

D 27. 351/44

PV

K 21. 11. 2001 V. H. J.

1999

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

631/2002

Knihovna ÚZPI



246 03 0008383 3

# VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

VAZBA

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

Ústav zemědělských  
a potravinářských informací  
Ústřední zemědělská a lesnická knihovna  
Slezská 7, 120 56 Praha 2

27. ledna 1999

1

1-12 i

VOLUME 44  
PRAHA  
JANUARY 1999  
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 Horák, DrSc., Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

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

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

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

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

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

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

Prof. MVDr. Bohumil Ševčík, DrSc., BIOPHARM – Research Institute of Biopharmacy and Veterinary Drugs, a. s.,

Jilové u Prahy, Czech Republic

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

### Editor-in-Chief – Vedoucí redaktorka

Ing. Zdeňka Radošová

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

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

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

**Periodicita:** Časopis vychází měsíčně (12x ročně), ročník 44 vychází v roce 1999.

**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, Česká republika. Tel.: +420 2 24 25 79 39, fax: +420 2 24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz. Podrobné pokyny pro autory jsou v redakci a na URL adrese <http://www.clark.cz/vri/Pokyny.htm>.

**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 1999 je 696 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 44 appearing in 1999.

**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, Czech Republic. Tel.: +420 2 24 25 79 39, fax: +420 2 24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz. Detailed instructions for authors are available in the editorial office and at URL address <http://www.clark.cz/vri/Pokynya.htm>.

**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 1999 is 159 USD (Europe), 167 USD (overseas).

# COMPARISON OF *TRICHINELLA SPIRALIS* LARVA ANTIGENS FOR THE DETECTION OF SPECIFIC ANTIBODIES IN PIGS\*

## POROVNANIE ANTIGÉNOV LARIEV *TRICHINELLA SPIRALIS* PRE DETEKCIU ŠPECIFICKÝCH PROTILÁTOK U OŠÍPANÝCH

K. Reiterová<sup>1</sup>, P. Dubinský<sup>1</sup>, V. V. Klimenko<sup>2</sup>, O. Tomašovičová<sup>1</sup>, E. Dvorožňáková<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Parasitological Institute of the Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic

<sup>2</sup>All Russian K. I. Skryabin Institute of Helminthology (VIGIS), Moscow, Russia

**ABSTRACT:** An immunoenzymatic method was used to compare *Trichinella spiralis* muscle larva excretory-secretory antigen (TES), somatic antigen (TE) and its fraction (TF) obtained by gel filtration. The sensitivity and specificity of the assay was verified on sera of pigs experimentally infected with *T. spiralis*, sera of healthy pigs and sera of pigs infected with *Ascaris suum* and *Oesophagostomum* spp. Extinction values recorded throughout the experiment for TE and TF antigens were higher than those for TES antigen. The presence of anti-*Trichinella* antibodies was proved by TE and TF antigens as early as day 21 while TES antigen only on day 28 post infection. Using TF and TES antigens, a 100% specificity was achieved, however, when TE antigen was used cross reactions in *A. suum* infection were observed. For the diagnosis of trichinellosis in pigs, the ELISA is recommended with using somatic larval antigen fraction of *T. spiralis* (TF).

*Trichinella spiralis*; antigens; IgG antibodies; ELISA; pigs

**ABSTRAKT:** Imunoenzymatickou metódou sme porovnávali exkrečno-sekretčný antigén (TES), somatický antigén (TE) svalových lariev *Trichinella spiralis* a frakciu tohto antigénu (TF) získanú gélovou filtráciou. Citlivosť a špecificitu testu sme overili na sérach ošipaných experimentálne infikovaných *T. spiralis*, sérach zdravých ošipaných a na sérach ošipaných infikovaných *Ascaris suum* a *Oesophagostomum* spp. Počas celého experimentu sme zaznamenali vyššie hodnoty absorbancie s TE a TF antigénmi oproti TES antigénu. S TE a TF antigénmi sme potvrdili antitrichinelové protilátky už na 21. deň, kým s TES antigénom až na 28. deň po infikovaní. S TF a TES antigénmi sme vykazovali 100% špecificitu, ale s TE antigénom sme zaznamenali nešpecifické reakcie pri infekcii *A. suum*. Pre diagnostiku trichinelózy u ošipaných odporúčame ELISA metódu s použitím frakcie somatického larválneho antigénu *T. spiralis* (TF).

*Trichinella spiralis*; antigény; protilátky IgG; ELISA; ošipané

### ÚVOD

Trichinelóza je stále aktuálna helmintozoonóza vyvolávaná nematódmi rodu *Trichinella* Railliet, 1895. Na území Slovenskej republiky sa udržuje v prírode v sylvatickom cykle a má charakter endemického výskytu. Od roku 1988 do roku 1994 bolo niekoľko epidémií v endemických oblastiach s výskytom trichinelózy diviacej zveri a mäsožravcov, s postihnutím až 34 osôb v roku 1992. Prevalencia trichinelózy diviacej zveri na Slovensku opätovne narastala z minima v roku 1991 (0,06 %) až na 0,47 % v roku 1994 (Štefančíková a Dubinský, 1995). V skutočnosti prevalencia môže byť vyššia, pretože na trichinelózu je vyšetrovaná menej ako polovica ulovenej diviacej zveri. V nových podmienkach hospodárenia, najmä s postupujúcou privatizáciou prevádzanou vznikom malochovov, sa situácia môže

zhoršovať. Trichinelóza zvierat ohrozuje zdravie ľudí a spôsobuje značné ekonomické straty.

V krajinách EÚ sa robí inšpekcia na prítomnosť *T. spiralis* u jatočných zvierat na bitúnkoch podľa pokynov 77/96/EEC a 84/319/EEC. Zvýšená pozornosť sa musí venovať vyšetreniu zvierat určených na export v súlade s predpismi cieľovej krajiny.

