distribuce těžkých kovů v orgánech telat.....	331
Egwu G. O., Aliyu M. M., Ameh J. A.: Přežívání kmenů <i>Mycoplasma agalactiae</i> v kozím mléku.....	343
PŘEHLED	
Várady M., Čorba J.: Metódy detekcie antihelmintickej rezistencie nematódov hospodárskych zvierat...	347
IFORMACE	
Baranyiová E.: Konference o řízení příjmu potravy a tekutin.....	355

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA ● Vydává Ústav zemědělských a potravinářských informací ● Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38 ● Sazba: Studio DOMINO – ing. Jakub Černý, Bří. Nejedlých 245, 266 01 Beroun, tel.: 0311/229 59 ● Tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1998

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

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

12

VOLUME 43
PRAHA
DECEMBER 1998
CS ISSN 0375-8427

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

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

Editorial Board – Redakční rada

Chairman – Předseda

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

Members – Členové

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

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. MUDr. Drahomír Horký, DrSc., Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

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

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

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

Prof. MUDr. M. V. Nermut, PhD., DSc. (h. c.), National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom

Prof. MUDr. MVDr. h. c. Leopold Pospíšil, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Prof. RNDr. Václav Suchý, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Bohumil Ševčík, DrSc., BIOPHARM – Research Institute of Biopharmacy and Veterinary Drugs, a. s., Jílové u Prahy, Czech Republic

Prof. MVDr. Zdeněk Věžník, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Editor-in-Chief – Vedoucí redaktorka

Ing. Zdeňka Radošová

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

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

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

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

Přijímání rukopisů: Rukopisy ve třech vyhotoveních je třeba zaslat na adresu redakce: Ing. Zdeňka Radošová, vedoucí redaktorka, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz. Podrobné pokyny pro autory lze vyžádat v redakci.

Informace o předplatném: Objednávky na předplatné jsou přijímány pouze na celý rok (leden–prosinec) a zasílají se na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací, vydavatelské oddělení, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 1998 je 624 Kč.

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

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

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

Acceptance of manuscripts: Three copies of manuscript should be addressed to: Ing. Zdeňka Radošová, editor-in-chief, Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz. Applications for detailed instructions for authors should be sent to the editorial office.

Subscription information: Subscription orders can be entered only by calendar year (January–December) and should be sent to: Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Subscription price for 1998 is 145 USD (Europe), 152 USD (overseas).

THE MORPHOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF THE PARS COSTALIS AND PARS LUMBALIS DIAPHRAGMAE IN LAMBS

MORFOHISTOCHEMICKÁ ANALÝZA PARS COSTALIS A PARS LUMBALIS DIAPHRAGMAE U JEHNĀT

M. Zobundžija¹, Renata Novak¹, Z. Kozarić¹, D. Mihelić¹, A. Brkić²

¹ Department of Anatomy, Histology and Embryology, Veterinary Faculty, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

² Clinic of Surgery, Orthopedics and Ophthalmology, Veterinary Faculty, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

ABSTRACT: Samples of the *pars costalis* and *pars lumbalis diaphragmae* of 20 male lambs, the crossbreds of Istrian ewes and Sardinian rams, aged 2–3 months, were taken to examine the diameter of their muscle fibres, the content of connective tissue, the activity of lactic (LDH) and succinic (SDH) dehydrogenases, phosphorylase as well standard, alkaline and acid stable myosin adenosine triphosphatase (ATP-ase). In the *pars lumbalis* there were 30.4% large, 46.3% medium and 23.3% small diameter fibres while in the *pars costalis* there were 12.0% large, 55.5% medium and 32.5% small diameter fibres. A relatively higher amount of connective tissue was observed in the *pars costalis*. The activity of dehydrogenases and phosphorylase was present in all fibres and the dehydrogenase activity was intense or moderate. In the *pars lumbalis* there were 39.1% strongly and 60.9% moderately LDH active fibres and 47.3% strongly and 52.7% moderately SDH active fibres. In the *pars costalis* there were 44.8% strongly and 55.2% moderately LDH active fibres and 47.7% strongly and 52.3% moderately SDH active fibres. As regards the ATP-ase activity the fast fibres (type II) prevail in both phrenic parts and they made 61.7% in the *pars costalis* and 53.8% in the *pars lumbalis*.

diaphragm; *pars costalis* and *pars lumbalis*; muscle fibre diameter; histochemical activity; lambs

ABSTRAKT: Ke zjiřtování průměru svalových vláken, obsahu pojivové tkáně, aktivity mléčné (LDH) a jantarové (SDH) dehydrogenázy, fosforylázy, dále standardní, alkalické a kyselá stabilní myosinové adenosintrifosfatázy (ATP-ase) jsme odebrali vzorky *pars costalis* a *pars lumbalis diaphragmae* od 20 beránků, kříženců istrijských bahnic a sardinských beránů, ve věku dvou až tří měsíců. *Pars lumbalis* obsahovala 30,4 % vláken s velkým průměrem, 46,3 % se středním průměrem a 23,3 % s malým průměrem, zatímco *pars costalis* obsahovala 12,0 % vláken s velkým průměrem, 55,5 % se středním průměrem a 32,5 % s malým průměrem. Relativně větší množství pojivové tkáně bylo zjiřeno v *pars costalis*. Aktivita dehydrogenáz a fosforylázy se vyskytovala ve všech vláknech, přičemž aktivita dehydrogenáz byla vysoká nebo nízká. *Pars lumbalis* obsahovala 39,1 % vláken s vysokou a 60,9 % vláken s nízkou aktivitou LDH, 47,3 % vláken s vysokou a 52,7 % vláken s nízkou aktivitou SDH. *Pars costalis* obsahovala 44,8 % vláken s vysokou a 55,2 % vláken s nízkou aktivitou LDH, 47,7 % vláken s vysokou a 52,3 % vláken s nízkou aktivitou SDH. Pokud se jedná o aktivitu ATP, v obou částech bránice převládají rychlá vlákna (II. typu) a jejich podíl činí 61,7 % v *pars costalis* a 53,8 % v *pars lumbalis*.

bránice; *pars costalis* a *pars lumbalis*; průměr svalového vlákna; histochemická aktivita; jehňata

INTRODUCTION

Numerous investigations of the phrenic muscle fibres in the domestic, wild and laboratory animals (Bullard, 1919; Günter, 1952; Ogata, 1958; Padykula and Gauthier, 1963; Gauthier and Padykula, 1966; Davies and Gunn, 1972; Yellin, 1972; Hraste and Jukić-Brestovec, 1977; Hraste, 1978; Hraste et al., 1978; Hraste and Kozarić, 1983; Alečković and Zobundžija, 1983; Green et al., 1984; Zobundžija

et al., 1989, 1994) have shown that the phrenic muscle was built up of fibres of different diameter with a stronger or weaker activity of oxidative enzymes, phosphorylase and myosin adenosine triphosphatase. In this was observed that the fibres of a smaller diameter were characteristic of animals of a higher metabolism and of a higher frequency of breathing and they have shown the strong activity of oxidative enzymes. The fibres of a bigger diameter were characteristic of animals of a lower metabolism and of a lower frequency of breathing and these fibres have shown the combined

metabolism (Gauthier and Padykula, 1966; Davies and Gunn, 1972). Most of these investigations relate to the costal phrenic part while only a little of them concern the lumbar part. So differences in the structure and metabolic characteristics between the costal and lumbar phrenic parts were found in horses (Zobundžija et al., 1989, 1994), and we wanted to know if these two phrenic parts differ between themselves morphologically and metabolically in lambs, in which the respiratory function was present while some nonrespiratory functions, like rumination, were getting on.

MATERIAL AND METHODS

The investigation was carried out on samples of the *pars costalis* and *pars lumbalis diaphragmae* of 20 male lambs, crossbreds of Istrian ewes and Sardinian rams. The samples of *pars costalis* were taken near by the 10th rib and of *pars lumbalis* at the beginning of the right diaphragmatic crus. The samples were frozen in liquid nitrogen, cut on the „Cryo-cut“ into 10 µm thick slices which were stained with hematoxylin and eosin to expose the muscle structure and the diameter of phrenic muscle fibres, and after van Gieson to demonstrate the content of connective tissue (Roméis, 1968), as well the activity of lactic and succinic dehydrogenases (Hess et al., 1958), phosphorylase (Takeuchi and Kuriaki, 1955) and standard, alkaline and acid stable adenosine triphosphatase (Padykula and Herman, 1955; modified by Brook and Kaiser, 1970; Tuxen, 1990).

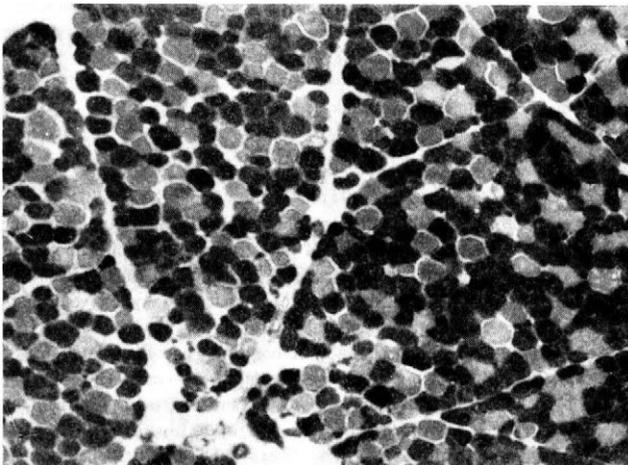
RESULTS

Both phrenic parts consist of heterogeneous population of muscle fibres with regard to the diameter and with domination of the medium size muscle fibres. In

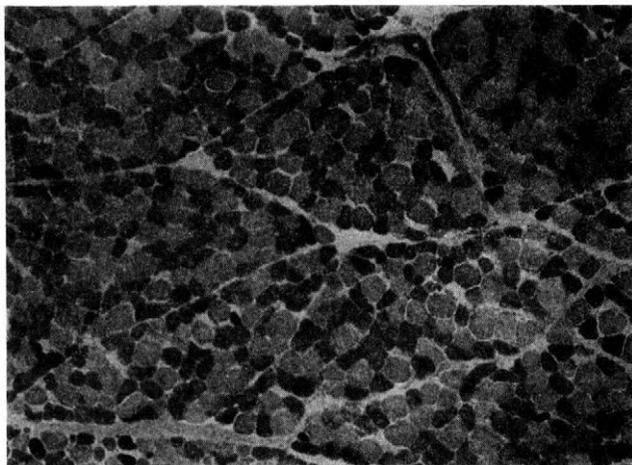
the lumbar part the fibre diameter size was from 10 to 65 µm and there were 30.4% large, 46.3% medium and 23.3% small diameter fibres. In the costal part the fibre diameter size was also from 10 to 65 µm, and there were 12.0% large, 55.5% medium and 32.5% small diameter fibres. Relatively higher content of connective tissue was found in the costal part. The activity of oxidative enzymes was present in all muscle fibres, like moderate or strong. The LDH activity was moderate in 60.9% and strong in 39.1% fibres of the lumbar part but moderate in 55.2% and strong 44.8% fibres of the costal part. The SDH activity was very similar in both phrenic parts. There were 52.7% moderately and 47.3% strongly active fibres in the lumbar part but 52.3% moderately and 47.7% strongly active fibres in the costal part. The activity of LDH and SDH was strong in almost all fibres of the large diameter. The phosphorylase activity was present in all phrenic muscle fibres. The activity of alkaline stable ATP-ase (pH 9.4) was present in 61.7% fibres of the *pars costalis* (Fig. 1) and in 53.8% fibres (Fig. 2) in the *pars lumbalis* (type II fibres) while acid stable ATP-ase (pH 4.3) was found in 38.3% fibres in the *pars costalis* and in 46.2% fibres in the *pars lumbalis* (type I fibres). Almost all muscle fibres of the large diameter have shown the activity of acid stable ATP-ase and they belong to the slow fibres (type I).

DISCUSSION

The investigations have shown that the *pars muscularis diaphragmae* in lambs was built up heterogeneously in regard to the fibre diameters. Though, in both phrenic parts the fibres of medium diameter prevail, there were more large diameter fibres in the lumbar than in the costal part. The large diameter fibres possess the strong activity of both dehydrogenases and acid stable ATP-ase and they belong mostly to the



1. Lamb, *pars costalis diaphragmae*, ATP-ase 9.4. Magn. 10 x 2.5; dark: fast muscle fibres (type II), light: slow muscle fibres (type I)



2. Lamb, *pars lumbalis diaphragmae*, ATP-ase 9.4. Magn. 10 x 2,5; dark: fast muscle fibres (type II), light: slow muscle fibres (type I)

type I fibres. In the lumbar phrenic part there were more large diameter fibres, more type I fibres as well more fibres with the medium LDH activity, while in the phrenic costal part there were more medium and small diameter fibres, more type II fibres and more fibres with the strong LDH activity. The activity of SDH was almost the same in both phrenic parts. These differences point out to the existence of functional distinctions between the lumbar and costal phrenic parts. The costal part serves mostly during the calm breathing while the lumbar part serves mostly during the forced breathing and during the nonrespiratory actions, upon which indicates numerosness of the large diameter fibres with a higher tension potential.

Since we are dealing with the very young animals the findings of the large diameter fibres, mostly of type I, could speak for the initial hypertrophy of some muscle fibres connected with the transition of lambs to the ruminants. To push a heavier rumen back during the inspiration and a gradual inclusion of the diaphragm in the act of rumination needs muscle fibres with a bigger and bigger tension strength and because of that the muscle fibres of larger diameter prevail in the lumbar phrenic part. On the contrary, in the horse's lumbar phrenic part, fibres of a smaller diameter prevail and in the horse's costal phrenic part, fibres of a bigger diameter prevail (Zobundžija et al., 1994) and it means that in horses the lumbar part mostly serves during the calm breathing while the costal part mostly serves during the forced breathing and during the nonrespiratory actions.

REFERENCES

ALEČKOVIĆ, ZLATA – ZOBUNDŽIJA, M. (1983): Prilog poznavanju utjecaja oksitetraciklina na aktivnost nekih mitohondrijskih enzima u različitim mišićima kunića. *Vet. Arhiv. (Suppl.)*, 55, 17–20.

BROOK, M. H. – KAISER, K. (1970): The myosin adenosine triphosphatase system: The nature of their pH lability and sulphhydryl dependence. *J. Histochem. Cytochem.*, 18, 670–672.

BULLARD, H. H. (1919): Histological as related to physiological and chemical differences in certain muscles of cat. *John Hopkins Hosp. Rep.*, 18, 323–328.

DAVIES, A. – GUNN, H. M. (1972): Histochemical fibre types in mammalian diaphragm. *J. Anat.*, 112, 41–60.

GAUTHIER, G. G. – PADYKULA, H. A. (1966): Cytological studies of fiber types in skeletal muscle. A comparative studies of the mammalian diaphragm. *J. Cell. Biol.*, 28, 333–354.

GREEN, H. J. – REICHMANN, H. – PETTE, D. (1984): Inter- and intraspecies comparisons of fibre type distribution and succinate dehydrogenase activity in type I, IIA and IIB fibres of mammalian diaphragms. *Histochemistry*, 81, 67–73.

GÜNTHER, P. G. (1952): Die morphologischen Grundlagen der Bewegungs- und Haltleistung (Tetanus und Tonus) der Zwerchfells. *Acta Anat.*, 14, 54–64.

HESS, R. S. – SCARPELLI, G. – PEARSE, A. E. G. (1958): The cytochemical localization of oxidative enzymes. II. Pyridine nucleotide-linked dehydrogenases. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4, 753–768.

HRASTE, A. (1978): Raspored i sadržaj mioglobina u caput *longum m. tricipitis brachii* i u *pars costalis diaphragmae* svinje i goveda. *Folia Anat. Jugosl.*, 8, 107–112.

HRASTE, A. – JUKIĆ-BRESTOVEC, VERA (1977): Morfološke osobitosti i enzimatska aktivnost u *pars costalis diaphragmae* u goveda. *Vet. Arhiv*, 47, 103–113.

HRASTE, A. – KOZARIĆ, Z. (1983): Aktivnost nekih metabolički značajnih enzima u *pars costalis diaphragmae* srne (*Capreolus caprolus* L.). *Vet. Arhiv*, 53, 23–27.

HRASTE, A. – BABIĆ, K. – BEGO, U. – JUKIĆ-BRESTOVEC, VERA (1978): Histokemijska aktivnost nekih oksidativnih enzima u *pars costalis diaphragmae* srne. *Folia Anat. Jugosl.*, 8, 55–61.

OGATA, T. (1958): A histochemical study of red and white muscle fibres. *Acta Med. Okayama*, 12, 216–227.

- PADYKULA, H. A. – GAUTHIER, G. F. (1963): Cytochemical studies of adenosine triphosphatase in skeletal muscle fibres. *J. Cell. Biol.*, 18, 87–107.
- PADYKULA, H. A. – HERMAN, E. (1955): The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. *J. Histochem. Cytochem.*, 3, 170–195.
- ROMEIS, B. (1968): *Mikroskopische Technik*. München und Wien, Oldenburg Verlag.
- TAKEUCHI, T. – KURIAKI, H. (1955): Histochemical detection of phosphorylase in animal tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 3, 133–160.
- TUXEN, A. (1990): Effect of varying the preincubation and incubation temperature on the reaction pattern for myosin ATP-ase in rat skeletal muscle. *Acta Anat.*, 139, 161–163.
- YELLIN, H. (1972): Differences in histochemical attributes between diaphragm and hind leg muscles of the rat. *Anat. Rec.*, 173, 333–340.
- ZOBUNDŽIJA, M. – KOZARIĆ, Z. – ALEČKOVIĆ, ZLATA – BRKIĆ, A. (1989): Histo enzymatic characteristics of muscle fibres in the horse's *pars costalis* and *pars lumbalis diaphragmae*. *Vet. Arhiv*, 59, 193–202.
- ZOBUNDŽIJA, M. – BEGO, U. – MITIN, V. – ŽIGIĆ, ZLATA (1994): Some histoquantitative observations of the horse diaphragm. *Period. Biol.*, 96, 169–172.

Received: 98–06–17

Accepted: 98–08–28

Contact address:

Prof. Dr. Mladen Zobundžija, Department of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Heinzelova 55, 10 000 Zagreb, Croatia
Phone: +385 1 239 02 40, Fax: +385 1 21 46 97

ORNITHOSIS OF MUNICIPAL PIGEONS *COLUMBA LIVIA F. DOMESTICA* GONE WILD IN KOŠICE

ORNITÓZA U MESTSKÝCH ZDIVOČENÝCH HOLUBOV *COLUMBA LIVIA F. DOMESTICA* V KOŠICIACH

L. Čisláková¹, Z. Dietzová², H. Prokopčáková¹

¹ Institute of Epidemiology, Faculty of Medicine, P. J. Šafárik University, Košice, Slovak Republic

² National Health Institute, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: Authors present results of investigations of municipal populations of pigeons *Columba livia f. domestica* gone wild, living in Košice, by complement-binding reaction microtechnique method using genero-specific antigen *Chlamydia psittaci* (Bioveta, Ivanovice na Hané, Czech Republic). Pigeons were trapped in historic part of the city of Košice in the lofts of ancient buildings with damaged roofs and unclosed dormers in January and April 1997. Investigations of 292 pigeon sera showed 43.1% of positive animals in titre 1 : 16 and higher. From titre 1 : 8 46.2% sera were positive. High frequency of antibodies and high levels to the titre 1 : 2 048 (Tab. I) were found. Regarding health risk of disease transmitted to humans and protection of buildings and monuments in the case of outbreak of pigeons, it is necessary to accept more pressing forms of their regulation. The results presented here demonstrate that municipal populations of pigeons *Columba livia f. domestica* gone wild living in Košice are much infected by *Chlamydia psittaci*.

Columba livia f. domestica; Chlamydia psittaci; ornithosis

ABSTRAKT: Autori prezentujú výsledky vyšetrení mestských populácií zdivočených holubov *Columba livia f. domestica*, žijúcich v Košiciach, mikrometódou komplement-viažucej reakcie za použitia rodovo špecifického antigénu *Chlamydia psittaci* fy Bioveta, Ivanovice na Hané, Česká republika. Holuby boli odchyťované v historickej časti mesta Košice na poválach starých budov s poškodenými strechami, s neuzatvorenými strešnými oknami v mesiacoch január a apríl 1997. Vyšetrením 292 sér holubov bolo zistených 43,1 % pozitívnych v titre 1 : 16 a vyššie. Od titra 1 : 8 bolo 46,2 % sér pozitívnych. Zistená bola vysoká frekvencia protilátok i vysoké hladiny až do titra 1 : 2 048 (Tab. I). Vzhľadom na zdravotné riziko ochorenia ľudí i ochrany stavebných pamiatok v prípade premnoženia holubov je potrebné pristúpiť k dôraznejším formám ich regulácie. Uvedené výsledky dokazujú, že mestské populácie zdivočených holubov *Columba livia f. domestica*, žijúce v Košiciach, sú *Chlamydia psittaci* značne infikované.

Columba livia f. domestica; Chlamydia psittaci; ornitóza

ÚVOD

Mestské populácie zdivočených holubov sú potomkovia holubov skalných (*Columba livia*), žijúcich v západnej a južnej Európe, severnej Afrike a Prednej Ázii. Stali sa súčasťou synantropnej fauny všetkých miest, kde nachádzajú dostatok potravy a priaznivé podmienky na hniezdenie, pretože tu nemajú prirodzených nepriateľov, nežijú tu dravce. Holuby, ako i iné vtáky, nachádzajú práve v historických častiach miest z ekologického hľadiska najvhodnejšie podmienky. Následkom toho sa však často premnožujú a spôsobujú značné škody na domovom fonde, historických budovách, ľudskom zdraví a v hospodárstve. Pôsobia však aj potešenie zo živej prírody. Viaceré práce publikované vo svetovej aj našej literatúre poukazujú na ich škodlivosť v mestských aglomeráciách. Údaje o premorenosti ho-

lubov na ornitózu v Bratislave uvádza Řeháček a i. (1976, 1984), Kmety (1977), Kociánová a i. (1993), v Brne Pikula a i. (1981), Folk a Zapletal (1980), Hudec (1977), Věžník a i. (1996, 1997), Pospíšil a i. (1996), v Prahe Roedl (1996). Holuby sú infikované rôznymi zárodkami patogénymi pre človeka aj zvieratá, najčastejšie chlamýdiami (Kmety, 1977), ktoré sú rozšírené v celej živočíšnej ríši, a to medzi teplotokrvnými i studenokrvnými živočíchmi, dokonca i medzi bezstavovcami (Barron, 1988). Zistený bol výskyt protilátok aj u drobných zemných cicavcov (Čisláková a i., 1993).