Dubinský (1995) podrobne analyzuje potrebu zmien súčasnej legislatívy pre tmenie trichinelózy v Slovenskej republike. Iba presná diagnóza umožňuje organizovanie vhodnej epidemiologickej kontroly. Okrem tráviciacej metódy je pre postmortálnu diagnostiku vhodná aj ELISA metóda. Jej citlivosť zodpovedá detekcii už jednej larvy v 100 g svaloviny. Špecifickosť testu priamo súvisí s kvalitou použitého antigénu. ELISA je metóda vhodná aj pre vyšetrenie živých zvierat, napríklad pri ich vývoze do krajín, kde sa vyžaduje certifikát

\* Supported by the Scientific Grant Agency – VEGA (Grant No. 2/5012/98) and District Veterinary Administration of the Slovak Republic.

o negatívnom výsledku vyšetrenia na trichinelózu. Hoci ELISA poskytuje vždy zodpovedajúce výsledky, nemôžeme celkom vylúčiť falošne pozitívne a falošne negatívne reakcie. Skvalitnením použitého antigénu môžeme značne zlepšiť diagnostickú účinnosť testu.

V našej práci porovnávame metódou ELISA exkrementno-sekrecčný antigén, somatický antigén svalových lariev *T. spiralis* a frakciu tohto antigénu získanú gélovou filtráciou na sérach ošipáných experimentálne infikovaných *T. spiralis*, náhodne vybraných zdravých ošipáných a ošipáných infikovaných *Ascaris suum* a *Oesophagostomum* spp. s cieľom zistiť ich diagnostické hodnoty, t.j. citlivosť a špecifickosť.

## MATERIÁL A METÓDY

### Experimentálne nakazenie

Ošipané plemena slovenská biela ušľachtilá s hmotnosťou 14 až 15 kg vo veku dvoch mesiacov sme nakazili infekčnými larvami *T. spiralis*. Použitý kmeň nám poskytol Dr. Britov, ktorý ho pôvodne izoloval z diviacej zveri vo Vladivostoku v roku 1982. Larvy sme pasážovali na bielych myšiach SPF kmeňa ICR v šest- až sedemmesačných intervaloch. Infekčné larvy získané tráviacou metódou podľa autorov Velebný a i. (1992) sme počítali v 0,25% roztoku agaru. Trom ošipánym sme podali *per os* dávku 600 lariev na zvierat aplikátorom na podávanie liečiv. Kontrolným ošipánym sme podali iba 0,25% agar.

Experimentálnu infekciu *T. spiralis* sme potvrdili vyšetrením poolovaných svalových vzoriek hmotnosti 50 g po pitve zvierat na 42. deň p.i. tráviacou metódou (Velebný a i., 1992). Podobne sme vyšetřili aj svalové vzorky jatočných ošipáných odporazených na bitúnku, ako aj prirodzene a experimentálne nakazených inými nematodmi.

### Použitie séra ošipáných

Vzorky krvi sme odoberali z nakazených a kontrolných zvierat z *vena jugularis* na 0., 7., 14., 21., 28., 35. a 42. deň p.i. Negatívne vzorky sér ošipáných plemena slovenská biela ušľachtilá sme získali od 35 plemených ošipáných hmotnosti 100 až 110 kg vo veku 8 až 10 mesiacov a pri porážke od 30 jatočných ošipáných rovnakého plemena, hmotnosti 110 až 120 kg vo veku 5,5 až 6 mesiacov. Koagulovanú krv sme centrifugovali 15 min pri 750 g a séra sme uchovávali pri teplote  $-20^{\circ}\text{C}$  až do vyšetrenia.

Séra piatich ošipáných plemena Landrace/Yorkshire/Duroc, hmotnosti 40 až 45 kg, ktoré sa prirodzene nakazili na pasienku kontaminovanom vajčkami *Ascaris suum* počas trojtýždňového pasenia a séra piatich ošipáných rovnakého plemena hmotnosti 30 až 35 kg, nakazených *per os* jednorazovou dávkou 200 000 infekčných lariev (L3) *Oesophagostomum* spp., sme odobrali na 30. deň p.i. Pred nakazením boli ošipané koprológicky negatívne.

## Antigény

Exkrementno-sekrecčný antigén *T. spiralis* (TES) sme pripravili inkubáciou svalových lariev získaných tráviacou metódou, ktoré sme premyli v Dulbeccomovom médiu s obsahom penicilínu (500 IU/ml) a streptomycínu (500 µg/ml). Larvy sme inkubovali v kultivačných fľašiach s polyetylénovým uzáverom, s kultivačnou plochou 75 cm<sup>2</sup> (5 000 lariev/1 ml média) v médiu s obsahom HEPES (10 mM), glutamínu (2 mM), pyruvátu (1 mM), penicilínu (50 IU/ml) a streptomycínu (50 µg/ml) pri teplote 37 °C a 10% koncentracii CO<sub>2</sub>. Po 18 až 20 hodinovej inkubácii sme oddelili larvy centrifugáciou a supernatant dialyzovali proti fyziologickému roztoku počas 24 h pri teplote 4 °C. Antigén sme zahustili pomocou polyetylén glykolu (M.v. 10 000, Fluka), prefiltrovali cez membránový filter (Millipore) s veľkosťou pórov 0,2 µm a uchovávali pri teplote  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Somatický extrakt *T. spiralis* (TE) sme pripravili dezintegráciou 1 ml sedimentu svalových lariev, resuspendovaním v 9 ml fyziologického roztoku, pomocou prístroja Ultrasonic Dismembrator 300 W (Dynatech) a následnou extrakciou masy v 20 ml 0,1 M karbonátového tlmivého roztoku pH 9,6 pri teplote 4 °C po dobu 48 hodín. Po jedenhodinovej centrifugácii pri 45 000 g sme supernatant uchovávali pri teplote  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Frakciu somatického extraktu (TF) sme získali gélovou filtráciou cez Sephadex G-200 (TSK-Gel TOYOPEARL HW-55) v sklenenej kolóne (3,4 x 100 cm, obsah náplne 900 cm<sup>3</sup>). 10 ml antigénu TE s koncentraciou 50 mg bielkovín/ml sme naniesli na gél a eluovali 0,01 M sodnofosfátovým tlmivým fyziologickým roztokom pH 7,2 s prietokom 0,50 ml/min. Prietok sme zabezpečovali samospádom (systémom Mariotovych fliaš). Na detekciu sme použili prietokový UV detektor (UVICORD S-LKB) a zberač frakcií (REDIAC-LKB). Molekulovú hmotnosť sme stanovili pomocou gélovo-filtrácie kalibračnej sady (Pharmacia) so štandardami: ribonukleáza A (13,7 kDa), chymotripsinogén A (25 kDa), ovalbumín (43 kDa), boviný sérumalbumín (67 kDa). Získali sme dva píky v rámci kalibračného rozsahu a jeden pík nad kalibračným rozsahom. Frakcia použitá v ELISA metóde obsahovala podjednotky s molekulovou hmotnosťou 37, 43 a 55 kDa. Obsah bielkovín vo všetkých antigénoch sme stanovili podľa metódy autorov Lowry a i. (1951).

### ELISA metóda

Antigény obsahujúce 5 µg bielkovín v 1 ml, pripravené v 0,1 M karbonátovom tlmivom roztoku pH 9,6, sme naviazali na mikrotitračné platničky (Nunc, Immuno Plate) v objeme 100 µl na jamku pri teplote 4 °C cez noc, alebo pri teplote 37 °C počas jednej hodiny. Po trojnásobnom premytí 0,15 M fosfátovým tlmivým roztokom pH 7,2, s obsahom 0,5% Tween 20 (PBS-T), sme postupne pridávali vzorky sér, konjugát a substrát (100 µl na jamku). Vždy sme ich inkubovali 30 min pri

teploty 37 °C a tri razy premyli PBS-T. V PBS-T sme riedili séra ošipáných v pomere 1 : 100 a králičí anti-prasačí IgG konjugovaný s chrenovou peroxidázou (SIGMA, Bio Sciences, USA) 1 : 5 000. Na vizualizáciu reakcie sme používali ako chromogén o-fenylendiamín v 0,05 M citrátovom tlmivom roztoku pH 4,7 s obsahom 0,005 % peroxidu vodíka. Po 15 min sme reakciu zastavili so 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a merali sme absorbcanciu pri 492 nm. Uvedenú optimálnu koncentráciu antigénu sme stanovili boxovou titráciou, vplyv času a teploty na väzbu antigénu sme stanovili na základe predpokusov.

#### Kalkulácia a vyhodnotenie testu

Absorbancia (optical density) každej vzorky

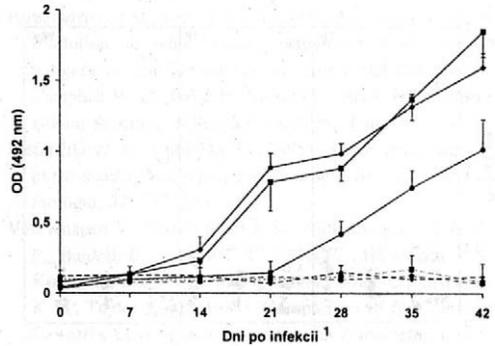
$$OD = OD_{\text{vzorky}} - OD_{\text{blank}}$$

Za hraničnú hodnotu v ELISA metóde sme považovali štvornásobok priemerných hodnôt OD poolovaných negatívnych kontrolných sér. Hodnoty OD vyššie od hraničných hodnôt boli pozitívne a nižšie boli negatívne.

#### VÝSLEDKY

V tab. I uvádzame výsledky vyšetrenia svalových vzoriek ošipáných tráviacou metódou na prítomnosť lariev *T. spiralis*. Najviac lariev, až 68,0 ± 11,5 na 1 g svaloviny, sme nachádzali vo svaloch bránice, menej v žuvacích svaloch a vo svaloch jazyka. Najmenej lariev bolo v dlhom lýtkovom svale a chrbtových svaloch. Výsledky vyšetrenia vzoriek svalov všetkých kontrolných zvierat boli negatívne.

Dynamika antitrichinelových protilátok po experimentálnej trichinelóze ošipáných s použitím TES, TE a TF antigénov *T. spiralis* v ELISA metóde je znázornená na obr. 1. Z výsledkov vyplýva, že pri použití somatického extraktu (TE) a frakcie somatického extraktu (TF) bola OD vyššia v porovnaní s larválnym exkrecečno-sekrecečným antigénom (TES). Kým s TES an-



1. Dynamika antitrichinelových IgG protilátok pri experimentálnej trichinelóze ošipáných – Dynamics of anti-*Trichinella* IgG antibodies in experimental trichinellosis of pigs

- ◆ detekcia pomocou somatického extraktu TE – anti-*Trichinella* antibodies detected with extract TE
- detekcia pomocou frakcie somatického extraktu TF – anti-*Trichinella* antibodies detected with fraction from extract TF
- detekcia pomocou exkrecečno-sekrecečného antigénu TES – anti-*Trichinella* antibodies detected with excretory-secretory antigen TES
- ◆- - kontrolné negatívne séra vyšetované so somatickým extraktom TE – negative control tested with extract TE
- - kontrolné negatívne séra vyšetované s frakciou somatického extraktu TF – negative control tested with fraction TF
- - kontrolné negatívne séra vyšetované s exkrecečno-sekrecečným antigénom TES – negative control tested with excretory-secretory antigen TES

<sup>1</sup>days after infection

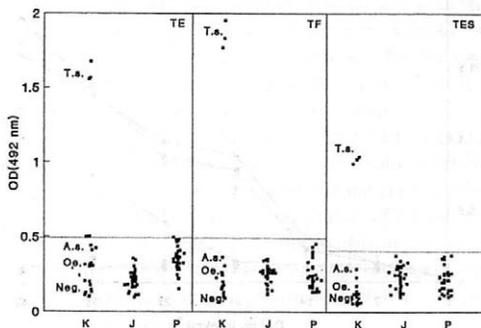
tižným sme zaznamenali prítomnosť protilátok až na 28. deň p.i., s TE a TF antigénmi už na 21. deň p.i.