Do rodu *Chlamydia* sú v súčasnosti zahrnuté štyri druhy: *Chlamydia trachomatis*, *Ch. psittaci*, *Ch. pneumoniae* a *Ch. pecorum*.

Ornitóza-psitakóza je akútne horúčkavité ochorenie s rôznymi klinickými prejavmi, prebiehajúce od inapa-

rentných infekcií cez miernejšie, chrípku pripomínajúce formy, až po ťažké pneumónie so sepsou, končiace často smrteľne pri neliečených alebo náležite neliečených prípadoch. Priebeh ochorenia závisí od vlastností kmeňa *Ch. psittaci* vyvolávajúceho infekciu, pravdepodobne v súvislosti s prameňom nákazy, a od veku postihnutých. U starších osôb je priebeh ochorenia ťažší. Časté sú relapsy ochorenia v dôsledku perzistencie jeho pôvodcu v ľudskom organizme, čo môže viesť k stavu nosičstva a vylučovania chlamýdií sputom ešte niekoľko mesiacov po prekonaní infekcie. *Ch. psittaci* infikuje človeka cez respiračný trakt, potom je prenesená k retikuloendoteliálnym bunkám sleziny a pečene, kde sa rozmnoží a napadá pľúca a iné orgány hemato-

ver 1962; Lenette a Schmidt, 1974). Za pozitívne sme považovali protilátky od titra 1 : 16 s doplnkovým údajom pozitIVITY od titra 1 : 8. Použitý bol rodovo špecifický antigén *Chlamydia psittaci* pre KVR (Bioveta Ivanovice na Hané, Česká republika).

VÝSLEDKY

Výšetrením 292 mestských holubov bolo zistených 126 (43,1 %) pozitívnych sér v titre 1 : 16. Od titru 1 : 8 bolo 46,2 % holubov pozitívnych. Zistená bola vysoká frekvencia protilátok i vysoké hladiny až do titru 1 : 2 048 (Tab. I).

I. Protilátky proti *Chlamydia psittaci* u holubov odchytených v Košiciach – Antibodies against *Chlamydia psittaci* in pigeons trapped in Košice

Odchyt ¹	Počet vyšetrených ²	Pozitívne ³		Výška titrov ⁴								
		počet ⁵	%	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 502	1 : 1 024	1 : 2 048
Január ⁶ 1997	133	62	46,6	7	20	14	12	1	2	–	6	–
Apríl ⁷ 1997	159	73	45,9	2	10	14	1	7	6	11	22	2
Spolu ⁸	292	135	46,2	9	30	28	13	8	8	11	28	2

Poznámka – Note:

Od titra 1 : 8 pozitívnych 135, t.j. 46,2 % – from titre 1 : 8 positive 135, i.e. 46.2%

Od titra 1 : 16 pozitívnych 126, t.j. 43,1 % – from titre 1 : 16 positive 126, i.e., 43.1%

¹trapping, ²number of examined, ³positive, ⁴level of titres, ⁵number, ⁶January, ⁷April, ⁸total

génnou cestou. Pri nepneumonickej forme ochorenia je široké spektrum klinických prejavov s ich neprítomnosťou zo strany dýchacieho systému.

Infikované vtáky vylučujú chlamýdie sekrétom z horných ciest dýchacích a trusom. K prenosu infekcie na človeka dochádza najčastejšie vzdušnou cestou, pričom sa pôvodca nákazy dostáva na sliznicu dýchacieho traktu, prípadne spojivky. Stačí krátky pobyt v priestore, v ktorom sa nachádzajú vtáky vylučujúce chlamýdie. Pri prenose sa môže uplatniť aj perie a aerosol. Zriedka sa môže nákaza preniesť alimentárne a pripúšťa sa aj možnosť infekcie po poranení pri pitve (Strauss a i., 1965), pretože pôvodca infekcie sa nachádza vo vnútorných orgánoch vtákov.

Z uvedeného vyplýva, že na chlamýdióvu infekciu treba myslieť pri pneumóniách a chrípke podobných ochoreniach ľudí po kontakte s doma chovanými okrasnými a spevavými vtákmi, hulubami žijúcimi v mestách a voľnej prírode i po kontakte s úžitkovými vtákmi.

MATERIÁL A METÓDY

Holuby boli odchytené v historickej časti mesta Košice na povalech starých budov s poškodenými strechami, s neuzatvorenými strešnými oknami, v mesiacoch január a apríl 1997. Spolu ich bolo vyšetrených 292. Séra boli vyšetované mikrometódou KVR (Se-

Dosiahnuté výsledky ukázali, že holuby mestskej populácie žijúce v Košiciach sú chlamýdiami značne infikované.

DISKUSIA

Prameňom pôvodcu *Ch. psittaci*, ktorá vyvoláva ornitózu-psitakózu, je vyše 130 vtáčích druhov, v našich podmienkach hlavne holuby. O možnosti prenosu nákazy z holuba na človeka svedčia u nás hlásenia ochorenia i kazuistiky autorov Hružík a i. (1970), Řeháček a i. (1984), Kmetty (1977). Chlamýdie prežívajú v sliznici črevného traktu vtákov. Výkalmi, prípadne sekrétmi z nosohltanu sa vylučujú a človek sa infikuje vzdušnou cestou, inhalovaním kontaminovaného prachu, prípadne kvapôčkového aerosolu. Na miestach prebývania holubov, ich hniezdiskách a stanovištiach sa hromadí trus a iný odpad, ktorý vysycha, tuhne, vetrom a dažďom môže byť odnášaný do voľnej atmosféry. V roku 1988 sme v niekoľkých kazuistikách poukázali na vznik ornitózy u reštaurátorov historických objektov Dómu sv. Alžbety v Košiciach, osídlených zdívočenými holubmi. Práca reštaurátorov spočívala v mechanickom a chemickom odstraňovaní nečistôt a nánosov z kameňa a v jeho umývaní. Pri tejto práci prichádzali do styku s vyschnutými exkrétnymi vtákov, pričom sa infikovali *Ch. psittaci*. Piatí pracovníci boli

hospitalizovaní s prejavmi bronchopneumónie a akútnej bronchitídy. Ostatní prekonali chrípkový horúčnatý stav. Na základe sérologického vyšetrenia a opakovaných dôkazov vzostupu komplement-viažúcich antichlamydiových protilátok bola potvrdená infekcia *Ch. psittaci* u 19 z 23 pracovníkov (Pospíšil a i., 1988).

ZÁVER

Vzhľadom na zdravotné riziko ochorenia ľudí i ochrany stavebných pamiatok, z preventívnych opatrení je potrebné zabrániť predovšetkým hniezdzeniu holubov, uzatvárať strešné okná, udržiavať čistotu povalových priestorov budov, nekŕmiť tieto vtáky. Pri premnožení holubov treba pristúpiť k dôraznejším formám regulácie ich počtu. Riešenie problematiky je v pôsobnosti veterinárnej služby, ktorá hodnotí stav premnoženia holubov v danej lokalite a potrebu ich regulácie. Činnosť v tejto oblasti má vykonávať aj Slovenský zväz ochrancov prírody a krajiny.

LITERATÚRA

BARRON, A. L. (1988): Microbiology of Chlamydia. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 20 pp.
ČISLÁKOVÁ, L. – POSPÍŠIL, R. – PETERKOVÁ, J. – PROKOPČÁKOVÁ, H. (1993): Sérologický prieskum drobných cicavcov chlamydiovým antigénom a jeho epizootologický význam. Veterinářství, 43, 300–301.
FOLK, Č. – ZAPLETAL, O. (1980): Meropriatija po пониженju urovnija prirosta čezmerno rozmnoženych gorodskich golubinyh ptic. Stud. Geogr., 71, 141–150.
HRŮŽIK, J. – BREZINA, R. – KAZÁR, J. – KOTULIAKOVÁ, M. (1970): Ludská ornitóza prenesená z poštového holuba. Bratisl. Lek. Listy, 53, 219–224.
HUDEC, K. (1977): Die Siedlungsdichte verwildeter Haus- tauben (*Columba livia* f. *domestica*) in Brno im Jahr 1977. Folia Zool., 26, 355–362.
KMETY, E. (1977): Výsledky komplexného epidemiologic- ko epizootologického vyšetrenia bratislavských holubov.

Správa Komisie vlády SSR pre koordináciu práce na úseku boja proti ochoreniam preneseným zo zvierat na ľudí. 40 s.
KÓCIÁNOVÁ, E. – REHÁČEK, J. – LISÁK, V. (1993): Transmission of antibodies to *Chlamydia psittaci* and *Coxiella burnetii* through eggs and „Crop milk“ in pigeons. Eur. J. Epidemiol., 9, 209–212.

LENETTE, A. S. – SCHMID, N. J. (1974): Laboratorní vy- šetřovací metody virových a rickettsiových nákaz. Praha, Avicenum, 33–40.

PIKULA, J. – BEKTOVÁ, M. – KUBÍK, V. (1981): The microbiology of feral *Columba livia* f. *domestica*. I. Acta Sci. Nat. Brno, 15, 1–35.

POSPÍŠIL, R. – ČISLÁKOVÁ, L. – BALOGHOVÁ, D. – ČARNICKÁ, A. (1988): Ornitóza u reštaurátorov Dómu sv. Alžbety v Košiciach. Prac. Lék., 40 (6), 246–248.

POSPÍŠIL, L. – VĚŽNÍK, Z. – HIRT, M. – ŠVECOVÁ, D. – DIBLÍKOVÁ, I. – PEJČOCH, M. (1996): Průkaz chlamydií ve stěvě a plicích holubů a lidí. Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 45 (3), 123–126.

REHÁČEK, J. – BREZINA, R. (1976): Ornithosis in domestic pigeons gone wild in Bratislava. J. Hyg. Epidemiol. (Praha), 20, 252–253.

REHÁČEK, J. – KOCIANOVÁ, E. – BREZINA, R. (1984): Možný význam mestských populácií holubov *Columba livia* f. *domestica* pri šírení *C. burnetii* a *Ch. psittaci* v Bratislave. Biológia, 39 (3), 293–300.

ROEDL, P. (1996): Problematika zdvíočelých holubů ve městech. SZÚ, Fortuna, 90–93.

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

STRAUSS, J. – ŠERÝ, V. – ŠKORPIL, J. (1965): Ornithosa. Praha, Státní zdravotnické nakladatelství. 130 s.

VĚŽNÍK, Z. – POSPÍŠIL, L. – DIBLÍKOVÁ, I. – ŠVECOVÁ, D. (1996): Frekvence protilátek proti chlamydiím v sérech nahodilých souborů zvířat v ČR. Veterinářství, 8, 335–338.

VĚŽNÍK, Z. – POSPÍŠIL, L. (1997): Chlamydiové infekce. Brno, Vydavatelství IDVPZ. 163 s.

Received: 98–06–05

Accepted after corrections: 98–08–14

Kontaktná adresa:

Doc. MVDr. Lýdia Čisláková, CSc., Ústav epidemiológie, Lekárska fakulta Univerzity P. J. Šafárika, Šrobárova 2, 041 80 Košice, Slovenská republika
Tel. +421 95 622 61 05, e-mail: cislak@central.medic.upjs.sk

EUROPEAN SOCIETY FOR DOMESTIC ANIMAL REPRODUCTION (ESDAR)

Tato nová společnost byla založena v roce 1996 s cílem přispět k dalšímu porozumění všech aspektů rozmnožování domácích zvířat, tedy zvířat hospodářských a také těch, která člověka doprovázejí. Členství v této organizaci je otevřeno všem, kteří ukončili veterinární univerzitu a pracují buď ve veterinární praxi, nebo ve výzkumu. Roční příspěvek (120 NLG pro západní Evropu; 60 NLG pro východní Evropu) v sobě zahrnuje i vstupní poplatek na každoroční vědeckou konferenci. Formulář pro budoucí členství je možné získat na adrese: **motlik@iapg.cas.cz** nebo **B.van.der.Weijden@bdv.dgk.ruu.nl**

První, velmi úspěšná konference, která přinesla velmi intenzivní výměnu zkušeností mezi praktickými veterinárními lékaři a pracovníky v reprodukčním výzkumu, se konala v roce 1997 v Mariensee v Německu, druhá se konala od 26. do 28. listopadu 1998 v Keszthely v Maďarsku.

Třetí konference se bude konat v Angers ve Francii od 25. do 27. listopadu 1999 a jejím organizátorem bude Dr. Marc Driancourt. Konečně čtvrtá výroční konference v roce 2000 se bude konat v Praze a její organizací byl pověřen doc. MVDr. Jan Motlík, DrSc. Zvané přednášky na výročních konferencích jsou publikovány v plném rozsahu v časopisu *Reproduction in Domestic Animals*.

Všechny další informace o Evropské společnosti pro reprodukci domácích zvířat (ESDAR) a o jejich aktivitě najdete na: **Society's website homepage: address <http://www.tzv.fal.de/esdar>**

*Doc. MVDr. Jan Motlík, DrSc.
zástupce ČR v ESDAR*

CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF CADMIUM (CdCl₂) INVESTIGATED ON A RAT LIVER EPITHELIAL CELL LINE (Anr-4 CELLS) AND CHINESE HAMSTER LUNG FIBROBLASTS (V 79 CELLS)

SLEDOVANIE CYTOTOXICITY A GENOTOXICITY KADMIA (CdCl₂) NA PEČEŇOVÝCH BUNKÁCH POTKANOV (Anr-4) A PLŪCNÝCH FIBROBLASTOCH ČÍNSKEHO ŠKREČKA (V 79 CELL LINE)

E. Hurná¹, S. Hurná²

¹Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

²Technical University, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: The cytotoxic effects of cadmium on Anr-4 cell line (rat liver epithelial cells) were assessed by neutral red uptake assay (NR), determination of protein and activity lactate dehydrogenase (LDH) in the medium. Cadmium chloride decreased the viability of cells in a concentration dependent manner. At 25 µM/l Cd, the viability was 62.27 ± 2.78% and at the highest concentration (100 µM/l CdCl₂) was 0.29 ± 0.33%. The proliferation of cells was determined by the measurement of total protein. At 25 µM/l Cd, the proliferation was 82.06 ± 3.34% and at 100 µM/l Cd 21.80 ± 1.48%. Leakage of LDH into the medium was used to assess Cd-induced cell membrane damage. LDH activity in the medium of the control cells was 58.09 ± 2.60% and at 25 µM/l Cd 72.88 ± 1.56%. Genotoxic effect was determined by micronucleus test. The fibroblasts of chinese hamster V 79 cell line was used for this purpose. In the control cells, the number of the micronuclei was 5 against the highest concentration (50 µM/l CdCl₂), where the number of micronuclei was 20 ($p \leq 0.001$).

cadmium; genotoxicity; cytotoxicity; Anr-4 cells; V 79 cells

ABSTRAKT: Cytotoxické účinky kadmia na bunkovej línii Anr-4 (epiteliálne bunky pečene potkanov) sme hodnotili metódou prestupu neutrálnej červene, určením celkového množstva proteínu a aktivity laktátdehydrogenázy v médiu. Chlorid kadmennatý znižoval prežívateľnosť buniek v závislosti od dávky. Pri koncentrácii 25 µM/l Cd sa prežívateľnosť buniek znížila na 62,27 ± 2,78 % a pri najvyššej koncentrácii (100 µM/l CdCl₂) bola 0,29 ± 0,33 %. Proliferačiu buniek sme zisťovali metódou merania celkového proteínu. Proliferačia buniek pri koncentrácii 25 µM/l Cd bola 82,06 ± 3,34 % a v 100 µM/l Cd 21,80 ± 1,48 %. Zisťovanie koncentrácie uvoľneného enzýmu laktátdehydrogenázy v médiu v kontrolných bunkách bola 58,09 ± 2,60 % oproti najvyššej nameranej koncentrácii a pri 25 µM/l Cd 72,88 ± 1,56 %. Na zisťovanie genotoxického účinku sme použili mikronukleus test. V kontrolných bunkách bolo zistených päť mikrojadier, zatiaľ čo pri najvyššej koncentrácii (50 µM/l CdCl₂) bol počet mirojadier 20 ($p \leq 0,001$).

kadmium; cytotoxicita; genotoxicita Anr-4; bunkové línie

INTRODUCTION

Cadmium is an important environmental pollutant. In industrialized countries, its release into the environment has increased considerably during the second half of this century (Tiran et al., 1995). It is a byproduct of zinc and lead mining and smelting (Waalkes et al., 1989). Cadmium is widely used in electroplating and galvanising, as a colour pigment in paints, and in batteries (Liu et al., 1991).

Cadmium is a potent poison for organisms. Acute exposure can cause damage to a variety of organs and tissues, including the liver and kidneys (Overson et

al., 1995). The heavy metal cadmium is carcinogenic in long-term rodent bioassays and there is a limited evidence that it is a human carcinogen (Oldrives et al., 1989; Bell et al., 1991; Stayner et al., 1992). The mechanism by which cadmium induces carcinogenicity (Hartman and Speit, 1996) and the nature of its uptake and transport is still poorly understood (Blazka and Shaikh, 1992).

The aim of our study was to investigate Cd cytotoxicity by neutral red uptake assay, protein determination and measurement of lactate dehydrogenase into the medium. Genotoxicity was determined by micronucleus test.

MATERIAL AND METHODS

Cell cultures

The rat liver epithelial cells (Anr-4 cell line) were obtained from the European cell culture bank (London, UK) and maintained as continuous monolayer cultures in tissue culture flasks (NUNC, Kamstrup, Denmark) at 37 °C in a humidified atmosphere made of 5% CO₂ and 95% air. Cells were grown in Williams E medium, supplemented with 10% fetal calf serum, 100 IU/ml penicillin G and 100 µg/ml streptomycin.

Chinese hamster lung fibroblasts (V 79 cell line) were seeded in 75 cm² Falcon tissue flasks with 15 ml Eagle's Minimal Essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics: 100 IU penicillin/ml and 100 µg streptomycin/ml medium in the humidified 5% CO₂ incubator at 37 °C.

Chemicals

Tissue culture reagents were purchased from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, Mo.), CdCl₂ was obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Toxicant exposure

Approximately 10⁴ cells were plated in 96-well tissue culture plates (NUNC). After 24 h, the culture medium was replaced with 100 µl medium containing various concentrations of cadmium in solution (5 to 100 µM/l) and incubated for a further 24 h.

Neutral red uptake assay

Neutral red uptake assay was used according to Borenfreund and Puerner (1985). Briefly, the medium containing cadmium chloride was removed after incubation with cells for 24 h and replaced with 100 µl medium containing 50 µg/NR/ml. Thereafter, the medium was removed and the cells were rapidly washed with fixative (1% formaldehyde and 1% CaCl₂), followed by the addition of 1% acetic acid and ethanol mixture to extract the dye from the cells. After 10 min at room temperature and rapid agitation on a microtitre plate shaker, the plates were transferred to a microplate reader equipped with a 540 nm filter to measure the absorbance of the extracted dye. Results are expressed as a percentage of the optical density determined for extract from control cultures at 540 nm. Each experiment was performed in triplicate (*n* = 24).

Protein determination

The procedure for the determination of total cell protein/well (Knox et al., 1986) was used as the test assay. Briefly, after removal of the culture medium, the cells were washed with physiological saline before being fixed in 3% glutaraldehyde for 10 to 12 min. The

cells were then stained with Kenacid Blue R solution. Excess stain was removed by a series of rinses involving agitation in a destain solution, a precise amount of desorb solution was added, and the plate was agitated for 15 min. The colour of the desorb solution was then read at 570 nm, and values obtained for test wells were compared with those for control wells. Results are expressed as a percentage of the optical density determined for extract from control cultures. Each experiment was performed in triplicate (*n* = 24).

Determination of lactate dehydrogenase (LDH) release in the medium

LDH release into the incubation medium was measured by collecting the culture medium after 24 h of exposure to the cadmium chloride. After centrifugation (1000 x g, 5 min), the supernatant was analysed by determining LDH total activity at 500–520 nm in a spectrophotometer. Reagent kits for the clinical screening of LDH were used in this assay. Each experiment was performed in triplicate (*n* = 24).

Micronucleus test

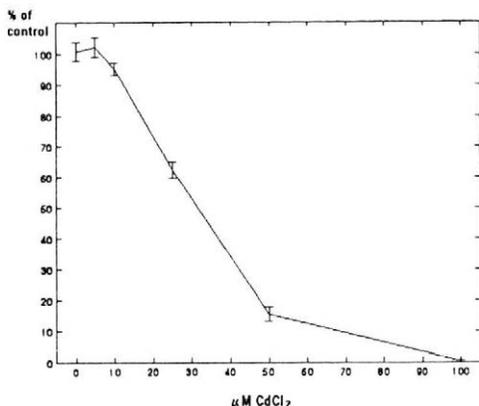
Approximately 1–2 million exponentially growing V 79 cells in flask of 25 cm² surface area were used for testing genotoxicity. After 24 h incubation, the various concentrations for cadmium chloride (5–50 µM/l) were added to the culture cells for another 24 h. The micronucleus assay was performed according to an earlier report (Krishna et al., 1989). After further culture for 24 hours, cytochalasin B was added to the fresh medium. Then the cells were washed with phosphate buffered saline, harvested, washed by centrifugation, resuspended in a hypotonic solution 75 µM KCl for 20 min at 37 °C and fixed in 3 : 1 mixture of methanol-acetic acid 3 times. After hypotonic treatment, a small drop of cell suspension was placed onto a clean slide. The slides were finally stained with 3% Giemsa. The frequency of micronucleus formation was based on 1 000 binucleated cells (BN) in each treatment group. For each treatment group, three replicate cultures were used.

Statistical analysis

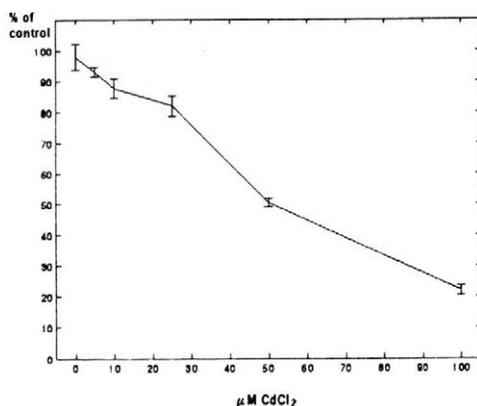
The data from cytotoxicity assays are expressed as the arithmetical mean percentage of control ± standard error of the mean, a statistical significance was determined using the Student *t*-test. The Chi square test was used for statistical analysis of data from *in vitro* micronucleus assay (Amphlett and Delow, 1984).