Výsledky ELISA metódy u trichinelózných aj kontrolných ošipáných sú graficky znázornené na obr. 2 a ich štatisticky vyhodnotené priemerné hodnoty sú uvádzané v tab. II. Senzitivita a špecificita testu s overovanými antigénmi bola vysoká. U infikovaných ošipáných *T. spiralis* sme s TES, TE a TF antigénmi zaznamenali vysoké hladiny špecifických protilátok u všetkých testovaných sér. U kontrolných jatočných ošipáných sme nevykazovali špecifické antitrichinelové protilátky ani s jedným z overovaných antigénov. Kým pri plemených ošipáných sme s TE antigénom v troch prípadoch zaznamenali hranične pozitívne hodnoty absorbcancie, s TF a TES antigénmi sme antitrichinelové protilátky nedetegovali. U 10 kontrolných sér s heterológnu infekciou (*A. suum*, *Oesophagostomum* spp.) sme vo vzťahu k trichinelóze s TF a TES antigénmi nezaznamenali špecifické protilátky, vykazovali sme 100% špecificitu. S TE antigénom sme však zaznamenali hraničné hodnoty pozitivity s dvomi sérami ošipáných prirodzene infikovaných *A. suum*, v tomto prípade sme vykazovali iba 80% špecificitu.

I. Priemerný počet lariev v 1 g poolovaných vzoriek svaloviny z ošipáných infikovaných 600 larvami *T. spiralis* – Mean larval count in 1 g of pooled muscle sample from pigs infected with 600 *T. spiralis* larvae

Svalové skupiny <sup>1</sup>	Počet lariev/g <sup>2</sup>
<i>M. masseter</i>	47,7 ± 7,6
Svaly bránice <sup>3</sup>	68,0 ± 11,5
Svaly jazyka <sup>4</sup>	40,8 ± 5,8
<i>M. longissimus dorsi</i>	16,3 ± 1,8
<i>M. deltoides</i>	33,8 ± 6,2
<i>M. intercostales</i>	18,9 ± 2,6
<i>M. extensor capri radialis</i>	20,0 ± 6,2
<i>M. biceps femori</i>	27,9 ± 0,9
<i>M. fibularis longis</i>	15,1 ± 3,4

<sup>1</sup>muscle groups, <sup>2</sup>larval count/g, <sup>3</sup>diaphragm, <sup>4</sup>tongue



2. Porovnanie antigénov lariev *T. spiralis* (TE, TF a TES) pre detekciu špecifických IgG protilátok u ošípaných – Comparison of *T. spiralis* larva antigen for the detection of specific IgG antibodies in pigs

K – kontrolné séra: negatívne (Neg.), experimentálna trichinelóza (T.s.), askarióza (A.s.) a oesophagostomóza (Oe.) – control sera: negative (Neg.), experimental trichinellosis (T.s.), ascariosis (A.s.) and oesophagostomosis (Oe.)

J = séra jatočných ošípaných – sera of slaughter pigs

P = séra plemenných ošípaných – sera of breeding pigs

## DISKUSIA

Priame aj nepriame vyšetrenie ošípaných na trichinelózu je limitované. Skôr používanú kompresnú metódu vyšetrenia, s citlivosťou tri larvy na 1 g svaloviny, nahradilo skupinové vyšetrenie vzoriek tráviacou metódou, s citlivosťou jedna larva na 1 g svaloviny. Táto metóda je požadovaná aj pri vývoze bravčového mäsa do niektorých krajín Európskej únie. Odporúčania OIE uvádzajú aj použitie sérologickej imunoenzymatickej metódy na zistenie trichinelózy u jatočných zvierat odporazených na bitúnku, ale aj u živých zvierat. Tráviaca metóda v porovnaní so sérologickým testom má nižšiu senzitivitu. Gamble (1995) doporučuje ako najspofahlivejšiu tráviacu metódu z 5 g zmesnej vzorky svaloviny, ktorá detekuje každú infekciu väčšiu ako jedna larva na gram vzorky. Podľa tohto autora, imunitná odozva u ošípaných s nálezom viac ako 10 a menej ako jedna larva na gram je takmer rovnaká. Nevýhodou sérologického testu je neskoršie zistenie pozitivity o dobu

do začiatku vytvorenia detekovateľnej hladiny špecifických protilátok. Zvieratá infikované vyššími infekčnými dávkami lariev sú séropozitívne na 21. až 28. deň p.i., avšak séropozitívna pri nízkych infekčných dávkach nie je detegovateľná pred 49. dňom p.i. (Gamble, 1995; Gamble a i., 1988, 1989; Van Knapen a i., 1981, 1984). Pri živých zvieratách nie je možné sérologicky detegovať trichinelózu skôr ako 21 dní p.i. V tomto období získame falošne negatívne výsledky. Výskyt falošne pozitívnych výsledkov je veľmi zriedkavý. Oliver a i. (1989) udávajú menej ako 0,3 % takýchto výsledkov.

V našej práci sme nedetegovali špecifické antitrichinelové protilátky s TF a TES antigénmi vo vzťahu k iným parazitózam, vykazovali sme 100% špecificitu. S TE antigénom sme však zistili krížové reakcie pri infekcii *A. suum* v dvoch prípadoch. Domnievame sa, že pri plemenných ošípaných detegované hraničné hladiny antitrichinelových protilátok svedčia o možnom skoršom kontakte zvierat s inou helmintózou a potvrdzujú poznatok, že ELISA metóda s TE antigénom má iba 80% špecificitu. TE a TF antigény sú v porovnaní s TES antigénom citlivejšie, pretože sme pomocou nich detegovali špecifické protilátky o sedem dní skôr. Čas potrebný pre sérokonverziu je v súlade s údajmi iných autorov (Gamble, 1995). Pérez-Martín a i. (1993) podobne zaznamenali prvé špecifické protilátky od 21. až 28. dňa p.i., ktoré pretrvávali v závislosti od infekčnej dávky do 250. až 420. dňa p.i. Podobné výsledky zistili s TE a TES antigénmi, pričom pri masívnej infekcii bol TE antigén citlivejší ako TES.

Detekcia cirkulujúcich trichinelových antigénov sa neosvedčila pre jej nízku citlivosť. Arriaga a i. (1989) s dvojitou sendvičovou ELISA metódou zistili cirkulujúce povrchové stichosomové antigény iba u 54 % experimentálne infikovaných ošípaných.

Môžeme konštatovať, že s TF a TES antigénmi sme dosiahli 100% špecificitu. Vzhľadom na to, že TF bola citlivejšia oproti TES antigénu, o sedem dní skôr sme detegovali séropozitívitu, odporúčame ju použiť v ELISA metóde na diagnostiku trichinelózy. Takáto metóda je vhodná na diagnostikovanie trichinelózy živých zvierat. Je tiež vhodná pre intravitálny monitoring trichinelózy vo veľkochovoch ošípaných, pri ich deklarovaní za chovy bez trichinelózy a pri exporte plemenných zvierat pre veterinárne osvedčenie o ich negativite.

II. Priemerné hodnoty absorbancie u kontrolných ošípaných vyšetrených s TE, TF a TES antigénmi – Mean values of OD in control pigs detected with TE, TF and TES antigens

Infikované a negatívne ošípané <sup>1</sup>	Počet vyšetrených <sup>2</sup>	OD (TE)Mean ± S.D.	OD (TF)Mean ± S.D.	OD (TES)Mean ± S.D.
<i>Trichinella spiralis</i>	3	1,596 ± 0,06	1,850 ± 0,09	1,007 ± 0,03
<i>Ascaris suum</i>	5	0,161 ± 0,04	0,268 ± 0,07	0,168 ± 0,06
<i>Oesophagostomum</i> spp.	5	0,261 ± 0,04	0,167 ± 0,04	0,161 ± 0,04
Negatívne <sup>3</sup>	5	0,116 ± 0,06	0,088 ± 0,04	0,082 ± 0,02
Jatočné <sup>4</sup>	30	0,209 ± 0,06	0,215 ± 0,05	0,216 ± 0,07
Plemenné <sup>5</sup>	35	0,351 ± 0,07	0,249 ± 0,09	0,239 ± 0,06

<sup>1</sup>infected and negative pigs, <sup>2</sup>number of examined animals, <sup>3</sup>negative, <sup>4</sup>slaughter pigs, <sup>5</sup>breeding pigs

## LITERATÚRA

- Arriaga C., Muniz E., Morilla A., Ortega-Pierres G. (1989): *Trichinella spiralis*: Recognition of muscle larva antigens during experimental infection of swine and its potential use in diagnosis. *Exp. Parasitol.*, **69**, 363–372.
- Dubinský P. (1995): Legislativa a tlmenie trichinelózy. *Slov. Vet. Cas.*, **20**, 200–202.
- Gamble H. R. (1995): Detection of trichinellosis in pigs by artificial digestion and enzyme immunoassay. *J. Food Protect.*, **59**, 295–298.
- Gamble H. R., Rapic A. M., Murrell K. D. (1988): Evaluation of excretory-secretory antigens for the sero-diagnosis of swine trichinellosis. *Vet. Parasitol.*, **30**, 131–137.
- Gamble H. R., Rapic A. M., Murrell K. D. (1989): Factors influencing the efficacy of excretory-secretory antigens in the sero-diagnosis of swine trichinellosis. In: Tanner C. W. (ed.): *Trichinellosis*. Madrid, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas Press, 202–209.
- Lowry D. H., Rosebrough N. S., Farr A. L., Randall R. G. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
- Oliver D. G., Singh P., Allison D. E., Murrell K. D., Gamble H. R. (1989): Field evaluation of an enzyme immunoassay for detection of hogs in a high volume North Carolina abattoir. In: Tanner C. W. (ed.): *Trichinellosis*. Madrid, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas Press, 439–444.
- Pérez-Martín J. E., Serrano F., Reina D., Navarrete I. (1993): Evolution of swine humoral response to CWE and ES antigens in light *Trichinella* infection by ELISA test. In: Campbell W. C., Pozio E., Bruschi F. (eds.): *Trichinellosis*. Istituto Superiore di Sanità Press Rome, Italy, 359–364.
- Štefančíková A., Dubinský P. (1995): Status and prognosis of the incidence of helminthic zoonose in Slovakia. *Helminthologia*, **32**, 247–250.
- Van Knapen F., Franchimont J. H., Ruitenbergh E. J., Andre P., Baldelli B., Gibson T. E., Gottal C., Henriksen S. A., Kohler G., Roneus O., Skovgaard N., Soule C., Strickland K. L., Taylor S. M. (1981): Comparison of four methods for early detection of experimental *Trichinella spiralis* infection in pigs. *Vet. Parasitol.*, **9**, 117–123.
- Van Knapen F., Franchimont J. H., Ruitenbergh E. J., Andre P., Baldelli B., Gibson T. E., Gottal C., Henriksen S. A., Kohler G., Roneus O., Skovgaard N., Soule C., Strickland K. L., Taylor S. M., Thompson D. U., Wolfe F. (1984): Comparison of three methods for the detection of prolonged experimental trichinellosis in pigs. *Vet. Parasitol.*, **16**, 167–171.
- Velebný S., Tomašovičová O., Stpiczynská R. (1992): Pharmacokinetics of <sup>3</sup>H-cambendazole in mice in the course of experimental trichinellosis. *Helminthologia*, **29**, 207–210.

Received: 98-01-21

Accepted after corrections: 98-10-07

---

### Kontaktná adresa:

Ing. Katarína Reiterová, CSc., Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovenská republika  
Tel. +421 95 633 44 55, fax +421 95 633 14 14

---

## INFORMACE PRO AUTORY ČASOPISU VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Kromě stručných pokynů na 3. straně obálky jsou pokyny pro autory v plném rozsahu na web stránce

<http://www.clark.cz/vri/Pokyny.htm> nebo je možno si jejich výtisk vyžádat v redakci.

Autory prosíme o dodržování pokynů a o pozornost následujícím požadavkům.

Rukopis nesmí být vytištěn příliš malými fonty, s hustým řádkováním nebo s úzkými okraji. Je třeba používat fonty Arial 11 nebo obdobné velikosti a okraje nejméně 2,5 cm na všech stranách.