RESULTS

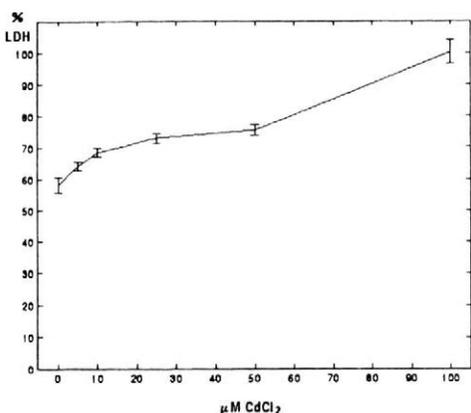
The effect of various cadmium chloride concentrations is shown in Fig. 1. The viability of attached Anr-4



1. The effect of cadmium chloride on Anr 4 cells after 24 h exposure investigated by neutral red uptake inhibition assay. The data are expressed as the mean percentage of control \pm standard error and statistical significance was determined using the Student *t*-test ($n = 24$). The results are significant from 10 to 100 μM cadmium chloride, $p < 0.05$



2. The effect of cadmium chloride on Anr 4 cells after 24 h exposure investigated by the measurement of total protein. The data are expressed as the mean percentage of control \pm standard error and statistical significance was determined using the Student *t*-test ($n = 24$). The results are significant from 10 to 100 μM cadmium chloride, $p < 0.05$



3. The effect of cadmium chloride on Anr 4 cells after 24 h exposure investigated by the measurement of LDH in medium. The data are expressed as the mean percentage of the highest concentration \pm standard error and statistical significance was determined using the Student *t*-test ($n = 24$). The results are significant from control to 50 μM cadmium chloride, $p < 0.05$

cells was assessed by means of the neutral red uptake inhibition assay. Cadmium chloride decreased the viability of cells in a concentration dependent manner from 10 to 100 $\mu\text{M/l}$ of Cd. At 10 $\mu\text{M/l}$ Cd, the viability was $95.15 \pm 3.86\%$, at 25 $\mu\text{M/l}$ cadmium chloride it was $62.27 \pm 2.78\%$, at 50 $\mu\text{M/l}$ Cd the viability of cells decreased to $15.39 \pm 2.24\%$ and at the highest concentration of cadmium chloride, the viability of cells was only $0.29 \pm 0.33\%$.

The proliferation of cells was determined by measurement of total protein (Fig. 2). The amount of cell

1. The micronucleus frequencies induced by CdCl₂ (5–50 $\mu\text{M/l}$) on V 79 cells

Dose (CdCl ₂)	2000 cells/1000 binucleated cells (BN)				
	BN/1000 cells (%)	1 MN	2 MN	>2 MN	% MN/1000 BN
Control	30.3	5	0	0	0.5
5 $\mu\text{M/l}$	32.7	13*	0	0	1.3
10 $\mu\text{M/l}$	38.6	19*	0	0	1.9
25 $\mu\text{M/l}$	40.4	20*	3	0	2.3
50 $\mu\text{M/l}$	42.5	20*	3	0	2.3

* $p < 0.001$

protein was decreased with increasing of cadmium doses. At 5 $\mu\text{M/l}$ Cd, it was $94.07 \pm 1.61\%$ at 10 $\mu\text{M/l}$ of cadmium chloride, the amount of cell protein was $87.62 \pm 3.12\%$, at 25 $\mu\text{M/l}$ and 50 $\mu\text{M/l}$ it was $82.06 \pm 3.34\%$ and $50.42 \pm 1.44\%$ and at the highest concentration (100 $\mu\text{M/l}$), the cell proliferation was $21.80 \pm 1.48\%$.

Leakage of LDH into the medium was used to assess Cd-induced cell membrane damage (Fig. 3). At the low concentrations, the level of enzyme increased slowly. At 25 $\mu\text{M/l}$ Cd, the level of lactate dehydrogenase was $65.97 \pm 1.83\%$ and at 50 $\mu\text{M/l}$ $83.52 \pm 1.72\%$.

Genotoxic effect of cadmium was evaluated by micronucleus test (Tab. I). Cadmium chloride (5–50 $\mu\text{M/l}$) increased the number of micronuclei in V 79 cells.

DISCUSSION

Three *in vitro* assays were used for detecting cadmium toxicity on Anr-4 cell line. Cadmium decreased the

viability and proliferation of the cells and increased the level of lactate dehydrogenase in the medium. The results of the cadmium viability experiments indicated that Cd concentrations from 10 µM/l were needed to injure the lysosomes. Low Cd concentrations showed a severe inhibition of cell proliferation. Inside the cell, cadmium can interfere with different regulation processes, some of which are possibly involved in mitosis. The release of Ca²⁺ forms intracellular compartments by binding on membrane receptors (Smith et al., 1994). Elevated levels of intracellular free Ca²⁺ may inhibit proliferation (Braeckman et al., 1997).

Lyons-Alcátara and Mothersill (1996) investigated the effect of cadmium on fish and mammalian cells. The results show that cadmium toxicity to human urothelium was only observed at levels above 50 µM/l Cd²⁺. The concentration higher than 100 µM/l Cd did not support any growth. The effect of Cd²⁺ on fish skin and esophageal epithelium is similar with significant reduction in growth areas at level of cadmium ion 5 µM. In both primary systems the human cells are more able to tolerate cadmium than the rainbow trout cells. Similar differences in sensitivity were found by Marion and Denezéau (1983b).

The cytotoxicity of various cadmium concentrations was investigated by El Azzouy et al. (1994). After different time periods, the number of viable cells was measured by the MTT test. Exposure to 50 µM/l cadmium chloride caused an acute toxicity of CEM-C12 cells, since more than half of the cells died within 6 h and only a few cells survived more than 18 h.

LDH activity was determined as a measure of cytotoxicity. A dose-related extracellular LDH increase was found. Bucio et al. (1995) reported that acute high dose Cd treatment resulted in a significant increase in the LDH leakage into the culture media in a similar fashion.

Genotoxic effects of metal ions investigated Bérces et al. (1993). They found that cadmium ions increased the micronucleus frequency linearly after incubation with whole blood *in vitro* at concentration of 10⁻⁶ to 10⁻³ M for 30 min. Genotoxicity with cadmium chloride, cadmium sulfate and cadmium sulfide *in vivo* and *in vitro* have been described by Hughes et al. (1995).

Yamada et al. (1993) and Nocentini (1987) investigated the effect of cadmium in combination with various DNA-damaging agents. Low concentrations of cadmium increased chromosomal aberrations and led to an accumulation of strand breaks in mammalian cells.

In conclusion, cadmium chloride decreased the viability and proliferation of the cells, increased the release of lactate dehydrogenase in the medium and the number of micronuclei in the micronucleus test.

REFERENCES

AMPHLET, G. E. – DELOW, G. F. (1984): Statistical analysis of the micronucleus test. *Mutat. Res.*, *128*, 161–166.

BELL, R. R. – NONAVINAKERE, V. K. – SOLIMAN, M. R. I. – EARLY, J. L. (1990): Effect of *in vitro* treatment of rat hepatocytes with selenium, and/or cadmium on cell viability, glucose output, and cellular glutathione. *Toxicology*, *69*, 111–119.

BÉRCES, J. – ÓTOS, M. – SYIRMAI, S. – CRANE-URUENA, C. – KOTELES, G. J. (1993): Using the Micronucleus Assay to detect genotoxic effect of metal ions. *Environ. Hlth Perspect. Suppl.*, *101*, 11–13.

BLAZKA, M. E. – SHAIKH, Z. A. (1992): Comparison of cadmium, mercury and calcium accumulations by isolated hepatocytes of the small skate (*Raja erinacea*) and rat. *Comp. Biochem. Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, *101* (3), 631–639.

BORENFREUND, E. – PUERNER, J. A. (1984): A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assays (HTD/NR 90). *J. Tissue Cult. Meth.*, *9*, 7–9.

BRAECKMAN, B. – RAES, H. – VAN HOYE, D. (1997): Heavy metal toxicity in an insect cell line. Effects of cadmium chloride, mercuric chloride and methylmercuric chloride on cell viability and proliferation in *Aedes albopictus* cells. *Cell. Biol. Toxicol.*, *13*, 389–397.

BUCIO, L. – SOUZA, A. – ALBORES, A. (1995): Cadmium and mercury toxicity in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology*, *102*, 285–299.

EL AZZOUZI, B. – TSANGARIS, G. – PELLEGRINI, O. (1994): Cadmium induced apoptosis in a human T cell line. *Toxicology*, *88*, 127–139.

HARTMAN, A. – SPEIT, G. (1996): Effect of arsenic and cadmium on the persistence of mutagen-induced DNA lesions in human cells. *Environ. Mol. Mutagen*, *27*, 98–104.

HUGHES, K. – MEEK, M. E. – NEWHOOK, R. – CHAN, P. K. L. (1995): Speciation in health risk assessment of metals: Evaluation of effects associated with forms present in the environment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, *22*, 213–220.

KNOX, P. – UPHILL, P. F. – FRY, J. R. (1986): The FRAME multicentre project on *in vitro* cytotoxicology. *Fd. Chem. Tox.*, *24*, 457–463.

KRISHNA, G. – KROPKO, M. L. – THEISS, J. C. (1989): Use of the cytokinesis block method for the analysis of micronuclei in V 79 Chinese hamster lung cells: results with mitomycin C and cyclophosphamide. *Mutat. Res.*, *222*, 63–69.

LIU, J. – KERSHAW, W. C. – KLAASSEN, C. D. (1991): The protective effect of metallothionein on the toxicity of various metal in rat primary hepatocyte culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, *107*, 27–34.

LYONS-ALCÁTORA, J. V. – MOTHERSILL, C. (1996): The differential effects of cadmium exposure on the growth and survival of primary and established cell from fish and mammals. *Cell Biol. Toxicol.*, *12*, 19–38.

MARION, M. – DENEZÉAU, F. (1983): Rainbow trout and human cell in culture for the evaluation of the toxicity of aquatic pollutants: a study with cadmium. *Aquatic Toxicol.*, *13*, 329–343.

NOCENTINI, S. (1987): Inhibition of DNA replication and repair by cadmium in mammalian cells. Protective interaction of zinc. *Nucl. Acid. Res.*, *15*, 4211–4225.

OLDRIGES, H. – HOCHRAINER, D. – GLASER, U.: Long-term inhalation study with Wistar rats and four cadmium compounds. *Toxicol. Environ. Mol. Mutagen.*, *19*, 217–222.

- OVERGONNE, J. H. – SOUREN, J. E. M. – WIEGANT, F. A. C. (1995): Relationship between cadmium induced expression of heatshock genes, inhibition of protein synthesis and cell death. *Toxicology*, *99*, 19–30.
- SMITH, J. B. – SMITH, L. – PIJUAN, V. (1994): Transmembrane signals and protooncogene induction evoked by carcinogenic metals and prevented by zinc. *Environ. Hlth Perspect.*, *102* (3), 181–189.
- STAYNER, L. – SMITH, R. S. – THUN, N. – SCHNORR, T. – LEMEN, R. A. (1992): Dose-response analysis and quantitative assessment of lung cancer risk and occupational cadmium exposure. *Ann. Epidem.*, *2*, 177–194.
- TIRAN, B. – KARPFF, E. – TIRAN, A. (1995): Age dependency of selenium and cadmium content in human liver, kidney and thyroid. *Arch. Environ. Hlth*, *50* (3), 242–246.
- YAMADA, H. – MIYAHARA, T. – SASAKI, Y. F. (1993): Inorganic cadmium increases the frequency of chemically induced chromosome aberrations in cultured mammalian cells. *Mutat. Res.*, *302*, 137–145.
- WAALKES, M. P. – REHM, S. – REGGS, C. W. (1989): Cadmium carcinogenesis in male Wistar (CrI (WI)BR) rats: Dose-response analysis of effects of zinc on tumor induction in the prostate, in the testes, and at the injection site. *Cancer Res.*, *49*, 4282–4288.

Received: 98–06–02

Accepted after corrections: 98–08–28

Contact Address:

MVDr. Edita H u r n á, PhD., Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Hlinkova 1/A, 040 01 Košice, Slovenská republika
Tel. +421 95 633 74 29, fax +421 95 633 18 53, e-mail: hurna@ccsun.tuke.sk

Ústav zemědělských a potravinářských informací

Vydavatelské oddělení vydává z pověření Ministerstva zemědělství České republiky a pod gescí České akademie zemědělských věd 10 vědeckých časopisů:

	Periodicita	Předplatné	Jednotlivá čísla
Rostlinná výroba (Plant Production)	12	816,-	68,-
Czech Journal of Animal Science (Živočišná výroba)	12	816,-	68,-
Veterinární medicína (Veterinary Medicine – Czech)	12	696,-	58,-
Zemědělská ekonomika (Agricultural Economics)	12	816,-	68,-
Journal of Forest Science (Lesnictví-Forestry)	12	816,-	68,-
Czech Journal of Food Sciences (Potravinářské vědy)	6	372,-	62,-
Czech Journal of Genetics and Plant Breeding (Genetika a šlechtění)	4	248,-	62,-
Plant Protection Science (Ochrana rostlin)	4	248,-	62,-
Zahradnictví (Horticultural Science)	4	248,-	62,-
Zemědělská technika (Agricultural Engineering)	4	248,-	62,-

Objednávku zašlete na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací
Vydavatelské oddělení
Slezská 7
120 56 Praha 2

Tel.: + 420 2 24 25 79 39, fax: + 420 2 24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz



Objednáváme předplatné na rok 1999

	Počet výtisků
Rostlinná výroba (Plant Production)	—
Czech Journal of Animal Science (Živočišná výroba)	—
Veterinární medicína (Veterinary Medicine – Czech)	—
Zemědělská ekonomika (Agricultural Economics)	—
Journal of Forest Science (Lesnictví-Forestry)	—
Czech Journal of Food Sciences (Potravinářské vědy)	—
Czech Journal of Genetics and Plant Breeding (Genetika a šlechtění)	—
Plant Protection Science (Ochrana rostlin)	—
Zahradnictví (Horticultural Science)	—
Zemědělská technika (Agricultural Engineering)	—

Jméno nebo organizace:

.....

.....

Adresa + PSČ:

ISOLATION OF *LACTOCOCCUS GARVIEAE* SPECIES FROM BOVINE MASTITIS

IZOLACE DRUHU *LACTOCOCCUS GARVIEAE* Z BOVINNÍ MASTITIDY

I. Sedláček, P. Benda

Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: Bovine mastitis is caused mostly by streptococci or staphylococci. From the streptococcus-related group the *Lactococcus garvieae* is mentioned in connection with the illness. This species is able to grow both at 10 and 45 °C (*L. garvieae* is the only lactococcus which grows at 45 °C) and in the presence of 6.5% NaCl, which are the key characteristics of enterococci and should be in this way misidentified as a member of the genus *Enterococcus*. On the other hand, *L. garvieae* did not grow at pH 9.6 and did not react with streptococcal grouping antigen for group D. The paper presents the characteristics originated from the five cultures isolated at the end of 1997 year in North-east Moravia. Recent results of tests based on Czech commercial identification kits (STREPTOtest 16, STAPHYtest 16 and ENCOCCUStest) should help with the identification of the pathogen from animal clinical sources because our results were almost identical for all isolates. Positive pyrrolidonyl arylamidase reaction distinguishes *L. garvieae* from pediococci, leuconostocs or viridans streptococci and together with positive leucine aminopeptidase from aerococci. Members from genus *Globicatella* do not grow at 10 and 45 °C, members from genus *Facklamia* have negative hydrolyse of esculin in comparison with *L. garvieae*. Species differentiation of *L. garvieae* from the other lactococci is based on positive pyrrolidonyl arylamidase and arginine dihydrolase reactions and acid production from ribose and melibiose. According to our observation *L. garvieae* is no rare species, but probably with regard to lack of information about the taxon it can be commonly identified as viridans streptococcus or as enterococcus. Two isolates were deposited in the Czech Collection of Microorganisms as CCM 4682 and CCM 4683.

mastitis; identification; *Lactococcus garvieae*

ABSTRAKT: Bovinní mastitidy jsou většinou způsobeny streptokoky nebo stafylokoky. Ze skupiny tzv. mléčných kůk je v souvislosti s tímto onemocněním uváděn jako příležitostný patogen i druh *Lactococcus garvieae*. Tento druh svou schopností růstu při teplotě 10 i 45 °C a také při 6,5 % NaCl se shoduje s charakteristikou klíčových rysů pro enterokoky a zřejmě tak bývá i chybně diagnostikován. Ve studii jsou uvedeny údaje o pěti kultur izolovaných v závěru roku 1997 v regionu severovýchodní Moravy. Uvedené výsledky biochemických a fyziologických testů mohou napomoci průkazu tohoto patogena ve veterinárním klinickém materiálu, protože prezentovaná podrobná charakteristika druhu je založena na výsledcích získaných na tuzemských identifikačních soupravách. Dle našeho názoru se jedná o vzácný druh, ale pravděpodobně vzhledem k nedostatku informací o tomto taxonu může být rutinně identifikován jako viridující streptokok nebo enterokok.

mastitida; identifikace; *Lactococcus garvieae*

ÚVOD

Mastitidy skotu jsou nejčastěji způsobeny streptokoky a stafylokoky (Watts and Owens, 1988; Watts et al., 1984; Watts et al., 1986), méně často koliformními bakteriemi nebo druhem *Arcanobacterium pyogenes*. V ojedinělých případech mohou mastitidy vyvolat i podmíněně patogenní nebo saprofytické bakterie, například koagulázonegativní stafylokoky (Miedzobrodzki et al., 1989; Naidu et al., 1990), enterokoky a laktokoky. Z laktokoků způsobuje mastitidu druh *Lactococcus garvieae* (Collins et al., 1983; Schleifer et al., 1985; Watts, 1988). Tento druh je znám i z humánní klinické mikrobiologie (Elliott et al., 1991).

Rod *Lactococcus* (Schleifer et al., 1985) zahrnuje skupinu kůk původně označovanou jako mléčné

streptokoky. Většina druhů rodu *Lactococcus* je významná z hlediska potravinářské mikrobiologie a je obecně považována za nepatogenní (Facklam and Washington, 1991). Laktokoky jsou kataláza-negativní, gram-pozitivní, fakultativně anaerobní koky (kulatý až ovoidní tvar) vyskytující se jednotlivě, po dvou nebo v řetězcích (Schleifer and Kilpper-Bälz, 1987). Schopnost laktokoků růst při teplotě 10 °C, ale ne při 45 °C je rodová charakteristika, která je, až na výjimky, odlišuje jak od streptokoků, tak i od enterokoků.

Rozšiřující popis druhu *Lactococcus garvieae* podali Teixeira et al. (1996), kteří navíc do tohoto druhu přeřadili i „*Enterococcus seriolicida*“ (Kusuda et al., 1991), způsobující onemocnění ryb. A právě biochemická i fyziologická podobnost *L. garvieae* některým zástupcům rodu *Enterococcus* může vést k jejich záměně či přehlédnutí při identifikaci, a to jak ve veterinár-

ní, tak i v humánní klinické mikrobiologii (Teixeira et al., 1996). Druh *L. garvieae* je schopen, stejně jako enterokoky, růst při teplotě 45 °C a v přítomnosti 6,5 % NaCl nebo hydrolyzovat eskulin v přítomnosti žluče, což byly původně charakteristiky typické výlučně pro rod *Enterococcus* (Teixeira et al., 1996). Z tohoto důvodu seznamujeme s našimi zkušenostmi s identifikací zmíněného taxonu pocházejícího z veterinárního materiálu.

MATERIÁL A METODA

Přehled testovaných kmenů a jejich zdroj je uveden v tab. I. Kmeny pocházely ze tří stáji na severovýchod-

lyzin *Staphylococcus aureus*), reakce s fenolftaleindifosfátem a hipurátem sodným. Všechny kmeny byly dále identifikovány setem STREPTOtest 16 (Lachema, Brno) a programem TNW 5.0. Citlivost k antibiotikům byla stanovena plotnovou metodou na Mueller-Hinton agaru (Oxoid CM 337) pomocí antibiotických disků Oxoid CT.

Izoláty byly uchovány na vpichu v BHI agaru a současně také v BHI bujónu. Pro testování byly vždy kultury přeočkovány na krevní agar (7 % beraní krve) a kultivovány 24 h při teplotě 37 °C. Opakované testování bylo prováděno pomocí klíčových konvenčních testů pro tuto skupinu (Rouff, 1995) a dále komerčními soupravami STREPTOtest 16, STAPHYtest 16, ENCOCCUStest, PYRAtest, VPtest (Lachema, Brno),

I. Seznam kmenů *L. garvieae* a zdroj izolace – A list of *L. garvieae* strains and source of isolates

Označení kmene ¹	Zdroj izolace ²	Klinické vyšetření ³	SCC	Typ vzorku ⁴
436	sekret mléčné žlázy skotu ⁵	negativní ⁶	561	směsný ⁸
447	sekret mléčné žlázy skotu	negativní	828	směsný
462	sekret mléčné žlázy skotu	CHKM (vločky) ⁷	715	čtvrtový ⁹
488	sekret mléčné žlázy skotu	negativní	514	směsný
1328	sekret mléčné žlázy skotu	CHKM (vločky)	973	čtvrtový

SCC = počet somatických buněk (tis./ml) – somatic cell counts (thous./ml)

CHKM = chronická katarální mastitida – chronic catarrhal mastitis

¹strain designation, ²source of isolate, ³clinical examination, ⁴sample type, ⁵bovine mammary gland secretion, ⁶negative, ⁷floccules, ⁸bulk milk, ⁹udder quarter milk

ní Moravě. Jednalo se o rutinně sledované vzorky mléka dojníc. Zvířata byla vyšetřována jak klinicky, tak cytologicky; všechny publikované případy vykazovaly znaky mastitidy (tab. I). Žádný z případů nebyl vyšetřován opakovaně. Vzorky mléka byly odebírány v souladu s doporučeními FIL/IDF (1981). V souboru se vyskytovaly jak čtvrtové, tak směsné vzorky od jednotlivých dojníc; důvodem odlišných způsobů odběru byly většinou požadavky chovatelů a servisních pracovníků. Vzorky byly transportovány zchlazené, nebyla používána žádná konzervační činidla. Po doručení do laboratoře byly vzorky analyzovány buď ihned, nebo po uchování při teplotě 4 °C nejvýše 18 hodin. V případě, kdy nebylo možno dodržet uvedené podmínky, byly vzorky zmrazeny a uchovány při teplotě –18 °C nejdéle 14 dní.

Individuální vzorky mléka byly v množství asi 50 µl očkovány sterilní skleněnou tyčinkou současně na krevní agar s 8 % plné beraní krve (Columbia Blood Agar Base, HiMedia, Bombay) a Edwardsovo médium s 8 % beraní krve (HiMedia). Kultivace probíhala 18 až 24 h při teplotě 37 °C. Ve všech uvedených případech byl růst v primokultuře uniformní, vizuálně téměř v čisté kultuře, nárůst pak střední až silný. Kolonie vykazovaly slabou viridaci jak na krevním, tak na Edwardsově agaru. Suspektní kolonie byly přeočkovány na krevní agar a dále primárně konfirmovány. Byla sledována hemolýza, reakce s eskulinem, CAMPtest (hemo-

Streptococcal grouping kit (Oxoid). Identifikace izolátů byla provedena pomocí identifikačního programu TNW 5.0 (CCM Brno, 1997).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Při vyšetřování bovinních mastitid bylo izolováno několik kultur, které byly určeny jako *Enterococcus* sp. Následně pomocí identifikačního programu TNW, do jehož matice byly vloženy charakteristiky druhu *L. garvieae*, však byly tyto izoláty identifikovány jako zmíněný druh. Jednalo se o gram-pozitivní ovoidní kokyčky, nehemolytické nebo slabě viridující a většinou nerostoucí na kanamycin-eskulinovém agaru (Merck). Na krevním agaru tvořily hladké, lesklé, mírně vypouklé bílé kolonie mající 0,5 až 1 mm v průměru. Dva kmeny označené 447 a 462 byly uloženy v České sbírce mikroorganismů PřF MU pod čísly CCM 4682 a CCM 4683. Dosažené výsledky biochemických a fyziologických testů u všech vyšetřovaných kultur jsou uvedeny v tab. II.

Růst při teplotě 45 °C byl prováděn jak v médiu s indikátorem, tak i v BHI bujónu pro vyloučení technické chyby při odečítání neprůkazných růstů. Původní údaje pro druh „*Streptococcus garvieae*“ totiž udávaly pozitivní růst při teplotě 40 °C, ale ne při teplotě 45 °C (Schleifer et al., 1985). Tato charakteristika zůstala

II. Charakteristika reakcí u pěti izolátů druhu *L. garvieae* – Characteristics of reactions in five isolates of the species *L. garvieae*

Test ¹	Procento pozitivních reakcí ²
Růst při – growth at:	
6,5 % NaCl	100
10 °C	100
45 °C	100
pH 9,6	0
Kataláza – catalase	0
Ureáza – urease	0
Reakce se sérem skupiny D – reaction with group D serum	0
Acetoin – acetoin	100
Hemolýza (viridace) – hemolysis (viridation)	100
Pyrrrolidonyl arylamidáza – pyrrolidonyl arylamidase	80
Fosfatáza – phosphatase	0
Leucin aminopeptidáza – leucine aminopeptidase	100
α-galaktosidáza – α-galactosidase	0
β-galaktosidáza – β-galactosidase	0
β-glukuronidáza – β-glucuronidase	0
Růst na agaru – growth on:	
Edwardsově – Edwards agar	100
kanamycin-eskulinové – kanamycin-esculin agar	20
Dekarboxylace ornitinu – ornithine decarboxylation	0
Arginin dihydroláza – arginine dihydrolase	100
Hydrolýza – hydrolysis of:	
eskulinu – esculin	100
hippurátu – hippurate	0
Kyselina z – acid from:	
mannitolu – mannitol	100
sorbitolu – sorbitol	0
trehalózy – trehalose	100
laktózy – lactose	60
rafinózy – raffinose	0
inulinu – inulin	0
melibiózy – melibiose	0
ribózy – ribose	100
sacharózy – saccharose	0
xyulózy – xylose	0
maltózy – maltose	100
manózy – mannose	100
Redukce nitrátů – nitrate reduction	0

¹test, ²percentage of positive reactions

platná i po přefázení tohoto taxonu k laktokokům. Do druhu *L. garvieae* však byl nedávno přefázen „*Enterococcus seriolicida*“, který roste při teplotě 45 °C, a dále tam patří i izoláty z vodních buvolů, které rostly rovněž při této teplotě (Teixeira et al., 1996). Také

všechny naše izoláty vykazovaly pozitivní růst při této teplotě. Vzhledem k publikovaným i námi dosaženým údajům je nutno přehodnotit rodovou charakteristiku laktokoků, neboť prokazatelně alespoň druh *L. garvieae* roste při teplotě 45 °C.

Právě schopností růstu při teplotě 10 a 45 °C a v přítomnosti 6,5 % NaCl tyto kataláza-negativní izoláty druhu *L. garvieae* nejvíce připomínaly zástupce rodu *Enterococcus*. Na rozdíl od enterokoků však druh *L. garvieae* neroste při pH 9,6 a nereaguje se streptokokovým skupinovým sérem skupiny D (Oxoid) a většinou také neroste na kanamycin eskulinovém agaru. Pozitivní výsledek pyrrolidonyl arylamidázové reakce (proužkový PYRAtest; reakci ze STAPHYtestu 16 nelze použít) odlišuje *L. garvieae* od pediokoků, leukonostoků a viridujících streptokoků. Stejný test spolu s pozitivním výsledkem leucin aminopeptidázy vylučuje identifikaci izolátů *L. garvieae* jako aerokoků (Rouff, 1995). Zástupci rodu *Globicatella* nerostou při teplotě 10 ani 45 °C (Collins et al., 1992); zástupci rodu *Facklamia* zase nehydrolyzují eskulin (Collins et al., 1997), takže jsou snadno odlišitelné od *L. garvieae* pomocí základních rodových testů. V rámci rodu *Lactococcus* druh *L. garvieae* od ostatních druhů odlišuje již zmíněný PYRAtest, dále okyselení ribózy a melibiózy a pozitivní arginin dihydroláza. Jak je patrné z tab. II, výsledky reakcí jsou téměř jednotné. Izolované kmeny se vzájemně od sebe lišily pouze okyselením laktózy, ale tento rys není neobvyklý (Teixeira et al., 1996). Výsledky reakcí dosažené u pěti izolátů korespondují s popisem druhu (Schleifer et al., 1985; Schleifer and Kilpper-Bälz, 1987; Teixeira et al., 1996).

Antibiotický profil izolátů byl následující: všechny byly rezistentní k linkomycinu a cloxacilinu a citlivé k penicilinu G, novobiocinu, cefalexinu, cefoperazonu, ampicilinu, amoxycilinu s kyselinou klavulanovou a tetracyklinu. Kmeny byly citlivé ke streptomycinu ve 40 % případů, k neomycinu a kanamycinu pak v 80 % případů.

Při zpětné reidentifikaci izolátů gram-pozitivních, kataláza-negativních koků z mastitid na základě údajů z archivních souborů dat bylo zjištěno, že se pravděpodobně nejedná o nijak zvlášť vzácný druh. V průběhu posledních tří let byl izolován v 43 případech (2,4 % izolátů gram-pozitivních, kataláza-negativních koků), ale vždy chybně identifikován – především jako *Enterococcus* sp., *Enterococcus durans* a *Streptococcus* sp. Tyto izoláty už bohužel nejsou k dispozici, takže u nich není možné provést doplňující testy, potvrzující jednoznačně jejich příslušnost k druhu *L. garvieae*. Zde uvedeně zjištění je založeno na přehodnocení identifikace pomocí nové matice a dle výsledků testů uložených v počítači. Závěry dosažené pomocí rutinně prováděného souboru testů u těchto izolátů však po reidentifikaci směřují k druhu *L. garvieae* a to, že nebyly identifikovány jako zmíněný taxon, bylo zapříčiněno předchozí nedostupností identifikačních schémat a podrobnějších dat. Dle našeho názoru výskyt druhu *L. garvieae* při

mastitidách není nijak vzácný. Za hlavní přínos tohoto sdělení považujeme především uveřejnění podrobné charakteristiky dosažené na v tuzemsku dostupných identifikačních soupravách. Toto jistě napomůže častějšímu průkazu patogena v klinickém veterinárním materiálu a zlepší se tím i monitoring jeho výskytu v našem regionu.

LITERATURA

COLLINS, M. D. – FARROW, J. A. E. – PHILLIPS, B. A. – KANDLER, O. (1983): *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. J. Gen. Microbiol., 129, 3427–3431.

COLLINS, M. D. – AGUIRRE, M. – FACKLAM, R. R. – SHALLCROSS, J. – WILLIAMS, A. M. (1992): *Globicatella sanguis* gen. nov., sp. nov., a new Gram-positive catalase-negative bacterium from human sources. J. Appl. Bacteriol., 73, 433–437.

COLLINS, M. D. – FALSEN, E. – LEMOZY, J. – AKERVALL, E. – SJÖDÉN, B. – LAWSON, P. A. (1997): Phenotypic and phylogenetic characterization of some *Globicatella*-like organisms from human sources: description of *Facklamia hominis* gen. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 47, 880–882.

ELLIOTT, J. A. – COLLINS, M. D. – PIGOTT, N.E. – FACKLAM, R. R. (1991): Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from humans by comparison of whole-cell protein patterns. J. Clin. Microbiol., 29, 2731–2734.

FACKLAM, R. R. – WASHINGTON II, J. A. (1991): *Streptococcus* and related catalase-negative gram-positive cocci. In: HALOWS, A. – HAUSLER, Jr., W. J. – HERRMANN, K. L. – ISENBERG, H. D. – SHADOMY, H. J. (eds.): Manual of Clinical Microbiology, 5th ed. ASM Press. Washington, D.C., pp. 238–257.

KUSUDA, R. – KAWAI, K. – SALATI, F. – BANNER, C. R. – FRYER, J. L. (1991): *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 406–409.

MIEDZOBRODZKI, L. – NAIDU, A. S. – WATTS, J. L. – CIBOROWSKI, P. – PALM, K. – WADSTRÖM, T. (1989): Effect of milk on fibronectin and collagen type I binding to *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. J. Clin. Microbiol., 27, 540–544.

NAIDU, A. S. – MIEDZOBRODZKI, J. – ANDERSSON, M. – NILSSON, L. E. – FORSGREN, A. – WATTS, J. L. (1990): Bovine lactoferrin binding to six species of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. J. Clin. Microbiol., 28, 2312–2311).

RUOFF, K. L. (1995): *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Stomatococcus* and miscellaneous gram-positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P. R. – BARON, E. J. – PFALLER, M. A. – TENOVER, F. C. – YOLKEN, R. H. (eds.): Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. ASM Press. Washington, D.C., pp. 315–323.

SCHLEIFER, K. H. – KILPPER-BÄLZ, R. (1987): Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. Syst. Appl. Microbiol., 10, 1–19.

SCHLEIFER, K. H. – KRAUS, J. – DVORAK, C. – KILPPER-BÄLZ, R. – COLLINS, M. D. – FISCHER, W. (1985): Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. Syst. Appl. Microbiol., 6, 183–195.

TEIXEIRA, L. M. – MERQUIOR, V. L. C. – VIANNI, M. C. E. – CARVALHO, M. G. S. – FRACALANZZA, S. E. L. – STEIGERWALT, A. G. – BRENNER, D. J. – FACKLAM, R. R. (1996): Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. Int. J. Syst. Bacteriol., 46, 664–668.

WATTS, J. L. (1988): Etiological agents of bovine mastitis. Vet. Microbiol., 16, 41–66.

WATTS, J. L. – OWENS, W. E. (1988): Evaluation of the Rapid Mastitis Test for identification of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mammary glands. J. Clin. Microbiol., 26, 672–674.

WATTS, J. L. – OWENS, W. E. – NICKERSON, S. C. (1986): Evaluation of the Minitek Gram-positive set for identification of staphylococci isolated from the bovine mammary gland. J. Clin. Microbiol., 23, 873–875.

WATTS, J. L. – PANKEY, J. W. – NICKERSON, S. S. (1984): Evaluation of the Staph-Ident and STAPHase systems for identification of staphylococci from bovine intramammary infections. J. Clin. Microbiol., 20, 448–452.

Received: 98–05–12

Accepted after corrections: 98–09–22

Kontakní adresa:

RNDr. Ivo Sedláček, CSc., Česká sbírka mikroorganismů, Přírodovědecká fakulta Masarykovy Univerzity, Tvrdého 14, 602 00 Brno, Česká republika
Tel. +420 5 43 24 72 31, fax +420 5 43 24 73 39, e-mail: ivo@sci.muni.cz

ORIGINAL PAPERS – PŮVODNÍ PRÁCE

Lehocký J., Nagy O., Kováč G.: Lysine-salicylate based antipyretic in clinical and laboratory evaluation of tolerance in calves Antipyretikum na báze lyzin-salicylátu v klinickom a laboratórnom hodnotení znášanlivosti u teliat	1
Třebíčavský I., Valíček L.: Immunoreactivity of interleukin-8 and absence of interferon-alpha in porcine bronchoalveolar lavage cells infected with PRRS virus (in English) Imunoreaktivita interleukinu-8 a nepřítomnost interferonu alfa v prasečích buňkách bronchoalveolárních laváží infikovaných virem PRRS	7
Alexa P., Salajka E., Hamřík J., Zířlavský M.: Oedema disease of swine: formation of antibodies neutralizing Shigella-like toxin IIv in piglets immunized with the toxoid SLTII (in English) Edémová nemoc prasat: protilátky neutralizující Shigella-like toxin IIv po imunizaci toxoidem SLTII	11
Raszyk J., Ulřích R., Gajdůšková V., Salava J., Palác J.: Occurrence of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) on pig and cattle farms Výskyt karcinogenních polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) na farmách prasat a skotu	17
Castillo C., García-Partida P., Hernández J., Benedito J.L.: Applications of Fencel's equations in the acid-base balance changes related to pregnancy on ewe (in English) Použití Fenclových rovnic u změn acidobazické rovnováhy ve vztahu k březosti u bahnic	27
Mihelič D., Gjurevič-Kantura Vesna, Brkič A., Babič K., Bedrica Ljiljana, Matičič D.: Access to and blockade of nerves at the <i>incisura ischiadica major</i> in bovines and goat (in English) Přístup a blokáda nervů v <i>incisura ischiadica major</i> u skotu a kozy	33
Beníšek J., Süliová J., Švrček Š., Závadová J., Ondrejka R., Ďurové A.: The effectiveness of inactivated, purified and concentrated experimental rabies vaccine for veterinary use: antigenic activity. Experiments on domestic dogs (in English) Účinnost inaktivované, purifikované a koncentrovanej experimentálnej antirabickej vakcíny pre veterinárne použitie: antigénna aktivita. Pokusy na psoch domácich	45
Koudela B., Svoboda M., Björkman C., Uggla A.: Neosporosis in dogs: the first case report in the Czech Republic První případ neosporózy psů v České republice	51
Nagy O., Michna A., Kováč G., Seidel H., Paulíková I.: The effect of respiratory diseases in calves on the blood gas values and acid-base balance Vplyv ochorení respiračného aparátu u teliat na hodnoty krvných plynov a acidobazickú rovnováhu.	69
Lenhardt L., Dudriková E.: A densitometric analysis of alkaline phosphatase and aminopeptidase M in the jejunum enterocytes of the piglets with retarded growth (in English) Denzitometrická analýza alkalické fosfatázy a aminopeptidázy M v enterocytoch tenkého čreva odstaviat zostávajúcich v raste	75
Levkut M., Kolodzieyski L., Abdousslam O.E., Ševčíková Z., Ledecký V., Zibrín M.: An ultrastructure of cell death in a pig melanoma (in English) Ultraštruktúra bunkovej smrti u melanómu oštipanej	81
Fortýn K., Hruban V., Horák V., Tichý J.: Exceptional occurrence and extent of malignant melanoma in pig Výjimečný výskyt a rozsah maligního melanomu u prasete	87
Kummer J., Mašková J., Zralý Z., Čanderle J., Věžník Z.: Histological and functional alterations in the endometrium of cows with persisting ovarian cysts (in English) Histopatologické a funkční změny v endometriu krav s perzistujícími ovariálními cystami	97
Smýkalová Š., Kotrbová A., Trefil P.: Effect of busulphan on growth and development of the chicken embryos Vliv busulphanu na růst a vývoj drůbežích embryí	105
Zralý Z., Bendová J., Šišák M., Diblíková I., Švecová D., Zajícová A., Věžník Z.: Occurrence of antibodies to the sperms in blood sera of bulls and boars (in English) Výskyt protilátek proti spermii v krevním séru býků a kanců	137
Doležel R., Čech S., Zajíc J.: Follicular development during the progesterone therapy of ovarian acyclicity and ovarian cysts in cows Folikulární vývoj během léčby ovariální acyklie a ovariálních cyst u krav progesteronem	145

Chroust K., Horák F., Žižlavský J., Žižlavská S.: The course and control of parasitoses in mixed grazing of sheep and cattle Průběh a tlumení parazitóz při společné pastvě ovcí a skotu	153
Ondrejka R., Švrček Š., Beníšek Z., Ďurové A., Sůliová J.: Acceleration of the penetration of rabies virus vaccination strain Vnukovo-32 by DEAE-dextran at oral administration to suckling mice Urýchlenie penetrácie vakcinačného kmeňa Vnukovo-32 DEAE-dextranom pri orálnej aplikácii cicajúcim myšiam	161
Hajurka J., Choma J.: Induction of first postpartum ovulation by GnRH analogue in suckled dairy cows * Indukcia prvej postpartálnej ovulácie pomocou GnRH u dojníc s odchovom teliat cicaním	169
Kaufmann S., Kursá J., Kroupová V., Rambeck W. A.: Iodine in milk by supplementing feed: ad additional strategy to erase iodine deficiency (in English) Hladina jodu v mléce dojníc při obohacené krmné dávce: cesta k eliminaci jodového deficitu	173
Břeš J., Paulíková I., Macák V.: Clinical and ultrasonographic finding on thyroid gland of rams during administration of kalium iodatum Klinický a ultrasonografický nález na štítné žláze baranov v priebehu aplikácie kalium iodatum	179
Konrádová V., Uhlík J., Vajner L., Zocová J.: The effect of two β_2 adrenergic agonists on the ultrastructure of the airway epithelium in rabbits (in English) Vliv dvou β_2 -sympatomimetik na ultrastrukturu epitelu dýchacích cest králiků	187
Faldyna M., Toman M.: The effect of age on the distribution of lymphocyte and neutrophil granulocyte subsets in the peripheral blood of dog (in English) Vliv věku psů na zastoupení subpopulací lymfocytů a neutrofilních granulocytů v periferní krvi	193
Vasiľ M.: Antibiotic resistance with bacterial causative agents isolated from dairy cow mastitis Rezistencia k antibiotikám pri bakteriálnych pôvodcoch izolovaných z mastitíd dojníc	201
Kroupová V., Kratochvíl P., Kaufmann S., Kursá J., Trávníček J.: Metabolic effect of iodine addition in laying hens Metabolická odezva aditivního příjmu jodu u nosnic	207
Pokludová L., Hera A.: Microbial contamination of veterinary medicaments and drugs in the Czech Republic 1993 to 1996 (in English) Mikrobiální kontaminace veterinárních preparátů a léčiv v České republice v letech 1993 až 1996	213
Raszyk J., Gajdušková V., Ulrich R., Jarošová A., Nápravník A., Salava J., Palác J.: Evaluation of the occurrence of some harmful pollutants on cattle farms Zhodnocení výskytu vybraných rizikových polutantů na farmách skotu	233
Šlosárková S., Chroust K., Skřivánek M.: Effects of toltrazuril and monensin in kids naturally infected with coccidiosis Ovlivnění kokcidiózy kůzlat aplikací toltrazurilu a monensinu	239
Matouch O., Jaroš J., Vrzal V.: Oral vaccination of fox cubs against rabies in the vicinity of dens Orální vakcinace liškat proti vzteklině u nor	245
Hruška K.: On the occasion of professor MVDr. Zdeněk Věžník, DrSc., seventieth birthday on June 30, 1998 (in English)	265
Pospíšil L.: The planet Earth in jeopardy and Smidak principles (in English)	266
Věžník Z.: Chronic stress and its impact on reproductive functions (in English)	268
Anke M., Dorn W., Gunstheimer G., Arnhold W., Gleis M., Anke S., Löscher E.: Effect of trace and ultratrace elements on the reproduction performance of ruminants (in English)	272
Maraček I., Lazár L., Dietzová I., Koréneková B., Choma J., Dávid V.: Residues of heavy metals in cow reproductive organs and morbidity of cattle in the fallout region of a metallurgical plant (English abstract only)	283
Kummer V., Mašková J., Čanderle J., Bendová J.: Concentration of thyroid hormones in cows with ovarian dysfunctions (English abstract only)	284
Svojanovská K., Pilka L.: Negative environmental factors on fertility (English abstract only)	284
Zralý Z., Bendová J., Švecová D., Zajícová A., Diblíková I., Věžník Z.: Importance of antibodies to the sperms in blood serum of bulls and association with ejaculate quality (English abstract only)	285
Selevan S. G., Rubeš J., Slott V. L., Zudová Z., Borkovec L., Evenson D. P., Perreault S. D.: Air pollution and semen quality in young men residing in two Czech communities (English abstract only)	286