Je třeba zvýšit počet prací uveřejňovaných v angličtině. Tyto práce budou proto přednostně lektorovány a zařazovány. Anglické texty musí dodat autoři, kteří odpovídají za jejich jazykovou a odbornou správnost. Redakce velmi doporučuje, aby překlad byl zkontrolován odborníkem, jehož mateřským jazykem je angličtina. Autorům se doporučuje, aby požádali o tuto pomoc svoje zahraniční kolegy a k zaslání souborů využívali elektronickou poštu.

Rukopis je třeba předkládat nejen jako soubor na disketě, ale ve třech úplných výtiscích s číslovými stranami (velmi se doporučuje i číslování řádků a uvádění data vytištění pod označením strany nebo v záhlaví pod zkráceným názvem práce a jmény autorů), se všemi přílohami a s průvodním dopisem, ve kterém všichni autoři podepíší prohlášení, že

- jsou s rukopisem seznámeni,
- souhlasí s jeho uveřejněním v časopisu Veterinární medicína za předpokladu úspěšného lektorského řízení,
- uváděné výsledky nebyly dosud uveřejněny ani zaslány jinému časopisu nebo že jsou předcházející vlastní a již uveřejněné výsledky v práci citovány,
- práce je uveřejňována se souhlasem ředitelů pracovišť po impri-málním řízení, které je na pracovištích prováděno. Doporučuje se uvést
- jméno překladatele a jméno a pracoviště pracovníka, který předkládal kontroloval,
- návrh na lektory (u prací předkládaných v angličtině i ze zahraničí),
- zda práce byla již lektorována po předložení jinému časopisu, který jí nemohl uveřejnit, a přiložit připomínky lektorů s komentářem autorů.

V každé experimentální práci musí uvedeno proč byla provedena (jaká byla pracovní hypotéza), jak byla provedena (metodika musí být jednoznačně popsána) a jaké výsledky byly dosaženy. Každá část v kapitole Výsledky musí mít odpovídající popis použitého postupu v části Metoda. V samostatné části Diskuse musí autoři uvést, co z dosažených výsledků vyplývá a svoje vlastní výsledky musí konfrontovat s výsledky již uveřejněnými nebo uvést, v čem jsou dosažené výsledky zcela nové.

Autory práce mohou být pouze pracovníci, kteří se na získání výsledků podíleli tvůrčím způsobem, přispěli nejen k jejich získání, ale i k jejich interpretaci a jsou schopni diskutovat o celé práci, nikoliv jen o svém velmi úzkém metodickém podílu. Metodickou a technickou pomoc, rutinní vyšetřování, poskytnutí materiálu nebo umožnění použití přístrojů, připomínky k projektu nebo přečtenému rukopisu, provedení překladu nebo jazykovou revizi překladu mohou autoři ocenit poděkováním na konci práce. Finanční zdroje (např. údaje o grantové agentuře, která řešení podpořila a o číslu grantu) se uvádějí pod čarou na první straně příspěvku.

Abstrakt a jeho anglická verze jsou rozhodující pro zařazení citace práce do bibliografických databází. Musí uvádět dosažené výsledky a princip metodického postupu, nikoliv podrobný popis metod a diskusí výsledků.

Tabulky, grafy, obrázky a fotografie musí být na samostatných a řádně číslováných listech, legenda k nim musí být rovněž zvlášť na samostatném listu nebo listech. Trojrozměrné grafy jsou většinou

méně přehledné a zbytečné. Grafickému zpracování výsledků je nutno věnovat velkou pozornost.

Grafy nemohou být tištěny barevně, proto nemohou být předkládány jako součást rukopisu. Časopis Veterinární medicína však může mít barevnou přílohu, pokud si její vytištění zajistí pracoviště autorů. Podrobnější informace poskytnete redakce.

Citacím musí být věnována nejvyšší pozornost. Jména autorů v textu (uvádějí se stejným typem písma jako jiný text, nikoliv proložené nebo velkými písmeny) musí být uvedena správně a stejně jako v seznamu literatury. Nepřesnosti ve jménech autorů vedou k nedostupnosti citací v bibliografických databázích a vyvolávají nedůvěru v autory. Rok vydání, který se uvádí za jmény citovaných autorů, musí souhlasit s údaji v seznamu literatury a citace samozřejmě nesmí v seznamu chybět stejně, jako v seznamu nemohou být citace, nepoužité v textu.

Nelze citovat práce, které nebyly uveřejněny v časopisech (např. výzkumné zprávy, abstrakty referátů přednesených na konferencích, i když vyšly ve sborníku, citace metod v českých nebo slovenských příručkách a učebních textech apod.). Podle zdrojů použitých informací jsou práce a celý časopis hodnoceny.

V seznamu citací se práce řadí podle anglické abecedy (Ch pod C), práce ze stejného roku se odlišují písmeny (1998a, 1998b). Citace musí uvádět jména všech autorů. Názvy citovaných prací musí být uváděny v angličtině. Jazyk, ve kterém byla práce uveřejněna, se uvádí v závorce za názvem práce (např. in Slovak)

Autoři mohou velmi přispět k zvýšení impakt faktorů časopisu i k citovanosti svých publikací zasláním separátů svých prací citovaným autorům a všem pracovníkům, kteří se zabývají stejnou problematikou. Pokud je jejich práce dobrá, bývá často citována, ačkoliv by oslovený pracovník o její separát nepožádal nebo by citace v bibliografických databázích mohla ujít jeho pozornosti.

Redakce vítá dobře zpracované přehledné články, které přispívají k propagaci profilovaných pracovních týmů a jednotlivých pracovníků, rozšiřují možnosti postgraduálního studia a získání kriticky komentovaných a přehledně zpracovaných informací. Přehledy, uveřejňované i v češtině, vyvolávají velký zájem i v zahraničí, protože na většině pracovišť není dostupné zajištění překladu alespoň některých částí. Předpokladem je výstižný název a velmi podrobné rozdělení přehledu na číslované kapitoly a podkapitoly a anglická verze obsahu (názvů kapitol a podkapitol).