Jan Z., Doležel R., Kudláč E., Lopatářová M., Vinkler A., Vitásek R., Zajíc J.: Influence of cadmium on gametes and early embryos of pigs <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> (English abstract only)	287
Zajíc J., Čech S., Doležel R., Kudláč E., Lopatářová M., Vitásek R.: Influence of cadmium on bovine gametes and early embryos <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> (English abstract only)	287
Raszyk J., Ulrich R., Nápravník A., Salava J., Palác J.: Differences in burden of pig and cattle farms by hazardous pollutants (English abstract only)	288
Machala M., Vondráček J.: Estrogenic activity of xenobiotics (English abstract only)	288
Čanderle J., Kummer V., Wuhib Y., Zralý Z., Mašková J., Bendová J., Zajícová A., Pospíšil L.: The yeast <i>Candida guilliermondii</i> and its impact on reproduction (English abstract only)	289
Hontela A., Henley S., Girard C.: Endocrine anomalies in fish chronically exposed to environmental xenobiotics (English abstract only)	290
Hontela S.: The value of human life at the end of the next century (in English)	291
Borošková Z., Dvorožňáková E., Dubinský P., Velebný S., Tomašovičová O., Machnicka B.: Effect of free and liposomized albendazole on the immune responses in healthy and <i>Toxocara canis</i> -infected mice (in English) Vplyv voľného a lipozómovaného albendazolu na imunitné prejavy zdravých a <i>Toxocara canis</i> infikovaných myší	293
Pavlík I., Černík J., Bárta J., Kundera J., Pecka Z.: Occurrence of coccidia (<i>Caryospora neofalconis</i> and <i>Caryospora kutzeri</i>) in birds of prey in falcon breeding facility in Milotice in the Czech Republic (in English) Výskyt kokciidií (<i>Caryospora neofalconis</i> a <i>Caryospora kutzeri</i>) u dravých ptáků v odchovně sokolovitých dravců v Milotičích v České republice	301
Řeháček J., Kocianová E., Kováčová E., Kapitančík B., Jurčina A., Naď O., Ličko P.: Occurrence of bovine coxiellosis in the district of Bardejov, Eastern Slovakia Výskyt koksielózy hovädzieho dobytku v okrese Bardejov na východnom Slovensku	325
Horký D., Illek J., Pechová A.: Distribution of heavy metals in calf organs (in English) Distribúcie ťžkých kovů v orgánech telat	331
Egwu G. O., Aliyu M. M., Ameh J. A.: Survivability of <i>Mycoplasma agalactiae</i> strains in caprine milk (in English) Přežívání kmenů <i>Mycoplasma agalactiae</i> v kozím mléku	343
Zobundžija M., Novak Renata, Kozarić Z., Mihelić D., Brkić A.: The morphohistochemical analysis of the <i>pars costalis</i> and <i>pars lumbalis diaphragmae</i> in lambs (in English) Morfohistochemická analýza <i>pars costalis</i> a <i>pars lumbalis diaphragmae</i> u jehňat	357
Čisláková L., Dietzová Z., Prokopčáková H.: Ornithosis of municipal pigeons <i>Columba livia</i> f. <i>domestica</i> gone wild in Košice Ornitóza u mestských zdivočených holubov <i>Columba livia</i> f. <i>domestica</i> v Košiciach	361
Hurná E., Hurná S.: Cytotoxicity and genotoxicity of cadmium (CdCl ₂) investigated on a rat liver epithelial cell line (Anr-4 cells) and Chinese hamster lung fibroblasts (V 79 cells) (in English) Sledovanie cytotoxicity a genotoxicity kadmia (CdCl ₂) na pečevných bunkách potkanov (Anr-4) a pľúcnych fibroblastoch čínskeho skrečka (V 79 cell line)	365
Sedláček I., Benda P.: Isolation of <i>Lactococcus garvieae</i> species from bovine mastitis Izolace druhu <i>Lactococcus garvieae</i> z boviní mastitidy	371
SHORT COMMUNICATIONS – KRÁTKÁ SDĚLENÍ	
Páčová Z., Urbanová E.: The first isolation of <i>Psychrobacter immobilis</i> from foods in the Czech Republic (in English) První izolace <i>Psychrobacter immobilis</i> z potravin v České republice	111
Modríc T., Simmen F. A.: Non-radioactive <i>in situ</i> hybridization of porcine embryos: a method to detect and localize the expression of early developmental genes (in English) Neradioaktivní hybridizace <i>in situ</i> na embryích prasete: metoda detekce a lokalizace exprese časných vývojových genů	165
Čelko A. M., Rosina J.: Epidemiology of avian influenza A (H5N1) Epidemiologie pačů chřipky A (H5N1)	219

PRELIMINARY COMMUNICATIONS – PŘEDBĚŽNÁ SDĚLENÍ

Raszyk J., Gajdůšková V., Jarošová A., Salava J., Palác J.: Occurrence of phthalic acid esters (PAEs) in combined feedstuffs and adipose tissues of swine and cattle (in English) Výskyt esterů kyseliny ftalové (PAE) v krmných směsích a tukové tkáni prasat a skotu	93
REVIEW ARTICLES – PŘEHLEDY	
Faldyna M.: Differential antigens of leukocytes of dog, cat, horse, pig and ruminant Diferenční antigeny leukocytů psa, kočky, koně, prasete a přežvýkavců	55
Mátlová L., Fischer O., Kazda J., Kaustová J., Bartl J., Horváthová A., Pavlík I.: The occurrence of mycobacteria in invertebrates and poikilothermic animals and their role in the infection of other animals and man Výskyt mykobakterií u bezobratlých a poikilotermních živočichů a jejich význam při infekci zvířat a lidí	115
Pavlík I., Bartl J., Parmová I., Havelková M., Kubín M., Bažant J.: Occurrence of bovine tuberculosis in animals and humans in the Czech Republic in the years 1969 to 1996 (in English) Výskyt bovinní tuberkulózy u zvířat a lidí v České republice v letech 1969 až 1996	221
Pospíšil L.: <i>Chlamydia pecorum</i>	249
Sládek Z., Ryšánek D.: Morphologic and functional characteristics of bovine somatic cells in milk Morfologická a funkční charakteristika somatických buněk mléka skotu	255
Pospíšil L.: Chlamydiosis in the fish Chlamydióza ryb (epitheliocystis)	307
Machala M., Vondráček J.: Estrogenic activity of xenobiotics (in English) Estrogenní aktivita cizorodých látek	311
Holub A., Baranyiová E.: Animal behaviour and Czech veterinary curriculum in the 1920s and 1930s Chování zvířat a české zvěrolékařské studijní plány ve dvacátých a třicátých letech	319
Váradý M., Čorba J.: Methods of detection of anthelmintic resistance in nematodes of domestic animals Metódy detekcie antihelmintickej rezistencie nematódov hospodárskych zvierat	347
INFORMATION – INFORMACE	
Hruška K.: Civil Corporation BIOTREND Občanské sdružení BIOTREND	16
Hruška K.: Animal Production and Health Newsletter No. 27, Dec. 1997 (in English)	92
Hruška K.: Revue Scientifique et Technique (in English)	92
Hruška K.: Centaur Newsletter Flash Information (in English and in Czech)	96
Hruška K.: The importance of scientific publications is increasing Význam odborných publikací vzrůstá	133
Baranyiová E.: Conference on the Physiology of Food and Fluid Intake Konference o řízení příjmu potravy a tekutin	355
BOOK REVIEWS – RECENZE	
Doležel R.: Grygar I., Kudláč E.: Ultrasonography in Veterinary Obstetrics and Gynecology (in Czech) Grygar I., Kudláč E.: Ultrasonografie ve veterinárním porodnictví a gynekologii	50
Jurčina A.: A Concise Catalogue of Selected Pharmaceutical (in English)	200
Šutiak V.: B. F. Kania: Veterinary Chemotherapy (in English)	318
Šutiak V.: B. F. Kania: Selected Problems of Veterinary Pharmacology (in English)	323
GLOSSARY – BIOTECHNOLOGY	
VÝKLADOVÝ SLOVNÍK – BIOTECHNOLOGIE	66

VĚCNÝ REJSTŘÍK

Acidobazický profil	
– bahnice; březost; Fenclův acidobazický přístup	27
– tele	
– antipyretikum; lyzin-salicylát; snášenlivost; klinické a laboratorní hodnocení	1
– respirační syndrom; acidobazická rovnováha; vliv	69
Aglutinační test	
– <i>Candida guillermundii</i> ; sérologie; kráva; poruchy reprodukce	289
Albendazol	
– lipozomy; toxokaróza; imunita; myš	293
Alkalická fosfatáza	
– enterocyty; tenké střevo; denzitometrická analýza; sele	75
Alveolární makrofágy	
– interleukin-8; imunoreaktivita; interferon α ; nepřítomnost; PRRS virus; infekce	7
Aminopeptidáza M	
– enterocyty; tenké střevo; denzitometrická analýza; sele	75
Analýza obrazu	
– mikrobiální kontaminace; testy; veterinární léčiva; Česká republika; 1993 až 1996	213
Antibiotika	
– penicilin; chloramfenikol; oxacilin; erytromycin; oxytetracyklin; rezistence; bakteriální původci mastitidy; dojnice	201
Antihelmintická léčba	
– GIN; <i>Moniezia</i> spp.; společná pastva; ovce; skot	153
Antihelmintická rezistence	
– metody detekce; nematody; hospodářská zvířata	347
Antipyretikum	
– lyzin-salicylát; snášenlivost; klinické a laboratorní hodnocení; tele	1
Apoptóza	
– melanom; elektronová mikroskopie; prase	81
Arsen	
– nedostatek As; reprodukční užitkovost; koza; vliv	272
Bahnice	
– březost; acidobazická rovnováha; změny; Fenclův acidobazický přístup	27
Bakterie	
– bakteriální původci; mastitidy; rezistence k antibiogramům; dojnice	201
– <i>Chlamydia pecorum</i> ; klinický obraz; experimentální infekce; speciální popis; genetika	249
– kontaminace bakteriemi; veterinární léčiva; ČR; 1993 až 1996	213
– mykobakterie	115, 221
Beran	
– štítná žláza; struma; aplikace kalium jodatum; klinický a ultrasonografický nález	179
Beta₂-sympatomimetika	
– dýchací cesty; epitel; ultrastuktura; králík; vliv	187
Bezobratlí	
– mykobakterie; výskyt; infekce zvířat a lidí	115
Biomarker	
– orální vakcinace; vzteklina; liška obecná	245
Blastocysta	
– embryo; prase; hybridizace <i>in situ</i> ; genové exprese	165
Bovinní tuberkulóza	
– výskyt; zvířata; lidé; ČR; 1969 až 1996	221
Bránice	
– <i>pars costalis</i> ; <i>pars lumbalis</i> ; průměr svalových vláken; jehně	357
Brom	
– nedostatek b.; reprodukční užitkovost; koza; vliv	272
Březost	
– bahnice; fyziologická období; Fenclův acidobazický přístup	27
Busulphan	
– embryo; růst a vývoj; vliv; kuře	105
Býk	
– ejakulát; spermie; testosteron; hydroxykortikosteron; krevní sérum; chronický stres	268
– spermie; protilátky proti spermium; krevní sérum; ELISA	137, 285
<i>Candida guillermundii</i>	
– kráva; sérologie; aglutinační test; poruchy reprodukce	289
<i>Caryospora kutzeri</i>	
– draví ptáci; diagnostika; terapie; prevence; výskyt; ČR	301
<i>Caryospora neofalconis</i>	
– draví ptáci; diagnostika; terapie; prevence; výskyt; ČR	301
Cizorodé látky	
– endokrinní anomálie; xenoestrogeny; chronický stres; ryby	290
– xenoestrogeny; endokrinní poruchy; cytochrom P450; syntéza steroidů; vitelogenin; test s využitím reporterového genu	288, 311
<i>Colomba livia f. domestica</i>	
– zdivočelí holubi; ornitóza; <i>Chlamydia psittaci</i> ; Košice	361
<i>Coxiella burnetii</i>	
– koklióza; výskyt; skot; SR	325
Cytochrom P450	
– cizorodé látky; estrogeni aktivita; detekce	288, 311
– hybridizace <i>in situ</i> ; prase; embryo; detekce časných vývojových genů	165
Cytotoxicita	
– kadmium; jaterní buňky (Anr-4); potkan; plicní fibroblasty (V 79); čínský křeček	365
Česká republika	
– bovinní tuberkulóza; zvířata; lidé; výskyt; 1969 až 1996	221
– exhalace; oblast Teplice a Prachatic; mladí muži; kvalita semene	286
– kokcidie <i>Caryospora neofalconis</i> a <i>Caryospora kutzeri</i> ; odchovna sokolovitých dravců; Milotice	301
– neosporóza; pes; první případ výskytu	51
– <i>Psychrobacter imobilis</i> ; potraviny; první izolace	111
– veterinární preparáty a léčiva; mikrobiální kontaminace; testy; 1993 až 1996	213
Čínský křeček	
– plicní fibroblasty (V 79); kadmium; cytotoxicita; genotoxicita	365
DDT	
– krmivo; napájecí voda; stájový prach; vozovkový prach; půda; farmy skotu a prasat; kráva; srst; mléko; tělesné orgány; tuk; výskyt	233, 288
DEAE-dextran	
– orální aplikace; sající myš; penetrace viru; vzteklina	161
Denzitometrická analýza	
– alkalická fosfatáza; aminopeptidáza M; enterocyty; tenké střevo; sele	75
Diagnostika	
– <i>Caryospora neofalconis</i> ; <i>Caryospora kutzeri</i> ; draví ptáci; odchovna sokolovitých dravců; ČR	301
Diferenční antigeny (CD antigeny)	
– leukocyty; sub populace; pes; kočka; kuň; prase; přezývkavci	55

Draví ptáci	
– <i>Caryospora neofalcomis</i> ; <i>Caryospora kutzeri</i> ; diagnostika; terapie; prevence; odchovna sokolovitých dravců; ČR	301
Drůbež	
– nosnice; nadbytek jodu; metabolická odezva	207
– ptačí chřipka A (H5N1); epidemiologické charakteristiky; kontrolní opatření; výskyt	219
Dýchací cesty	
– epitel; ultrastruktura; β_2 -sympatomimetika; vliv; králík	187
Edémová nemoc prasat	
– sele; protilátky; neutralizace SLTHv; imunizace SLTH	11
Eimeria spp.	
– kokcidioza; kůže; toltrazuril; monensin	239
Ejakulát	
– kvalita ejakulátu; býk; autoprotilátky proti spermium	285
– kvalita semene; mládí mužů; oblast Teplice a Prachatic; ČR	286
– objem ejakulátu; muž; býk; chronický stres	268
Elektronová mikroskopie	
– apoptóza; melanom; prase	81
Embryo	
– hybridizace <i>in situ</i> ; genové exprese; metoda detekce a lokalizace exprese; prase	165
– raná embrya; prase; kráva; vliv Cd; <i>in vivo</i> ; <i>in vitro</i>	287
– růst a vývoj; gonády; busulphan; vliv; kuře	105
Endokrinní poruchy	
– cizorodé látky; xenoestrogeny; detekce; test s využitím reporterového genu	288, 311
– xenoestrogeny; patologie; chronický stres; ryby	290
Endometrium	
– histopatologické a funkční změny; ovariální cysty; kráva	97
Enterocyty	
– alkalická fosfatáza; aminopeptidáza M; denzitometrická analýza; sele	75
Enzymoimunoanalytická metoda (ELISA)	
– <i>Candida guilliermondii</i> ; reprodukční poruchy; kráva	289
– neosporóza; klinické příznaky; pes; ČR	51
– protilátky proti spermium; krevní sérum; býk; kanec	137, 285
Epidemiologie	
– epidemiologické charakteristiky; ptačí chřipka A (H5N1); drůbež	219
Epitel	
– ultrastruktura; dýchací cesty; β_2 -sympatomimetika; králík	187
Erytromycin	
– rezistence a citlivost k e.; mastitidy; dojnice	201
Escherichia coli	
– edémová nemoc prasat; sele; protilátky	11
Estery kyseliny italové (PAE)	
– výskyt; krmné směsi; tukové tkáně; farmy prasat a skotu; výroby krmných směsí; zdravotní riziko	93
Exhalace	
– oblast Teplice a Prachatic; ČR; mládí mužů; kvalita semene	286
Experimentální infekce	
– <i>Chlamydia pecorum</i> ; projevy infekce; patogenita	249
Farmy prasat a skotu	
– rizikové polutanty; výskyt; zdravotní riziko	233, 288
– výskyt karcinogenních PAH; krmivo; napájecí voda; stájový a vozovkový prach; prasečí kejda; puda; zdravotní riziko	17, 288
– výskyt PAE; krmné směsi; tukové tkáně; zdravotní riziko	93
Fenolový rovince	
– acidobazická rovnováha; změny; bahnice; březost	27
Fluor	
– nedostatek F; reprodukční užitkovost; koza; vliv	272
Folikuly	
– ovariální dysfunkce; léčba; progesteron; kráva	145
Gamety	
– prase; kráva; vliv Cd; <i>in vivo</i> ; <i>in vitro</i>	287
Gen	
– časné vývojové g.; exprese; metoda detekce a lokalizace exprese; hybridizace <i>in situ</i> ; embryo; prase	165
Genetika	
– <i>Chlamydia pecorum</i> ; genetické skupiny; metoda DNA fingerprinting	249
Genotoxicita	
– kadmium; jaterní buňky (Anr-4); potkan; plicní fibroblasty (V 79); čínský křeček	365
Gonádotropní releasing hormon (GnRH)	
– indukovaná ovulace; kráva; sání telat	169
Gonády	
– embryo; růst a vývoj; busulphan; vliv; kuře	105
Hematologický profil	
– tele; antipyretikum; lyzin-salicylát; snášenlivost; klinická a laboratorní hodnocení	1
Histochemie	
– endometrium; ovariální cysty; kráva	97
– histochemická aktivita; svalová vlákna; bránice – <i>pars costalis</i> a <i>pars lumbalis</i> ; jehně	357
Histologie	
– endometrium; ovariální cysty; kráva	97
Hlinik	
– nedostatek AI; reprodukční užitkovost; koza; vliv	272
Hybridizace in situ	
– embryo; prase; genové exprese; metoda detekce a lokalizace exprese	165
Hydroxykortikosteron	
– krevní sérum; býk; chronický stres	268
Chlamydia pecorum	
– klinický obraz; experimentální infekce; speciální popis; genetika; imunochemie	249
Chlamydia psittaci	
– ornitóza; zdivočelí holubi <i>Columba livia f. domestica</i> ; Košice	361
Chlamydióza (epitheliocystis)	
– ryby; příznaky; etiologie; hostitelské druhy; geografické rozšíření	307
Chloramfenikol	
– rezistence a citlivost k ch.; mastitidy; dojnice	201
IFAT	
– <i>Neospora caninum</i> ; neosporóza; klinické příznaky; pes; ČR	51
Implantace vajíček	
– hybridizace <i>in situ</i> ; embryo; prase	165
Imunita	
– edémová nemoc prasat; sele; toxoid SLTH; protilátky; neutralizace SLTHv	11
– toxokaróza; albendazol; lipozomy; myš	293
Incidence	
– <i>Mycobacterium bovis</i> ; <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; zvířata; lidé; výskyt; ČR; 1969 až 1996	221
Incusura ischiadica major	
– <i>n. ischiadicus</i> ; přístup; blokáda; skot; koza	33
Interferon α	
– nepřítomnost; PRRS virus; alveolární makrofágy	7

Interleukin-8	
– PRRS virus; imunoreaktivita; alveolární makrofágy	7
In vitro	
– antihelmintická rezistence; metody detekce; nematody;	
hospodářská zvířata	347
– endokrinní anomálie; xenoestrogeny; chronický stres; ryby	290
– prase; alveolární makrofágy; PRRS virus; interleukin-8	7
– prase; skot; gamety; raná embrya; vliv Cd	287
– xenoestrogeny; vitelogenin; aktivita; detekce	288, 311
In vivo	
– antihelmintická rezistence; metody detekce; nematody;	
hospodářská zvířata	347
– endokrinní anomálie; xenoestrogeny; chronický stres; ryby	290
– prase; skot; gamety; raná embrya; vliv Cd	287
– xenoestrogeny; vitelogenin; aktivita; detekce	288, 311
Játra	
– jaterní buňky (Anr-4); kadmium; cytotoxicita; genotoxicita;	
potkan	365
– rizikové polutanty; výskyt; kráva; farmy skotu	233
Jehně	
– bránice – <i>pars costalis</i> a <i>pars lumbalis</i> ; průměr svalových	
vláken; histochemická aktivita	357
Jod	
– kravské mléko; hladina I; přídavek jodu; eliminace jodového	
deficitu	173
– nedostatek I; reprodukční užitkovost; koza; vliv	272
– vaječný žloutek; nadbytek I; krevní parametry; spotřeba krmiva;	
nosnice	207
Kadmium	
– cytotoxicita; genotoxicita; jaterní buňky (Anr-4); potkan; plícní	
fibroblasty (V 79); čínský křeček	365
– distribuce Cd; orgány telat	331
– gamety; raná embrya; prase; skot; vliv Cd	287
– krmivo; napájecí voda; stájový prach; vozovkový prach; půda;	
farmy skotu a prasat; kráva; srst; mléko; tělesné orgány; tuk;	
výskyt	233, 288
– nedostatek Cd; reprodukční užitkovost; koza; vliv	272
– rezidua; reprodukční orgány; nemocnost; kráva; spad	
z metalurgických závodů	283
– vliv Cd; gamety; raná embrya; <i>in vivo</i> ; <i>in vitro</i> ; prase; kráva	287
Kalium jodatum	
– aplikace; struma; štítná žláza; klinický a ultrasonografický	
nález; beran	179
Kanec	
– spermie; protilátky proti spermii; krevní sérum; ELISA	137
Klinický nález	
– štítná žláza; struma; aplikace kalium jodatum; beran	179
Klinický obraz	
– <i>Chlamydia pecorum</i> ; diagnostické metody; savci	249
Kočka	
– leukocyty; subpopulace; diferenciační antigeny (CD antigeny)	55
Kokcidióza	
– kůzle; toltrazuril; monensin; aplikace; <i>Eimeria</i> spp.	239
Kontaminace	
– bakterie; plisně; veterinární léčiva; ČR; 1993 až 1996	213
Koxielóza	
– <i>Coxiella burnetii</i> ; výskyt; skot; SR	325
Koza	
– <i>incusura ischadica major</i> ; <i>n. ischadicus</i> ; přístup; blokáda	33
– kozi mléko; <i>Mycoplasma agalactiae</i> ; přežívání	343
– kůzle; kokcidióza; toltrazuril; monensin; <i>Eimeria</i> spp.	239
– reprodukční užitkovost; stopové a ultrastopové prvky;	
nedostatek; vliv na užitkovost	272
Králík	
– dýchací cesty; epitel; ultrastruktura; β_2 -sympatomimetika; vliv	187
Kráva	
– bovinní tuberkulóza; výskyt; ČR; 1969 až 1996	221
– <i>Candida guilliermondii</i> ; poruchy reprodukce; vliv	289
– gamety; raná embrya; vliv Cd	287
– indukovaná ovulace; GnRH; sání telat	169
– koxielóza; <i>Coxiella burnetii</i> ; SR	325
– mastitida	
– bakteriální původci; rezistence k antibiotikům	201
– <i>Lactococcus garvieae</i> ; izolace	371
– mléčná žláza; somatické buňky; morfologie	255
– mléko; obsah I; přídavek I; eliminace jodové deficiencie	173
– ovariální cysty; endometrium; histologie; histochemie	97
– ovariální dysfunkce	
– léčba; progesteron; folikulární vývoj	145
– thyroidní hormony; koncentrace	284
– reprodukční užitkovost; nedostatek Mn; vliv	272
– srst; mléko; svalovina; játra; ledviny; tuk; rizikové polutanty;	
výskyt	233, 288
– těžké kovy; rezidua; reprodukční orgány; nemocnost; spad	
z metalurgických závodů	283
Krev	
– arteriální k.; krevní plyny; acidobazická rovnováha; respirační	
syndrom; tele	69
– krevní parametry; nadbytek I; nosnice	207
– krevní sérum	
– protilátky proti spermii; býk; kanec	137, 285
– testosteron; hydroxykortikosteron; býk; chronický stres	268
– periferní k.; lymfocyty; neutrofilní granulocyty; subpopulace;	
pes; věk	193
Krmiva	
– rizikové polutanty; výskyt; farmy skotu a prasat	233, 288
– výskyt karcinogenních PAH; farmy prasat a skotu	17, 288
– výskyt PAE; farmy prasat a skotu; výroby krmných směsí	93
Kůň	
– leukocyty; subpopulace; diferenciační antigeny (CD antigeny)	55
Kuře	
– gonády; embrya; růst a vývoj; busulphan; vliv	105
<i>Lactococcus garvieae</i>	
– mastitida; izolace <i>L. garvieae</i>	371
Ledviny	
– rizikové polutanty; výskyt; kráva; farmy skotu a prasat	233, 288
Leukocyty	
– subpopulace; diferenciační antigeny (CD antigeny); pes; kočka;	
kůň; prase; přežvýkavci	55
Lidská populace	
– <i>Mycobacterium bovis</i> ; <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; výskyt;	
ČR; 1969 až 1996	221
– mykobakterie; možnosti přenosu; infekce lidí	115
– plodnost; životní prostředí; negativní vlivy na plodnost	284
– reprodukční funkce; chronický stres; vliv	268
Lindan	
– krmivo; napájecí voda; stájový prach; vozovkový prach; půda;	
farmy skotu a prasat; kráva; srst; mléko; tělesné orgány; tuk;	
výskyt	233, 288
Lipozomy	
– albendazol; toxokaróza; imunita; myš	293
Liška obecná	
– vzteklina; orální vakcinace; biomarker; sérokonverze; účinnost	245
Lithium	
– nedostatek Li; reprodukční užitkovost; koza; vliv	272
Lymfocyty	
– subpopulace; periferní krev; pes; věk	193

Lyzin-salicylát	
– antipyretikum; snášenlivost; klinické a laboratorní hodnocení; tele	1
Mangan	
– nedostatek Mn; reprodukční užitkovost; koza; skot; vliv	272
Mastitida	
– bakteriální původci m.; rezistence k antibiotikům; dojnice	201
– <i>Lactococcus garvieae</i> ; izolace; skot	371
Měď	
– nedostatek Cu; reprodukční užitkovost; koza; vliv	272
– rezidua Cu; reprodukční orgány; nemocnost; kráva; spad z metalurgických závodů	283
Melanom	
– miniaturní prase; maligní melanom; metastázy; tělesné orgány ..	87
– prase; apoptóza; elektronová mikroskopie	81
Metastázy	
– maligní melanom; miniaturní prase; tělesné orgány	87
Miniaturní prase	
– maligní melanom; metastázy; tělesné orgány	87
Mléčná žláza skotu	
– somatické buňky; morfologická a funkční charakteristika	255
Mléko	
– dojnice	
– hladina jodu; přídavek jodu; kvalita mléka	173
– rizikové polutanty; výskyt; farmy skotu	233
– somatické buňky; morfologická a funkční charakteristika	255
– koza	
– <i>Mycoplasma agalactiae</i> ; přežívání	343
Monensin	
– aplikace; kokcidióza; kůže; <i>Eimeria</i> spp.	230
Moniezia spp.	
– společná pastva; skot; ovce; infekce; anthelmintická léčba	153
Morfologie	
– somatické buňky; mléčná žláza skotu	255
Muž	
– mladí muži; kvalita semene; exhalace; oblast Teplice a Prachatic; ČR	286
Mycoplasma agalactiae	
– přežívání; kozi mléko	343
Mykobakterie	
– <i>Mycobacterium bovis</i> ; <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; zvířata; lidé; výskyt; prevalence; incidence; ozdravování; prevence; ČR; 1969 až 1996	221
– výskyt; bezobratlí; poikilotermní obratlovci; infekce zvířat a lidí	115
Myš	
– sající m.; DEAE-dextran; orální aplikace; penetrace viru; vzteklina	161
– toxokaróza; lipozomy; albendazol; imunita	293
Napájecí voda	
– rizikové polutanty; výskyt; farmy skotu a prasat	233, 288
– výskyt karcinogenních PAH; farmy prasat a skotu	17, 288
Nematody	
– gastrointestinální nematody (GIN); společná pastva; skot; ovce; infekce; anthelmintická léčba	153
– hospodářská zvířata; anthelmintická rezistence; metody detekce	347
Nemocnost	
– skot; těžké kovy; spad z metalurgických závodů	283
Neospora caninum	
– neosporóza; klinické příznaky; IFAT; ELISA; pes; ČR	51
Nervus ischiadicus	
– <i>incusura ischiadica major</i> ; přístup; blokáda; skot; ovce	33
Neutrofilní granulocyty	
– subpopulace; periferní krev; pes; věk	193
Nikl	
– rezidua; reprodukční orgány; nemocnost; kráva; spad z metalurgických závodů	283
Nosnice	
– nadbytek jodu; metabolická odezva; vaječný žlutek; spotřeba krmiva; krevní parametry	207
Olovo	
– krmivo; napájecí voda; stájový prach; vozovkový prach; půda; farmy skotu a prasat; kráva; srst; mléko; tělesné orgány; tuk; výskyt	233, 288
– rezidua; reprodukční orgány; nemocnost; kráva; spad z metalurgických závodů	283
Ornitóza	
– zdivočelí holubi <i>Columba livia</i> f. <i>domestica</i> ; <i>Chlamydia psittaci</i> ; Košice	361
Ovariální cysty	
– endometrium; histopatologické a funkční změny; kráva	97
– léčba; progesteron; folikulární vývoj; kráva	145
Ovariální dysfunkce	
– kráva	
– ovariální acyklie; léčba; progesteron; folikulární vývoj	145
– thyroïdní hormony; koncentrace	284
Ovce	
– společná pastva; ovce a skot; gastrointestinální nematody; <i>Moniezia</i> spp.; anthelmintická léčba	153
Ovulace	
– indukovaná ovulace; GnRH; kráva; odchov telat sáním	169
– ovariální dysfunkce; léčba; progesteron; kráva	145
Oxacilin	
– rezistence a citlivost k o.; mastitidy; dojnice	201
Oxytetracyklin	
– rezistence a citlivost k o.; mastitidy; dojnice	201
Penetrace viru viz Virus	
Penicilin	
– rezistence a citlivost k p.; mastitidy; dojnice	201
Pes	
– leukocyty; subpopulace; diferenční antigeny (CD antigeny) ...	55
– neosporóza; <i>Neospora caninum</i> ; klinické příznaky; IFAT; ELISA; ČR	51
– periferní krev; lymfocyty; neutrofilní granulocyty; subpopulace; věk	193
– vzteklina; antirabičká vakcína; antigenní aktivita; intramuskulární a intradermální aplikace vakcíny	45
Plicní fibroblasty (V 79)	
– kadmium; cytotoxicita; genotoxicita; čínský křeček	365
Plísně	
– kontaminace plísněmi; veterinární léčiva; ČR; 1993 až 1996	213
Plodnost	
– lidská populace; životní prostředí; negativní vlivy na plodnost ..	284
Poikilotermní obratlovci	
– mykobakterie; výskyt; infekce zvířat a lidí	115
Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH)	
– farmy prasat a skotu; krmivo; napájecí voda; stájový a vozovkový prach; kejda prasat; půda; výskyt karcinogenních PAH	17
Polychlorované bifenylly (PCB)	
– krmivo; napájecí voda; stájový prach; vozovkový prach; půda; farmy skotu a prasat; kráva; srst; mléko; tělesné orgány; tuk; výskyt	233, 288

Potkan	
– jaterní buňky (Anr-4); kadmium; cytotoxicita; genotoxicita	365
Potraviný	
– mléko; mléčné výrobky; <i>Psychrobacter immobilis</i> ; první izolace; ČR	111
Prase	
– alkalická fosfatáza	75
– denzitometrická analýza	75
– diferenciální antigeny	55
– edémová nemoc prasat	11
– embryo	165, 287
– farmy prasat	17, 93, 288
– gamety	287
– genové exprese	165
– kanec	137
– leukocyty	55
– melanom	81, 87
– miniaturní prase	87
– prasečí kejda	17, 288
– reprodukční a respirační syndrom prasat	7
– rizikové polutanty	17, 93, 288
– sele	11, 75
– spermie	137
– stopové prvky	287
– tenké střevo	75
Prasečí kejda	
– výskyt karcinogenních PAH; farmy prasat a skotu	17, 288
Prevalence	
– <i>Mycobacterium bovis</i> ; <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; zvířata; lidé; výskyt; ČR: 1969 až 1996	221
Prevence	
– <i>Caryospora neofalconis</i> ; <i>Caryospora kutzeri</i> ; draví ptáci; odehvná sokolovitých dravců; ČR	301
– <i>Mycobacterium bovis</i> ; <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; zvířata; lidé; výskyt; ČR: 1969 až 1996	221
Přezívání	
– <i>Mycoplasma agalactiae</i> ; kozi mléko	343
Přezývavci	
– leukocyty; subpopulace; diferenciální antigeny (CD antigeny)	55
– reprodukční užitkovost; stopové a ultrastopové prvky; vliv na užitkovost	272
Progesteron	
– ovariální dysfunkce; léčba; PRID; kráva	145
Protilátky	
– autoprotilátky proti spermii; krevní sérum	
– býk; kanec	137
– býk; kvalita ejakulátu	285
– edémová nemoc prasat; neutralizace SLTIIv; sele	11
Průtoková cytometrie	
– periferní krev; lymfocyty; pes; věk	193
<i>Psychrobacter immobilis</i>	
– charakteristika; potraviný; první izolace; ČR	111
Ptačí chřipka A (H5N1)	
– epidemiologické charakteristiky; kontrolní opatření; výskyt	219
Půda	
– karcinogenní PAH; výskyt; farmy prasat a skotu	17, 288
– rizikové polutanty; výskyt; farmy skotu a prasat	233, 288
Reprodukce	
– <i>Candida guilliermondii</i> ; kráva; poruchy reprodukce; vliv	289
– reprodukční funkce; lidé; skot; chronický stres; vliv	268
– reprodukční orgány; kráva; rezidua; těžké kovy; spád z metalurgických závodů	283
– reprodukční užitkovost; přezývavci; stopové a ultrastopové prvky; vliv	272
Reprodukční a respirační syndrom prasat (PRRS)	
– virus; interleukin-8; imunoreaktivita; interferon α ; alveolární makrofágy	7
Respirační syndrom	
– tele; arteriální krev; krevní plyny; acidobazická rovnováha	69
Rizikové polutanty	
– kadmium; olovo; rtuť; DDT; lindan; polychlorované bifenylly; výskyt; farmy skotu a prasat	233, 288
Rtuť	
– krmivo; napájecí voda; stájový prach; vozovkový prach; půda; farmy skotu a prasat; kráva; srst; mléko; tělesné orgány; tuk; výskyt	233, 288
– rezidua; reprodukční orgány; nemocnost; kráva; spád z metalurgických závodů	283
Rubidium	
– nedostatek Rb; reprodukční užitkovost; koza; vliv	272
Růst a vývoj	
– drůbeží embryo; busulphan; vliv	105
Ryby	
– endokrinní anomálie; cizorodé látky; chronický stres	290
– chlamydioza; příznaky; etiologie; hostitelské druhy; geografické rozšíření	307
Sele	
– denzitometrická analýza; alkalická fosfatáza; aminopeptidáza M; enterocyty; tenké střevo	75
– edémová nemoc prasat; protilátky; neutralizace SLTIIv; imunizace SLTII	11
Selen	
– distribuce Se; orgány telat	331
– nedostatek Se; reprodukční užitkovost; koza; vliv	272
Sérokonverze	
– orální vakcinace; vzteklina; liška obecná	245
Sérologie	
– <i>Candida guilliermondii</i> ; aglutinační test; kráva; poruchy reprodukce	289
Shiga-like toxin IIv (SLTIIv)	
– edémová nemoc prasat; sele; imunizace SLTII; protilátky	11
Skot	
– antipyretikum; snášenlivost	1
– bovinní tuberkulóza	221
– býk	137, 268, 285
– <i>Candida guilliermondii</i>	289
– embryo	287
– estery kyseliny italové (PAE)	93
– farmy skotu	17, 93, 233, 288
– gamety	287
– jodový deficit	173
– koxielóza	325
– kráva	97, 145, 169, 173, 201, 221, 233, 255, 272, 283, 284, 287, 288, 289, 325, 371
– mastitidy	201, 371
– mléko	173, 233, 255
– nemocnost	283
– ovariální dysfunkce	97, 145, 284
– ovulace	169
– parazitózy	153
– polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH)	17
– protilátky	137, 285
– přístup a blokáda nervů	33
– reprodukce	272, 289
– reprodukční orgány	283
– respirační syndrom	69
– rizikové polutanty	233, 288
– somatické buňky	255
– spermie	137, 268, 285
– společná pastva	153

– stopové prvky	272, 287
– stres	268
– tele	1, 69, 169, 331
– těžké kovy	283, 331
Slovenská republika	
– koxielóza; <i>Coxiella burnetii</i> ; výskyt; skot; ZD Zborov	325
– ornitóza; zdivočelí holubi <i>Columba livia f. domestica</i> ; <i>Chlamydia psittaci</i> ; Košice	361
Somatické buňky	
– mléčná žláza skotu; morfologie s. b.	255
Spermie	
– býk; autoprotilátky proti spermii; kvalita ejakulátu	285
– býk; kanec; protilátky proti spermii; krevní sérum; ELISA	137
– muž; býk; počet spermii; ejakulát; chronický stres	268
Společná pastva	
– ovce; skot; gastrointestinální nematody; <i>Moniezia</i> spp.; antihelmintická léčba	153
Srst	
– rizikové polutanty; výskyt; kráva; farmy skotu a prasat	233, 288
Stájový prach	
– karcinogenní PAH; výskyt; farmy prasat a skotu	17, 288
– rizikové polutanty; výskyt; farmy skotu a prasat	233, 288
Stopové prvky	
– Mn, Zn, Cu, I, Se; reprodukční užitkovost; přežvykavci; vliv	272
Stres	
– chronický stres	
– lidé; býk; ejakulát; spermie; testosteron; hydroxykortikosteron; semenná plazma; biochemické ukazatele	268
– ryby; endokrinní anomálie; cizorodé látky	290
Struma	
– štítná žláza; aplikace kalium jodatum; klinický a ultrasonografický nále; beran	179
Svalová vlákna	
– průměr s. v.; bránice – <i>pars costalis a pars lumbalis</i> ; histochemická aktivita; jehně	357
Svalovina	
– rizikové polutanty; výskyt; kráva; farmy skotu a prasat	233, 288
Syntéza steroidů	
– endokrinní poruchy; xenoestrogeny; aktivita; detekce	288, 311
– hybridizace <i>in situ</i> ; prase; embryo; detekce časných vývojových genů	165
Štítná žláza	
– dojnice; mléko; hladina jodu; přídavek jodu; trijodtyronin; tyroxin; TSH	173
– struma; aplikace kalium jodatum; klinický a ultrasonografický nále; beran	179
Tele	
– antipyretikum; lizin-salicylát; snášenlivost; klinické a laboratorní hodnocení	1
– respirační syndrom; arteriální krev; krevní plyny; acidobazická rovnováha	69
– sání telat; dojnice; indukovaná ovulace; GnRH	169
– těžké kovy; lokalizace ve tkáních a buňkách	331
Tělesné orgány	
– kráva; rizikové polutanty; výskyt	233
– miniaturní prase; maligní melanom; metastázy	87
– tele; těžké kovy; lokalizace ve tkáních a buňkách	331
Tenké střevo	
– alkalická fosfatáza; aminopeptidáza M; denzitometrická analýza; sele	75
Terapie	
– <i>Caryospora neofalconi</i> ; <i>Caryospora kutzeri</i> ; draví ptáci; odehova na sokolovitých dravců; ČR	301
Test s využitím reporterového genu	
– cizorodé látky; estrogenní aktivita; detekce	288, 311
Testosteron	
– krevní sérum; buněčná suspenze; býk; chronický stres	268
Těžké kovy	
– Cd, Zn, Se; lokalizace ve tkáních a buňkách; tele	331
– Ni, Cu, Zn, Cd, Hg, Pb; rezidua; reprodukční orgány; kráva; nemocnost skotu; spad z metalurgických závodů	283
Thyroidní hormony	
– koncentrace; ovariální dysfunkce; kráva	284
Toltrazuril	
– aplikace; kokcidioza; kůzle; <i>Eimeria</i> spp.	239
Toxocara canis	
– myš; albendazol; imunita	293
Toxoid SLTII	
– edémová nemoc prasat; sele; protilátky neutralizující SLTIIv	11
Trijodtyronin	
– štítná žláza; dojnice; mléko; hladina jodu; přídavek jodu	173
Tuk	
– rizikové polutanty; výskyt; kráva; farmy skotu a prasat	233, 288
Tyrotropní hormon hypofýzy (TSH)	
– štítná žláza; dojnice; mléko; hladina jodu; přídavek jodu	173
Tyroxin	
– štítná žláza; dojnice; mléko; hladina jodu; přídavek jodu	173
Ultrasonografie	
– štítná žláza; struma; aplikace kalium jodatum; beran	179
Ultrastopové prvky	
– Al, As, Br, Cd, F, Li, Rb, V; reprodukční užitkovost; přežvykavci; vliv	272
Vaječný žloutek	
– nosnice; nadbytek jodu; spotřeba krmiva	207
Vakcína	
– antirabická v.; antigenní aktivita; intramuskulární a intradermální aplikace v.; pes	45
– orální vakcinace; vzteklina; liška obecná	245
Vanad	
– nedostatek V; reprodukční užitkovost; koza; vliv	272
Veterinární léčiva	
– mikrobiální kontaminace; testy; analýza obrazu; ČR; 1993 až 1996	213
Virus	
– penetrace v.; vzteklina; DEAE-dextran	161
– PRRS; alveolární makrofágy; interleukin-8; interferon α	7
Vitelogenin	
– cizorodé látky; estrogenní aktivita; detekce	288, 311
Vozovkový prach	
– rizikové polutanty; výskyt; farmy skotu a prasat	233, 288
– výskyt karcinogenních PAH; farmy prasat a skotu	17, 288
Výrobní krmných směsí	
– výskyt PAE; krmné směsi; zdravotní riziko	93
Vzteklina	
– liška obecná; orální vakcinace; účinnost	245
– penetrace viru; vakcinační kmen Vnukovo-32; DEAE-dextran; orální aplikace; sající myš	161
– pes; antirabická vakcína; antigenní aktivita; intramuskulární a intradermální aktivita vakcíny	45

Xenobiotika	
- endokrinní anomálie; xenoestrogeny; chronický stres; ryby	290
- xenoestrogeny; endokrinní poruchy; cytochrom P450; syntéza steroidů; vitelogenin; test s využitím reporterového genu; estrogenní aktivita	288; 311
Xenoestrogeny	
- cizorodé látky; endokrinní poruchy; cytochrom P450; test s využitím reporterového genu	288; 311
Zdravotní riziko	
- rizikové polutanty; výskyt; krmivo; napájecí voda; stájový prach; vozovkový prach; půda; srst; mléko; tělesné orgány; kráva; farmy skotu a prasat	233, 288
- výskyt PAE; krmiva; tukové tkáně; farmy prasat a skotu; výroby krmných směsí	93
- výskyt PAH; krmivo; napájecí voda; stájový a vozovkový prach; prasečí kejda; půda; farmy prasat a skotu	17
Zinek	
- distribuce Zn; orgány telat	331
- nedostatek Zn; reprodukční užitkovost; koza; vliv	272
- rezidua; reprodukční orgány; nemocnost; kráva; spad z metalurgických závodů	283
Zvířata	
- hospodářská zvířata; nematody; antihelmintická rezistence; metody detekce	347
- <i>Mycobacterium bovis</i> ; <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; výskyt; ČR; 1969 až 1996	221
- mykobakterie; možnosti přenosu; infekce zvířat	115
Žluté tělísko	
- ovarální dysfunkce; léčba; progesteron; kráva	145

SUBJECT INDEX

Acid-base profile

- calf
 - antipyretic preparation; lysine-salicylate; clinical and laboratory evaluation 1
 - respiratory syndrome; acid-base balance; effect 69
- ewe; pregnancy; Fencel's acid-base approach 27

Agglutination test

- *Candida guilliermondii*; serology; cow; reproduction disorders 289

Air pollution

- district Teplice and Prachaticze; Czech Republic; young men; semen quality 286

Airways

- epithelium; ultrastructure; β_2 -adrenergic agonists; effect; rabbit 187

Albendazole

- liposomes; toxocarosis; immunity; mouse 293

Alkaline phosphatase

- enterocytes; jejunum; densitometric analysis; piglet 75

Aluminium

- aluminium deficiency; reproduction performance; goat; effect 272

Alveolar macrophages

- interleukin-8; immunoreactivity; interferon- α ; absence; PRRS virus; infection 7

Aminopeptidase M

- enterocytes; jejunum; densitometric analysis; piglet 75

Animals

- farm animals; nematodes; anthelmintic resistance; methods of detection 347
- mycobacteria; opportunities of impact; infection of animals 115
- *Mycobacterium bovis*; *Mycobacterium tuberculosis*; occurrence; Czech Republic; 1969 to 1996 221

Anthelmintic resistance

- methods of detection; nematodes; domestic animals 347

Anthelmintic treatment

- GIN; *Moniezia* spp.; mixed grazing; sheep; cattle 153

Antibiotics

- penicillin; chloramphenicol; oxacillin; erythromycin; oxytetracycline; resistance; bacterial causative agents of mastitis; dairy cow 201

Antibodies

- antibodies to the sperms; blood serum
 - bull; boar 137
 - bull; ejaculate quality 285
- oedema disease of swine; SLTHV neutralizing; piglet 11

Antipyretic preparation

- lysine-salicylate; tolerance; clinical and laboratory evaluation; calf 1

Apoptosis

- melanoma; electron microscopy; pig 81

Arsenic

- arsenic deficiency; reproduction performance; goat; effect 272

Avian influenza A (H5N1)

- epidemiological characteristics; control measures; occurrence 219

Bacteria

- bacterial causative agents; mastitis; antibiotic resistance; dairy cow 201
- *Chlamydia pecorum*; clinical manifestation; experimental infection; characteristics of isolates 249
- microbial contamination; veterinary drugs; Czech Republic; 1993 to 1996 213
- mycobacteria 115, 221