## POKYNY PRO ÚPRAVU RUKOPISŮ V LEKTORSKÉM ŘÍZENÍ

Lektori věnují prostudování předložených rukopisů mnoho času. Přesto se mohou mýlit a požadovat úpravy, které nepřispějí ke zlepšení práce. Od autorů se proto požaduje nejen provedení oprav, ale písemné vyjádření ke všem připomínkám lektorů s konkrétními údaji, jak byl rukopis upraven (usnadní to orientaci lektora při posuzování upravené verze rukopisu). Případně proč autoři s názorem lektora nesouhlasí. Odmítnutá práce (vrácená s dopisem, ve kterém je uvedeno, že po uskutečněním lektorském řízení bylo rozhodnuto práci nepřijmout k uveřejnění) nemůže být předmětem dalšího lektorského řízení.

Pokud rukopis nebude autory upraven podle požadavků lektorů a vrácen redakci do jednoho měsíce, bude vyřazen z evidence a může být přijat pouze jako nová práce. V odůvodněných případech (rozsáhlé úpravy, doplnění pokusů, dlouhodobá nepřítomnost na pracovišti) musí autoři písemně nebo elektronickou poštou požádat o prodloužení termínu předložení upraveného rukopisu.

Upravený rukopis musí být označen jako nová verze (nejlépe UPRAVENO datum v záhlaví každé strany). Původní verze musí být redakci vrácena, případné poznámky lektorů nesmí být vymazány.

Karel Hruška

# THE PASSAGE OF AMINO ACIDS THROUGH THE RUMEN EPITHELIUM IN LAMB AND ADULT SHEEP *IN VITRO*

## PRESTUP AMINOKYSELÍN CEZ BACHOROVÝ EPITEL JAHNIAT A DOSPELÝCH OVIEC *IN VITRO*

Z. Faixová<sup>1</sup>, Š. Faix<sup>2</sup>, J. Várady<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

<sup>2</sup>Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic

**ABSTRACT:** Passage of six amino acids through the rumen epithelium of lamb and adult sheep was studied in the mucoso-serous direction *in vitro*. Amino acids were classified into two groups: 1st group: glutamic acid – lysine – arginine; 2nd group: glycine – alanine – leucine. Three concentrations of amino acids were used: 30 000; 3 000 and 300  $\mu\text{mol/l}$ . Comparison of amino acid concentrations of 1st group on the mucous side of rumen at 300  $\mu\text{mol/l}$  concentration after 60 minute incubation was found significantly lower concentration in glutamic acid at lamb than at adult sheep. Concentration of arginine was significantly lower in lamb at all three used concentrations on the serous side of rumen. Concentration of glutamic acid was significantly lower at lamb against adult sheep at 30 000 and 3 000  $\mu\text{mol/l}$  concentration and non measurable at 300  $\mu\text{mol/l}$  concentration on the serous side of the rumen. Comparison of amino acid concentrations of the 2nd group on the mucous side of the rumen after 60-minute incubation was found at 3 000 and 300  $\mu\text{mol/l}$  concentration significantly lower concentration of leucine in lamb than in adult sheep. Concentrations of glycine, alanine and leucine were significantly higher at 30 000 and 3 000  $\mu\text{mol/l}$  concentrations in lamb than in adult sheep on the serous side of rumen. Higher concentration of leucine was found at 300  $\mu\text{mol/l}$  concentration in lamb than in adult sheep. Results of experiments showed that there are differences in passage of amino acids through the rumen in lamb on milk diet when the rumen is not fully morphologically and functionally developed against adult sheep.

ruminants; sheep; rumen; amino acids

**ABSTRAKT:** Sledovali sme prestup šiestich aminokyselín usporiadaných do dvoch trojíc: 1. kyselina glutámová (Glu) – lyzín (Lys) – argínín (Arg); 2. glycín (Gly) – alanín (Ala) – leucín (Leu) cez bachorový epitel jahniat na mliečnej výžive a dospelých oviec v mukóznoseróznom smere *in vitro*. Koncentrácia každej sledovanej aminokyseliny bola 30 000, 3 000 a 300  $\mu\text{mol/l}$ . Porovnávaním koncentrácií trojice aminokyselín Glu, Lys, Arg na mukóznej strane bachora po 60minútovej inkubácii sme zistili, že iba pri 300  $\mu\text{mol/l}$  koncentrácii bola signifikantne nižšia koncentrácia Glu u jahniat ako u dospelých oviec. Na seróznej strane bola koncentrácia Arg signifikantne nižšia u jahniat pri všetkých troch koncentráciách. Koncentrácia Glu bola signifikantne nižšia u jahniat oproti dospelým ovciam pri 30 000 a 3 000  $\mu\text{mol/l}$  a nemerateľná pri 300  $\mu\text{mol/l}$  na seróznej strane bachora. Porovnávaním koncentrácií trojice aminokyselín Gly, Ala, Leu na mukóznej strane bachora sme zistili signifikantný rozdiel iba pri Leu, ktorý mal nižšie hodnoty u jahniat ako u dospelých oviec pri 3 000 a 300  $\mu\text{mol/l}$  koncentráciách. Na seróznej strane boli koncentrácie Gly, Ala a Leu signifikantne vyššie u jahniat oproti dospelým ovciam pri 30 000 a 3 000  $\mu\text{mol/l}$  koncentráciách. Pri 300  $\mu\text{mol/l}$  koncentrácii boli namerané vyššie hodnoty u jahniat len pri Leu. Výsledky pokusov ukázali, že existujú rozdiely v prestupe aminokyselín cez bachor u jahniat na mliečnej výžive, kedy bachor nie je plne morfológicky a funkčne vyvinutý, a u dospelých oviec.

prežúvavce; ovca; bachor; aminokyseliny

### ÚVOD

Bachorová stena prežúvavcov zohráva významnú úlohu pri výmenných procesoch dusíkatých látok medzi bachorovým obsahom a krvou (Várady, 1985). Podľa Hoover a Millera (1991) množstvo absorbovaných aminokyselín nepresahuje viac ako 10 % z celkového dusíka absorbovaného z bachora. Pokusy autorov Faixová a Várady (1997) ukázali, že epitel dorzálného

a ventrálneho bachorového vaku je schopný zadržiavať aminokyseliny.