Beta₂ adrenergic agonists

- airways; epithelium; ultrastructure; rabbit; effect 187

Biomarker

- oral vaccination; rabies; fox 245

Birds of prey

- *Caryospora neofalconis*; *Caryospora kutzeri*; diagnostics; therapy; prevention; falcon breeding facility; Czech Republic 301

Blastocyst

- embryo; pig; *in situ* hybridization; expression of genes 165

Blood

- arterial b.; blood gases; acid-base balance; respiratory syndrome; calf 69
- blood parameters; iodine surplus; laying hen 207
- blood serum
 - antibodies to the sperms; bull; boar 137, 285
 - testosterone; hydroxycorticosterone; bull; chronic stress 268
- peripheral b.; lymphocytes; neutrophil granulocyte; subpopulations; dog; age 193

Boar

- sperms; antibodies to the sperms; blood serum; ELISA 137

Body organs

- calf; heavy metals; localisation in tissues and cells 331
- cow; harmful pollutants; occurrence 233
- miniature pig; malignant melanoma; metastases 87

Bovine mammary gland

- somatic cells; morphologic and functional characteristics 255

Bovine tuberculosis

- occurrence; animals; humans; Czech Republic; 1969 to 1996 221

Bromine

- bromine deficiency; reproduction performance; goat; effect 272

Bull

- ejaculate; sperms; testosterone; hydroxycorticosterone; blood serum; chronic stress 268
- sperms; antibodies to the sperms; blood serum; Elisa 137, 285

Busulphan

- embryo; growth and development; effect; chick 105

Cadmium

- Cd deficiency; reproduction performance; goat; effect 272
- cytotoxicity; genotoxicity; rat liver epithelial cell (Anr-4); Chinese hamster; lung fibroblasts (V 79) 365
- distribution of Cd; calf organs 331
- feed; drinking water; stable dust; road dust; soil; cattle and pig farms; cow; hair; milk; body organs; fat; occurrence 233, 288
- gametes; early embryos; pig; cattle; effect of Cd 287
- influence of Cd; gametes; early embryos; *in vivo*; *in vitro*; pig; cow 287
- residues; reproduction organs; morbidity; cow; fallout region of metallurgical plant 283

Calf

- antipyretic preparation; lysine-salicylate; tolerance; clinical and laboratory evaluation 1
- heavy metals; localisation in tissues and cells 331
- respiratory syndrome; arterial blood; blood gases; acid-base balance 69
- suckling; dairy cattle; induction of ovulation; GnRH 169

Candida guilliermondii

- cow; serology; agglutination test; reproduction disorders 289

Caryospora falconis

- birds of prey; diagnostics; therapy; prevention; occurrence; Czech Republic 301

<i>Caryospora kutzeri</i>	
– birds of prey; diagnostics; therapy; prevention; occurrence; Czech Republic	301
Cat	
– leukocytes; subpopulation; differential antigens (CD antigens)	55
Cattle	
– access to and blockade of nerves	33
– antibodies	137, 285
– antipyretic preparation; tolerance	1
– bovine tuberculosis	221
– bull	137, 268, 285
– calf	1, 69, 169, 331
– <i>Candida guilliermondii</i>	289
– cattle farms	17, 93, 233, 288
– cow	97, 145, 169, 173, 201, 221, 233, 255, 272, 283, 284, 287, 288, 289, 325, 371
– coxiellosis	325
– embryo	287
– gametes	287
– harmful pollutants	233, 288
– heavy metals	283, 331
– iodine deficiency	173
– mastitis	201, 371
– milk	173, 233, 255
– mixed grazing	153
– morbidity	283
– ovarian dysfunction	97, 145, 284
– ovulation	169
– parasitoses	153
– phthalic acid esters (PAEs)	93
– polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)	17
– reproduction	272, 289
– reproduction organs	283
– respiratory syndrome	69
– somatic cells	255
– sperms	137, 268, 285
– stress	268
– trace elements	272, 287
Chick	
– gonads; embryo; growth and development; busulphan; effect	105
Chinese hamster	
– lung fibroblasts (V 79); cadmium; cytotoxicity; genotoxicity	365
<i>Chlamydia pecorum</i>	
– clinical manifestations; experimental infection; characteristics of isolates; genetics; immunochemistry	249
<i>Chlamydia psittaci</i>	
– ornithosis; pigeons <i>Columba livia</i> f. <i>domestica</i> gone wild; Košice	361
Chlamydiosis (epitheliocystis)	
– fish; clinical signs; etiology; host range; geographical distribution	307
Chloramphenicol	
– resistance and susceptibility to c.; mastitis; dairy cow	201
Clinical finding	
– thyroid gland; goitre; administration of kalium iodatum; ram	179
Clinical manifestations	
– <i>Chlamydia pecorum</i> ; diagnostic methods	249
Coccidiosis	
– kid; toltrazuril; monensin; efficacy; <i>Eimeria</i> spp.	239
<i>Columba livia</i> f. <i>domestica</i>	
– pigeons gone wild; ornithosis; <i>Chlamydia psittaci</i> ; Košice	361
Contamination	
– bacteria; micromycetes; veterinary drugs; Czech Republic; 1993 to 1996	213
Copper	
– copper deficiency; reproduction performance; goat; effect	272
– residues; reproductive organs; morbidity; cow; fallout region of metallurgical plant	283
<i>Corpus luteum</i>	
– ovarian dysfunction; therapy; progesterone; cow	145
Cow	
– bovine tuberculosis; occurrence; Czech Republic; 1969 to 1996	221
– <i>Candida guilliermondii</i> ; reproduction disorders; effect	289
– coxiellosis; <i>Coxiella burnetii</i> ; Slovak Republic	325
– gametes; early embryos; effect of Cd	287
– hair; milk; muscles; liver; kidneys; fat; harmful pollutants; occurrence	233, 288
– heavy metals; residues; reproduction organs; morbidity; fallout region of metallurgical plants	283
– induction of ovulation; GnRH; suckling	169
– mammary gland; somatic cells; morphology	255
– mastitis	
– bacterial causative agents; antibiotic resistance	201
– <i>Lactococcus garvieae</i> ; isolation	371
– milk; iodine concentration; iodine supplementation; elimination of iodine deficiency	173
– ovarian cysts; endometrium; histology; histochemistry	97
– ovarian dysfunction	
– therapy; progesterone; follicular development	145
– thyroid hormones; concentration	284
– reproduction performance; Mn deficiency; effect	272
<i>Coxiella burnetii</i>	
– coxiellosis; occurrence; cattle; Slovak Republic	325
Coxiellosis	
– <i>Coxiella burnetii</i> ; occurrence; cattle; Slovak Republic	325
Cytochrome P450	
– <i>in situ</i> hybridization; pig; embryo; early developmental genes; detection	165
– xenobiotics; estrogenic activity; detection	288, 311
Cytotoxicity	
– cadmium; liver epithelial cell line (Anr-4); rat; lung fibroblasts (V 79); Chinese hamster	365
Czech Republic	
– air pollution; district Teplice and Prachaticze; young men; semen quality	286
– bovine tuberculosis; animals; humans; occurrence; 1969 to 1996	221
– coccidia <i>Caryospora neofalconis</i> and <i>Caryospora kutzeri</i> ; Falcon Breeding Facility; Milotice	301
– neosporosis; dog; the first case report	51
– <i>Psychrobacter immobilis</i> ; foods; first isolation	111
– veterinary medicaments and drugs; microbial contamination; tests; 1993 to 1996	213
DDT	
– feed; drinking water; stable dust; road dust; soil; cattle and pig farms; cow; hair; milk; body organs; fat; occurrence	233, 288
DEAE-dextran	
– oral administration; suckling mice; penetration of virus; rabies	161
Densitometric analysis	
– alkaline phosphatase; aminopeptidase M; enterocytes; jejunum; piglet	75
Diagnostics	
– <i>Caryospora neofalconis</i> ; <i>Caryospora kutzeri</i> ; birds of prey; Falcon Breeding Facility; Czech Republic	301
Diaphragm	
– <i>pars costalis</i> ; <i>pars lumbalis</i> ; muscle fiber diameter; lamb	357
Differential antigens (CD antigens)	
– leukocytes; subpopulation; dog; cat; horse; pig; ruminants	55
Dog	
– leukocytes; subpopulation; differential antigens (CD antigens)	55

– neosporosis; <i>Neospora caninum</i> ; clinical signs; IFAT; ELISA; Czech Republic	51
– peripheral blood; lymphocytes; neutrophil granulocyte; subpopulations; age	193
– rabies; rabies vaccine; antigenic activity; intramuscular and intradermal activity of vaccine	45
Drinking water	
– carcinogenic PAH; occurrence; pig and cattle farms	17, 288
– harmful pollutants; occurrence; cattle and pig farms	233, 288
Egg yolk	
– laying hen; iodine surplus; feed consumption	207
Eimeria spp.	
– coccidiosis; kid; toltrazuril; monensin	239
Ejaculate	
– ejaculate quality; bull; antibodies to the sperms	285
– semen quality; young men; district Teplice nad Prácheckem; Czech Republic	286
– volume of ejaculates; man; bull; chronic stress	268
Electron microscopy	
– apoptosis; melanoma; pig	81
Embryo	
– early embryos; pig; cow; effect of Cd; <i>in vivo</i> ; <i>in vitro</i>	287
– growth and development; gonads; busulphan; effect; chick	105
– <i>in situ</i> hybridization; expression of genes; method to detect and localize of expression; pig	165
Endocrine disruption	
– xenobiotics; xenoestrogens; detection; reporter gene assay	288, 311
– xenoestrogens; pathology; chronic stress; fish	290
Endometrium	
– histological and functional alterations; ovarian cysts; cow	97
Enterocytes	
– alkaline phosphatase; aminopeptidase M; densitometric analysis; piglet	75
Enzyme-immunoanalytical method (ELISA)	
– antibodies to the sperm; blood serum; bull; boar	137, 285
– <i>Candida guilliermondii</i> ; reproduction disorders; cow	289
– neosporosis; clinical signs; dog; Czech Republic	51
Epidemiology	
– epidemiological characteristics; avian influenza A (H5N1); poultry	219
Epithelium	
– ultrastructure; airways; β_2 -adrenergic agonists; rabbit	187
Erythromycin	
– resistance and susceptibility to e.; mastitis; dairy cow	201
Escherichia coli	
– oedema disease of swine; piglet; antibodies	11
Ewe	
– pregnancy; acid-base balance; changes; Fenel's acid-base approach	27
Experimental infection	
– <i>Chlamydia pecorum</i> ; manifestation of infection; pathogenesis	249
Fat	
– harmful pollutants; occurrence; cow; cattle and pig farms	233, 288
Feed processing plants	
– occurrence of PAEs; feedstuffs; health risk	93
Feedstuffs	
– harmful pollutants; occurrence; cattle and pig farms	233, 288
– occurrence of carcinogenic PAH; pig and cattle farms	17, 288
– occurrence of PAEs; pig and cattle farms; feed processing plants	93
Fenel's equations	
– acid-base balance; changes; ewe; pregnancy	27
Fertility	
– human population; environment; negative influence on fertility	284
Fish	
– chlamydiosis; clinical signs; etiology; host range; geographical distribution	307
– endocrine anomalies; xenobiotics; chronic stress	290
Flow cytometry	
– peripheral blood; lymphocytes; dog; age	193
Fluorine	
– fluorine deficiency; reproduction performance; goat; effect	272
Follicles	
– ovarian dysfunction; therapy; progesterone; cow	145
Foods	
– milk; dairy products; <i>Psychrobacter immobilis</i> ; first isolation; Czech Republic	111
Fox	
– rabies; oral vaccination; biomarker; seroconversion; efficiency	245
Gametes	
– pig; cow; effect of Cd; <i>in vivo</i> ; <i>in vitro</i>	287
Gene	
– early developmental g.; expression; method to detect and localize of expression; <i>in situ</i> hybridization; embryo; pig	165
Genetics	
– <i>Chlamydia pecorum</i> ; genetic groups; DNA fingerprinting method	249
Genotoxicity	
– cadmium; liver epithelial cell line (Anr-4); rat; lung fibroblasts (V 79); Chinese hamster	365
Goat	
– goat's milk; <i>Mycoplasma agalactiae</i> ; survivability	343
– <i>measura ischiadica major</i> ; <i>n. ischiadicus</i> ; access; blockade	33
– kid; coccidiosis; toltrazuril; monensin; <i>Eimeria</i> spp.	239
– reproduction performance; trace and ultratrace elements; deficiency; effect on reproduction	272
Goitre	
– thyroid gland; administration of kalium iodatum; clinical and ultrasonographic finding; ram	179
Gonadotropin releasing hormone (GnRH)	
– induction of ovulation; cow; suckling	169
Gonads	
– embryo; growth and development; busulphan; effect; chick	105
Growth and development	
– chicken embryos; busulphan; effect	105
Haematological profile	
– calf; antipyretic preparation; lysine-salicylate; clinical and laboratory evaluation	1
Hair	
– harmful pollutants; occurrence; cow; cattle and pig farms	233, 288
Harmful pollutants	
– cadmium; lead; mercury; DDT; lindane; polychlorinated biphenyls; occurrence; cattle and pig farms	233, 288
Health risk	
– harmful pollutants; occurrence; feed; drinking water; stable dust; road dust; soil; hair; milk; body organs; cow; cattle and pig farms	233, 288
– occurrence of PAEs; feedstuffs; adipose tissues; pig and cattle farms; feed processing plants	93
– occurrence of PAH; feedstuffs; drinking water; stable and road dust; porcine liquid manure; soil; pig and cattle farms	17
Heavy metals	
– Cd, Zn, Se; localisation in tissues and cells; calf	331

- Ni, Cu, Zn, Cd, Hg, Pb; residues; cow; morbidity of cattle; fallout region of metallurgical plant	283
Histochemistry	
- endometrium; ovarian cysts; cow	97
- histochemical activity; muscle fibre; diaphragm - <i>pars costalis</i> and <i>pars lumbalis</i> ; lamb	357
Histology	
- endometrium; ovarian cysts; cow	97
Horse	
- leukocytes; subpopulation; differential antigens (CD antigens)	55
Human population	
- fertility; environmental agents; influence on fertility	284
- mycobacteria; opportunities of impact; infection of human	115
- <i>Mycobacterium bovis</i> ; <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; occurrence; 1969 to 1996	221
- reproductive function; chronic stress; impact	268
Hydroxycorticosterone	
- blood serum; bull; chronic stress	268
Indirect fluorescent antibody test (IFAT)	
- <i>Neospora caninum</i> ; neosporosis; clinical signs; dog; Czech Republic	51
Image analysis	
- microbial contamination; tests; veterinary drugs; Czech Republic; 1993 to 1996	213
Immunity	
- oedema disease of swine; piglet; SLTH toxin; antibodies neutralizing SLTHiv	11
- toxocarosis; albendazole; liposome; mouse	293
Incidence	
- <i>Mycobacterium bovis</i> ; <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; animals; humans; occurrence; Czech Republic; 1969 to 1996	221
<i>Incusura ischiadica major</i>	
- <i>n. ischiadicus</i> ; access; blockade; cattle; goat	33
<i>In situ</i> hybridization	
- embryo; pig; expression of genes; method to detect and localize of expression	165
Interferon-α	
- absence; PRRS virus; alveolar macrophages	7
Interleukin-8	
- PRRS virus; immunoreactivity; alveolar macrophages	7
Invertebrates	
- mycobacteria; occurrence; infection of animals and man	115
<i>In vitro</i>	
- anthelmintic resistance; methods of detection; nematodes; farm animals	347
- endocrine anomalies; xenoestrogens; chronic stress; fish	290
- pig; alveolar macrophages; PRRS virus; interleukin-8	7
- pig; cattle; gametes; early embryos; effect of Cd	287
- xenoestrogens; vitellogenin; activity; detection	288, 311
<i>In vivo</i>	
- anthelmintic resistance; methods of detection; nematodes; domestic animals	347
- endocrine anomalies; xenoestrogens; chronic stress; fish	290
- pig; cattle; gametes; early embryos; effect of Cd	287
- xenoestrogens; vitellogenin; activity; detection	288, 311
Iodine	
- cow's milk; iodine concentration; iodine supplementation; elimination of iodine deficiency	173
- egg yolk; iodine surplus; blood parameters; feed consumption; laying hen	207
- iodine deficiency; reproduction performance; goat; effect	272
Jejunum	
- alkaline phosphatase; aminopeptidase M; densitometric analysis; piglet	75
Kalium iodatum	
- administration; goitre; thyroid gland; clinical and ultrasonographic finding; ram	179
Kidneys	
- harmful pollutants; occurrence; cow; cattle and pig farms	233, 288
<i>Lactococcus garvieae</i>	
- mastitis; cattle; isolation of <i>L. garvieae</i>	371
Lamb	
- diaphragm - <i>pars costalis</i> and <i>pars lumbalis</i> ; muscle fibre diameter; histochemical activity	357
Laying hen	
- iodine surplus; metabolic effect; egg yolk; feed consumption; blood parameters	207
Lead	
- feed; drinking water; stable dust; road dust; soil; cattle and pig farms; cow; hair; milk; body organs; fat; occurrence	233, 288
- residues; reproduction organs; morbidity; cow; fallout region of metallurgical plant	283
Leukocytes	
- subpopulation; differential antigens (CD antigens); dog; cat; horse; pig; ruminants	55
Lindane	
- feed; drinking water; stable dust; road dust; soil; cattle and pig farms; cow; hair; milk; body organs; fat; occurrence	233, 288
Liposomes	
- albendazol; toxocarosis; immunity; mouse	293
Lithium	
- lithium deficiency; reproduction performance; goat; effect	272
Liver	
- harmful pollutants; occurrence; cow; cattle farms	233
- liver epithelial cell line (Anr-4); cadmium; cytotoxicity; genotoxicity; rat	365
Lung fibroblasts (V 79)	
- cadmium; cytotoxicity; genotoxicity; Chinese hamster	365
Lymphocytes	
- subpopulations; peripheral blood; dog; age	193
Lysine-salicylate	
- antipyretic preparation; tolerance; clinical and laboratory evaluation; calf	1
Man	
- young men; semen quality; air pollution; district Teplice and Prachatice; Czech Republic	286
Manganese	
- manganese deficiency; reproduction performance; goat; cattle; effect	272
Mastitis	
- bacterial causative agents of <i>m.</i> ; antibiotics resistance; dairy cow	201
- <i>Lactococcus garvieae</i> ; isolation; cattle	371
Melanoma	
- miniature pig; malignant melanoma; metastases; body organs	87
- pig; apoptosis; electron microscopy	81
Mercury	
- feed; drinking water; stable dust; road dust; soil; cattle and pig farms; cow; hair; milk; body organs; fat; occurrence	233, 288
- residues; reproduction organs; morbidity; cow; fallout region of metallurgical plant	283

- Metastases**
 – malignant melanoma, immature pig; body organs 87
- Mice**
 – suckling m.; DEA-E-dextran; oral administration; penetration of rabies virus 161
 – toxocarosis; liposomes; alendazole; immunity 293
- Micromycetes**
 – mycogeny; contamination; veterinary drugs; Czech Republic; 1993 to 1996 213
- Milk**
 – dairy cow 233
 – harmful pollutants; occurrence; cattle farms 233
 – iodine concentration; iodine supplementation; milk quality 173
 – somatic cells; morphologic and functional characteristics 255
 – goat 343
 – *Mycoplasma agalactiae*; survivability 343
- Miniature pig**
 – malignant melanoma; metastases; body organs 87
- Mixed grazing**
 – sheep; cattle; gastrointestinal nematodes; *Moniezia* spp.; anthelmintic treatment 153
- Monensin**
 – efficacy; coccidiosis; kid; *Eimeria* spp. 239
- Montezia spp.**
 – mixed grazing; cattle; sheep; infection; anthelmintic treatment 153
 – cattle; heave mites; fallop region of metallurgical plants 283
- Morphology**
 – somatic cells; bovine mammary gland 255
- Muscle fibre**
 – m.; L. dimercer; diaphragm – *pars costalis* and *pars lumbalis*; histochemical activity; lamb 357
- Muscles**
 – harmful pollutants; occurrence; cow; cattle and pig farms 233, 288
 – *Mycobacterium bovis*; *Mycobacterium tuberculosis*; animals; human; occurrence; prevalence; incidence; control; prevention; Czech Republic; 1969 to 1996 221
 – occurrence; invertebrates; poikilothermic vertebrates; infections of animals and man 115
 – *Mycoplasma agalactiae* 343
 – survivability; goat's milk 343
- Nematodes**
 – farm animals; anthelmintic resistance; methods of detection 347
 – gastrointestinal nematodes (GIN); mixed grazing; cattle; sheep; infection; anthelmintic treatment 153
 – *Neospora caninum* 51
 – necropsosis; clinical signs; IFAT; ELISA; dog; Czech Republic 33
 – *Nervus ischiadicus* 193
 – subpopulations; peripheral blood; dog; age 283
- Neutrophil granulocyte**
 – metallogical plant 283
 – residues; reproduction organs; morbidity; cow; fallop region of 283
- Oedema disease of swine**
 – piglet antibodies; SLT.IV neutralizing; immunization with the SLT.II 11
- Oreithosis**
 – pigeons *Columba livia* F. *domestica* gene wild; *Chlamydia psittaci*; Kosiice 361
- Porcine liquid manure**
 – occurrence of carcinogenic PAH; pig and cattle farms 17, 288
- Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)**
 – pig and cattle farms; feedstuffs; drinking water; stable and road dust; porcine liquid manure; soil; occurrence of carcinogenic PAH 17
- Polychlorinated biphenyls (PCB)**
 – feed; drinking water; stable dust; road dust; soil; cattle and pig farms; cow; hair; milk; body organs; fat; occurrence 233, 288
- Poikilothermic vertebrates**
 – mycobacterial; occurrence; infection of animals and man 115
 – immunization with the SLT.II 11
- Piglet**
 – densitometric analysis; alkaline phosphatase; amniopidase M; embryocytes; jejunum 75
 – oedema disease of swine; antibodies; SLT.IV neutralizing; immunization with the SLT.II 11
- Pig and cattle farms**
 – harmful pollutants; occurrence; health risk 233, 288
 – occurrence of carcinogenic PAH; feedstuffs; drinking water; stable and road dust; pig slurry; soil; health risk 17, 288
 – occurrence of PAHs; feedstuffs; adipose tissues; health risk 93
- Pig**
 – alkaline phosphatase 75
 – boar 137
 – densitometric analysis 75
 – differentiation antigens 55
 – embryo 287
 – gametes 287
 – gene expression 165
 – harmful pollutants 17, 93, 288
 – jejunum 75
 – leukocytes 55
 – melanoma 81, 87
 – miniature pig 87
 – oedema disease of swine 11
 – pig farms 17, 93, 288
 – piglet 11, 75
 – porcine liquid manure 17, 288
 – porcine reproductive and respiratory syndrome 7
 – sperms 137
 – trace elements 287
- Phthalic acid esters (PAEs)**
 – resistance and susceptibility to o.; mastitis; dairy cow 201
- Penicillin**
 – Penetration of virus see virus
- Oxytetracycline**
 – resistance and susceptibility to o.; mastitis; dairy cow 201
- Oxachlin**
 – *in situ* hybridization; porcine embryo 165
- Ovarian implantation**
 – ovarian dysfunction; therapy; progesterone; cow 145
- Ovarian dysfunction**
 – cow 169
 – induction of ovulation; GnRH; suckled dairy cow 169
 – ovarian dysfunction; therapy; progesterone; cow 145
 – development 145
 – gonadotropin hormones; concentration 284
- Ovarian dysfunction**
 – endometrium; histological and functional alterations; cow 97
 – therapy; progesterone; follicular development 145
- Phthalic acid esters (PAEs)**
 – occurrence; feedstuffs; adipose tissues; pig and cattle farms; feed processing plants; health risk 93
- Pig**
 – alkaline phosphatase 75
 – boar 137
 – densitometric analysis 75
 – differentiation antigens 55
 – embryo 287
 – gametes 287
 – gene expression 165
 – harmful pollutants 17, 93, 288
 – jejunum 75
 – leukocytes 55
 – melanoma 81, 87
 – miniature pig 87
 – oedema disease of swine 11
 – pig farms 17, 93, 288
 – piglet 11, 75
 – porcine liquid manure 17, 288
 – porcine reproductive and respiratory syndrome 7
 – sperms 137
 – trace elements 287
- Pig and cattle farms**
 – harmful pollutants; occurrence; health risk 233, 288
 – occurrence of carcinogenic PAH; feedstuffs; drinking water; stable and road dust; pig slurry; soil; health risk 17, 288
 – occurrence of PAHs; feedstuffs; adipose tissues; health risk 93
- Piglet**
 – densitometric analysis; alkaline phosphatase; amniopidase M; embryocytes; jejunum 75
 – oedema disease of swine; antibodies; SLT.IV neutralizing; immunization with the SLT.II 11
- Poikilothermic vertebrates**
 – mycobacterial; occurrence; infection of animals and man 115
 – immunization with the SLT.II 11
- Polychlorinated biphenyls (PCB)**
 – feed; drinking water; stable dust; road dust; soil; cattle and pig farms; cow; hair; milk; body organs; fat; occurrence 233, 288
- Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)**
 – pig and cattle farms; feedstuffs; drinking water; stable and road dust; porcine liquid manure; soil; occurrence of carcinogenic PAH 17
- Porcine liquid manure**
 – occurrence of carcinogenic PAH; pig and cattle farms 17, 288
- Oreithosis**
 – pigeons *Columba livia* F. *domestica* gene wild; *Chlamydia psittaci*; Kosiice 361
- Oxachlin**
 – *in situ* hybridization; porcine embryo 165
- Ovarian implantation**
 – ovarian dysfunction; therapy; progesterone; cow 145
- Ovarian dysfunction**
 – cow 169
 – induction of ovulation; GnRH; suckled dairy cow 169
 – ovarian dysfunction; therapy; progesterone; cow 145
 – development 145
 – gonadotropin hormones; concentration 284
- Ovarian dysfunction**
 – endometrium; histological and functional alterations; cow 97
 – therapy; progesterone; follicular development 145
- Phthalic acid esters (PAEs)**
 – resistance and susceptibility to o.; mastitis; dairy cow 201
- Penicillin**
 – Penetration of virus see virus
- Oxytetracycline**
 – resistance and susceptibility to o.; mastitis; dairy cow 201
- Oxachlin**
 – *in situ* hybridization; porcine embryo 165
- Ovarian implantation**
 – ovarian dysfunction; therapy; progesterone; cow 145
- Ovarian dysfunction**
 – cow 169
 – induction of ovulation; GnRH; suckled dairy cow 169
 – ovarian dysfunction; therapy; progesterone; cow 145
 – development 145
 – gonadotropin hormones; concentration 284
- Ovarian dysfunction**
 – endometrium; histological and functional alterations; cow 97
 – therapy; progesterone; follicular development 145

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)	
– virus; interleukin 8; immunoreactivity; interferon- α ; alveolar macrophages	7
Poultry	
– avian influenza A (H5N1); epidemiological characteristics; control measures; occurrence	219
– laying hen; iodine surplus; metabolic effect	207
Pregnancy	
– ewe; physiological periods; Fencl's acid-base approach	27
Prevalence	
– <i>Mycobacterium bovis</i> ; <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; animals; humans; occurrence; Czech Republic; 1969 to 1996	221
Prevention	
– <i>Caryospora falconis</i> ; <i>Caryospora kutzeri</i> ; birds of prey; falcon breeding facility; Czech Republic	301
– <i>Mycobacterium bovis</i> ; <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; animals; humans; occurrence; Czech Republic; 1969 to 1996	221
Progesterone	
– ovarian dysfunction; therapy; PRID; cow	145
<i>Psychobacter immobilis</i>	
– characteristics; foods; first isolation; Czech Republic	111
Rabbit	
– airways; epithelium; ultrastructure; β_2 -adrenergic agonists; effect	187
Rabies	
– dog; rabies vaccine; antigenic activity; intramuscular and intradermal application of vaccine	45
– fox; oral vaccination; efficiency	245
– penetration of virus; vaccination strain Vnukovo-32; DEAE-dextran; oral administration; suckling mice	161
Ram	
– thyroid gland; goitre; administration of kalium iodatum; clinical and ultrasonographic finding	179
Rat	
– liver epithelium cell line (Amr-4); cadmium; cytotoxicity; genotoxicity	365
Reporter gene assay	
– xenobiotics; estrogenic activity; detection	288, 311
Reproduction	
– <i>Candida guillermundii</i> ; cow; reproduction disorders; effect	289
– reproduction organs; cow; residues; heavy metals; fallout region of metallurgical plant	283
– reproduction performance; ruminants; trace and ultratrace elements; effect	272
– reproductive function; human population; cattle; chronic stress; impact	268
Respiratory syndrome	
– calf; arterial blood; blood gases; acid-base balance	69
Road dust	
– harmful pollutants; occurrence; cattle and pig farms	233, 288
– occurrence of carcinogenic PAH; pig and cattle farms	17, 288
Rubidium	
– rubidium deficiency; reproduction performance; goat; effect	272
Ruminants	
– leukocytes; subpopulation; differential antigens (CD antigens)	55
– reproduction performance; trace and ultratrace elements; deficiency; effect on performance	272
Selenium	
– distribution of Se; calf organs	331
– selenium deficiency; reproduction performance; goat; effect	272
Seroconversion	
– oral vaccination; rabies; fox	245
Serology	
– <i>Candida guillermundii</i> ; agglutination test; cow; reproduction disorders	289
Sheep	
– mixed grazing; sheep and cattle; gastrointestinal nematodes; <i>Moniezia</i> spp.; anthelmintic treatment	153
Shiga-like toxin IIv (SLTIIv)	
– oedema disease of swine; piglet; immunization with SLTII; antibodies	11
Slovak Republic	
– coxiellosis; <i>Coxiella burnetii</i> ; occurrence; cattle; Agricultural Cooperative Zborov	325
– ornithosis; pigeons <i>Columbia livia</i> f. <i>domestica</i> gone wild; <i>Chlamydia psittaci</i> ; Košice	361
SLTII toxoid	
– oedema disease of swine; piglet; antibodies neutralizing SLTIIv	11
Soil	
– harmful pollutants; occurrence; cattle and pig farms	233, 288
– occurrence of carcinogenic PAH; pig and cattle farms	17, 288
Somatic cells	
– bovine mammary gland; morphology of s. c.	255
Sperms	
– bull; antibodies to the sperms; ejaculate quality	285
– bull; boar; antibodies to the sperms; blood serum; ELISA	137
– man; bull; sperm count; ejaculate; chronic stress	268
Stable dust	
– harmful pollutants; occurrence; cattle and pig farms	233, 288
– occurrence of carcinogenic PAH; pig and cattle farms	17, 288
Steroid synthesis	
– endocrine disruption; xenoestrogens; activity; detection	288, 311
– <i>in situ</i> hybridization; pig; embryo; early developmental genes; detection	165
Stress	
– chronic stress	
– fish; endocrine anomalies; environmental xenobiotics	290
– human; bull; ejaculate; sperms; testosterone; hydroxycorticosterone; seminal plasma; biochemical indicators	268
Survivability	
– <i>Mycoplasma agalactiae</i> ; goat's milk	343
Testosterone	
– blood serum; cell suspension; bull; chronic stress	268
Therapy	
– <i>Caryospora neofalconis</i> ; <i>Caryospora kutzeri</i> ; birds of prey; falcon breeding facility; Czech Republic	301
Thyroid gland	
– dairy cow; milk; iodine concentration; iodine supplementation; triiodothyronine; thyroxine; TSH	173
– goitre; administration of kalium iodatum; clinical and ultrasonographic finding; ram	179
Thyroid hormones	
– concentration; ovarian dysfunction; cow	284
Thyrotropic hormone of hypophysis (TSH)	
– thyroid gland; dairy cow; milk; iodine concentration; iodine supplementation	173
Thyroxine	
– thyroid gland; dairy cow; milk; iodine concentration; iodine supplementation	173
Toltrazuril	
– efficacy; coccidiosis; kid; <i>Eimeria</i> spp.	239
Toxocara canis	
– mouse; albendazole; immunity	293

Trace elements	
– Mn, Zn, Cu, J, Se; reproduction performance; ruminants; effect	272
Triiodothyronine	
– thyroid gland; dairy cow; milk; iodine concentration; iodine supplementation	173
Ultrasonography	
– thyroid gland; goitre; administration of kalium iodatum; ram	179
Ultra-trace elements	
– Al, As, Br, Cd, F, Li, Rb, V; reproduction performance; ruminants; effect	272
Vaccine	
– oral vaccination; rabies; fox	245
– rabies v.; antigenic activity; intramuscular and intradermal application of v.; dog	45
Vanadium	
– vanadium deficiency; reproduction performance; effect	272
Veterinary drugs	
– microbial contamination; tests; image analysis; Czech Republic; 1993 to 1996	213
Virus	
– penetration of v.; rabies; DEAE-dextran	161
– PRRS; alveolar macrophages; interleukin-8; interferon- α	7
Vitellogenin	
– xenobiotics; estrogenic activity; detection	288, 311
Xenobiotics	
– endocrine anomalies; xenoestrogens; chronic stress; fish	290
– xenoestrogens; endocrine disruption; cytochrome P450; steroid synthesis; vitellogenin; reporter gene assay; estrogenic activity	288, 311
Xenoestrogens	
– xenobiotics; endocrine disruption; cytochrome P450; reporter gene assay	288, 311
Zinc	
– distribution of Zn; calf organs	331
– residues; reproduction organs; morbidity; cow; fallout region of metallurgical plant	283
– zinc deficiency; reproduction performance; goat; effect	272

AUTHOR INDEX – REJSTRÍK AUTORŮ

Abdouslam O. E.	81	Havelková M.	221
Alexa P.	11	Henley S.	290
Aliyu M. M.	343	Hera A.	213
Ameh J. A.	343	Hernández J.	27
Anke M.	272	Holub A.	319
Anke S.	272	Hontela A.	290, 291
Arnhold W.	272	Hontela S.	291
		Horák F.	153
Babič K.	33	Horák V.	87
Baranyiová E.	319, 355	Horký D.	331
Bárta J.	301	Horváthová A.	115
Bartl J.	115, 221	Hruban V.	87
Bažant J.	221	Hruška K.	16, 66, 92, 96, 133, 135, 265
Bedrica Ljiljana	33	Hurná E.	365
Benda P.	371	Hurná S.	365
Bendová J.	137, 284, 285, 289		
Benedito J. L.	27	Choma J.	169, 283
Beníšek Z.	45, 161	Chroust K.	153, 239
Bireš J.	179		
Björkman C.	51	Illek J.	331
Borkovec L.	286		
Borošková Z.	293	Jan Z.	287
Brkić A.	33, 357	Jaroš J.	245
		Jarošová A.	93, 233
Castillo C.	27	Jurčina A.	200, 325
Čanderle J.	97, 284, 289	Kapitančík B.	325
Čech S.	145	Kaufmann S.	173, 207
Čelko A. M.	219	Kaustová J.	115
Černík J.	301	Kazda J.	115
Čisláková L.	361	Kocianová E.	325
Čorba J.	347	Kolodzieyski L.	81
		Konrádová V.	187
Dávid V.	283	Koréneková B.	283
Diblíková I.	137, 285	Kotrbová A.	105
Dietzová I.	283, 361	Koudela B.	51
Doležel R.	50, 145, 287	Kováč G.	1, 69
Dorn W.	272	Kováčková E.	325
Dubinský P.	293	Kozarić Z.	357
Dudriková E.	75	Kratochvíl P.	207
Dvorožnáková E.	293	Kroupová V.	173, 207
		Kubín M.	221
Đurove A.	45, 161	Kudláč E.	287
		Kummer V.	97, 284, 289
Egwu G. O.	343	Kundera J.	301
Evenson D. P.	286	Kursa J.	173, 207
Faldyna M.	55, 193	Lazár L.	283
Fischer O.	115	Ledecký V.	81
Fortýn K.	87	Lehocký J.	1
		Lenhardt L.	75
Gajdůšková V.	17, 93, 233	Levkut M.	81
García-Partida P.	27	Ličko P.	325
Girard C.	290	Lopatářová M.	287
Gjurčević-Kantura Vesna	33	Lösch E.	272
Glei M.	272		
Gunstheimer G.	272		
		Macák V.	179
Hajurka J.	169	Machala M.	288, 311
Hamřík J.	11	Machnická B.	293
		Maraček I.	283

Mašková J.	97, 284, 289	Svojanovská K.	284
Matičič D.	33	Süliová J.	45, 161
Mátlová L.	115	Ševčíková Z.	81
Matouch O.	245	Šišák M.	137
Mihelič D.	33, 357	Šlosárková S.	239
Michna A.	69	Šutiak V.	318, 323
Modrič T.	165	Švecová D.	137, 285
Nad' O.	325	Švrček Š.	45, 161
Nagy O.	1, 69	Tichý J.	87
Nápravník A.	233, 288	Toman M.	193
Novak Renata	357	Tomašovičová O.	293
Ondrejka R.	45, 161	Trávníček J.	207
Páčová Z.	111	Trebichavský I.	7
Palác J.	17, 93, 233, 288	Trefil P.	105
Parmová I.	221	Uggla A.	51
Paulíková I.	69, 179	Uhlík J.	187
Pavlík I.	115, 221, 301	Ulrich R.	17, 233, 288
Pecka Z.	301	Urbanová E.	111
Pechová A.	331	Vajner L.	187
Perreault S. D.	286	Valiček L.	7
Pilka L.	284	Várady M.	347
Pokludová L.	213	Vasíl M.	201
Pospíšil L.	249, 266, 289, 307	Velebný S.	293
Prokopčáková H.	361	Věžník Z.	97, 137, 268, 285
Rambeck W. A.	173	Vinkler A.	287
Raszyk J.	17, 93, 233, 288	Vitásek R.	287
Rosina J.	219	Vondráček J.	288, 311
Rubeš J.	286	Vrzal V.	245
Ryšánek D.	255	Wuhib Y.	289
Řeháček J.	325	Zajíc J.	145, 287
Salajka E.	11	Zajícová A.	137, 285, 289
Salava J.	17, 93, 233, 288	Závadová J.	45
Sedláček I.	371	Zíbrin M.	81
Seidel H.	69	Zobundžija M.	357
Selevan S. G.	286	Zocová J.	187
Simmen F. A.	165	Zralý Z.	97, 137, 285, 289
Skřivánek M.	239	Zudová Z.	286
Sládek Z.	255	Žižlavská S.	153
Slott V. L.	286	Žižlavský J.	153
Smykalová Š.	105	Žižlavský M.	11
Svoboda M.	51		

AUTHOR INSTITUTION INDEX – REJSTŘÍK PRACOVÍŠŤ AUTORŮ

Alberta Hospital, Edmonton, Canada	291
Biofyzikální ústav AV ČR, Brno, Česká republika	288, 311
BIOPHARM – Výzkumný ústav farmacie a veterinárních léčiv, Pohorlí-Chotouň, Česká republika	105
Bioveta, Ivanovice na Hané, Česká republika	245
Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika	111, 371
Česká zemědělská univerzita, Praha, Česká republika	87
Environmental Protection Agency, RTP, NC, USA	286
Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA	286
Friedrich Schiller University, Jena, Germany	272
Jihočeská univerzita, České Budějovice, Česká republika	173, 207
Krajská hygienická správa, Ostrava, Česká republika	115
Masarykova univerzita, Brno, Česká republika	331
Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno, Česká republika	153, 255
Mikrobiologický ústav AV ČR, Nový Hrádek, Česká republika	7
National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden	51
Nemocnice Turnov, Česká republika	87
Odchovna sokolovitých dravců, Milotice, Česká republika	301
Okresní veterinární správa, Hodonín, Česká republika	17, 96, 233, 288
Okresný úrad – odbor štátnej veterinárnej starostlivosti, Bardejov, Slovenská republika	325
Parasitological Institute of the Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland	293
Parazitologický ústav AV ČR, České Budějovice, Česká republika	51, 301
Parazitologický ústav SAV, Košice, Slovenská republika	293, 347
South Dakota State University, Brookings, SD, USA	286
Státní veterinární správa, Praha, Česká republika	221
Státní veterinární ústav, Brno, Česká republika	233, 288
Státní veterinární ústav, Liberec, Česká republika	245
Státní veterinární ústav, Praha, Česká republika	221
Státní zdravotní ústav, Praha, Česká republika	221
Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden	51
Státní zdravotní ústav, Košice, Slovenská republika	361
Technická univerzita, Košice, Slovenská republika	365
Université du Québec à Montréal, TOXEN Research Centre, Montréal, Québec, Canada	290
University Complutense, Madrid, Spain	27
University of Florida, Gainesville, USA	165
University of Kiel, Kiel, Germany	115
University of Maiduguri, Maiduguri, Nigeria	343
University of Manitoba, Winnipeg, Canada	165
University of Munich, Munich, Germany	173, 207
University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA	286
University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain	27
University of Zagreb, Zagreb, Croatia	33, 357
Univerzita Karlova, Praha, Česká republika	187, 219
Univerzita P. J. Šafárika, Košice, Slovenská republika	361
Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice, Slovenská republika	1, 45, 75, 81, 161, 169, 179, 200, 325
Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Košice, Slovenská republika	45, 169, 201, 283, 318, 323, 365
Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Brno, Česká republika	213
Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Liběchov, Česká republika	87
Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno, Česká republika	11, 51, 66, 145, 153, 239, 287, 319, 331, 355
Virologický ústav SAV, Bratislava, Slovenská republika	325
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, Česká republika	11, 16, 17, 55, 92, 93, 96, 97, 115, 133, 135, 137, 193, 221, 233, 249, 255, 265, 266, 267, 284, 285, 286, 288, 289, 301, 311, 319, 355
Výzkumný ústav živočišné výroby, Praha-Uhřetěves, Česká republika	105

V roce 1998 bylo v časopise Veterinární medicína uveřejněno 39 původních prací, 3 krátká sdělení, 1 předběžné sdělení, 10 přehledů, 10 informací, 11 abstraktů a 4 recenze, které připravilo 186 autorů z 51 pracovišť.

In 1998, the Journal Veterinary Medicine – Czech published 39 original papers, 3 short communications, 1 preliminary communications, 10 review articles, 10 information articles, 11 abstracts and 4 book reviews, written by 186 authors from 51 institutions.

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

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

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

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

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

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

Rozšířený souhrn prací v češtině nebo slovenštině je uveřejňován v angličtině, měly by v něm být v rozsahu cca 1–2 strojopisných stran komentovány výsledky práce a uvedeny odkazy na tabulky a obrázky, popř. na nejdůležitější literární citace. Je vhodné je (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 hodnoty naměřených hodnot. Tato část by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale pouze faktické nálezy.

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

Literatura citovaná v textu práce se uvádí jménem autora a rokem vydání. Do seznamu se zařadí jen publikace citované v textu. Citace se řadí abecedně podle jména prvních autorů.

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

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

Podrobné pokyny pro autory lze vyžádat v redakci. Applications for detailed instructions for authors should be sent to the editorial office.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

VETERINARY MEDICINE – CZECH

Volume 43, No. 12, December 1998

CONTENTS

Zobundžija M., Novak Renata, Kozarić Z., Mihelić D., Brkić A.: The morphohistochemical analysis of the <i>pars costalis</i> and <i>pars lumbalis diaphragmae</i> in lambs (in English).....	357
Čisláková L., Dietzová Z., Prokopčáková H.: Ornithosis of municipal pigeons <i>Columba livia</i> f. <i>domestica</i> gone wild in Košice	361
Hurná E., Hurná S.: Cytotoxicity and genotoxicity of cadmium (CdCl ₂) investigated on a rat liver epithelial cell line (Anr-4 cells) and Chinese hamster lung fibroblasts (V 79 cells) (in English).....	365
Sedláček I., Benda P.: Isolation of <i>Lactococcus garvieae</i> species from bovine mastitis.....	371
VOLUME CONTENTS	I
SUBJECT INDEX	XII
AUTHOR INDEX	XIX
AUTHOR INSTITUTION INDEX.....	XXI

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 43, č. 12, Prosinec 1998

OBSAH

Zobundžija M., Novak Renata, Kozarić Z., Mihelić D., Brkić A.: Morfohistochemická analýza <i>pars costalis</i> a <i>pars lumbalis diaphragmae</i> u jehňat.....	357
Čisláková L., Dietzová Z., Prokopčáková H.: Ornitóza u mestských zdivočených holubov <i>Columba livia</i> f. <i>domestica</i> v Košiciach	361
Hurná E., Hurná S.: Sledovanie cytotoxicity a genotoxicity kadmia (CdCl ₂) na pečevných bunkách potkanov (Anr-4) a pľúcnych fibroblastoch čínskeho škrečka (V 79 cell line)	365
Sedláček I., Benda P.: Izolace druhu <i>Lactococcus garvieae</i> z bovinní mastitidy	371
OBSAH ROČNÍKU	I
REJSTRÍK VĚCNÝ	V
REJSTRÍK AUTORŮ	XIX
REJSTRÍK PRACOVIŠŤ AUTORŮ.....	XXI