U mláďat prežúvavcov na mliečnej výžive je mlieko pasážované reflexom pažerákového žľazu priamo do slezu, ktorý je funkčne podobný žalúdku zvierat s jednoduchým žalúdkom. Počas tohto obdobia výživy sú ostatné časti predžalúdkov (bachor, čepiec a kniha) nefunkčné. U jahniat rast bachora je dosť výrazný medzi 7. až 30. dňom veku a dosahuje relatívnu veľkosť do-

spelého zvieratá vo veku asi osem týždňov (Church, 1972). Hlavným stimulatorom, ktorý podporuje vývin predžalúdkov mláďat prežúvavcov, je fyzikálny a biologický účinok suchého krmiva na bachorovú stenu, najmä unikavé mastné kyseliny a zrejme aj amoniak (Kurilov a Krotkova, 1971). V tomto období sa zväčšuje plocha epitelu zvýšením počtu a veľkosti papil (klkov) a zväčšuje sa hrúbka tkanivovej vrstvy epitelu. Toto obdobie je charakteristické vysokou intenzitou biosyntetických procesov v bachorovej stene, ktoré vyžadujú energiu a dostatok prekursorov pre biosyntézu.

Cieľom práce bolo zistiť, ako vplýva morfológický a funkčný stav bachora oviec na prestup aminokyselín cez bachorový epitel.

## MATERIÁL A METÓDY

V pokuse sme použili dve skupiny oviec plemena slovenské merino. Prvá skupina dvanástich jahniat vo veku päť až šesť týždňov bola kŕmená tri razy denne z fľaše sušeným plnotučným mliekom a senom *ad libitum*. Druhá skupina dvanástich dospelých oviec s hmotnosťou 30 až 40 kg bola kŕmená dva razy denne. Diетické zloženie kŕmnej dávky: sušina 1 177,6 g, stráviteľné dusíkaté látky 89,06 g a škrobová jednotka 0,553. Zvieratá mali voľný prístup k vode.

Po smrtení zvierat *in vivo* podaním pentobarbitalu sme z brušnej dutiny vybrali bachor a odstránili bachorový obsah. Prázdny bachor sme premyli studenou vodou a vložili do nádoby s Thyrodeho roztokom. Z bachora sme oddelili dorzálny bachorový vak a odstránili z neho svalovú vrstvu a na vlastný pokus sme použili bachorový epitel s podslizničným väzivom. Bachorové sliznice boli fixované hodváhom na dno valca z PVC (priemer 45 mm), pričom mukózna strana sliznice smerovala dovnútra valca. Do valcov sme naliali 50 ml roztoku jednotlivých aminokyselín. Valce boli ponorené do sklenených kadničiek, ktoré obsahovali Thyrodeho roztok bez aminokyselín. Sklenené kadničky boli umiestnené v prietokovom vodnom kúpeli, ktorý udržiaval konštantnú teplotu 39 °C. Roztoky vo valcoch a kadničkách boli počas inkubácie premiešavané elektrickými miešadlami. Prestup aminokyselín z mukózne na seróznú stranu bachorovej sliznice bol meraný po 60 minútach inkubácie.

V pokuse sme použili šesť aminokyselín usporiadaných do trojíc:

glycín – alanín – leucín; kyselina glutámová – lyzín – arginín v troch rôznych koncentráciách: 30 000, 3 000 a 300  $\mu\text{mol/l}$ , pričom každá aminokyselina mala uvedenú koncentráciu. Koncentrácia aminokyselín na mukózne a serózne strane bola meraná na automatickom analyzátore aminokyselín AAT 339.

Použitie chemikálie: aminokyseliny (L-alanín, L-glycín, L-leucín, L-kyselina glutámová, L-lyzín, HCl, L-arginín), Serva; ostatné chemikálie – Lachema, Brno, ČR.

Z každej ovce ( $n = 12$ ) sme robili merania na troch preparátoch bachorového epitelu. Ich priemerná hodno-

ta bola použitá na štatistické výpočty. Výsledky sú vyhodnotené ako aritmetický priemer  $\pm$  SEM. Štatistická významnosť bola stanovená nepárovým Studentovým *t*-testom.

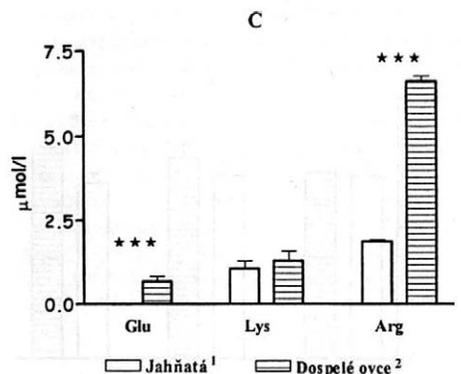
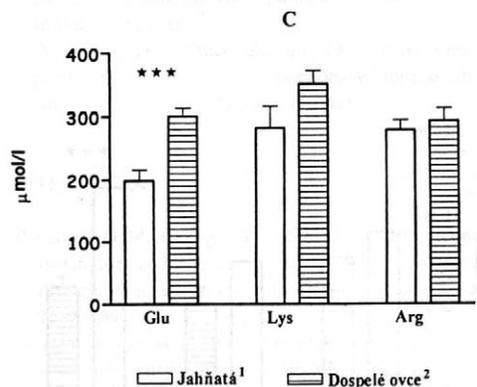
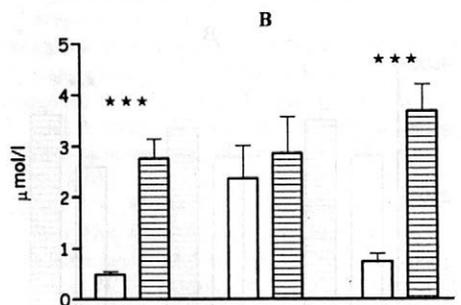
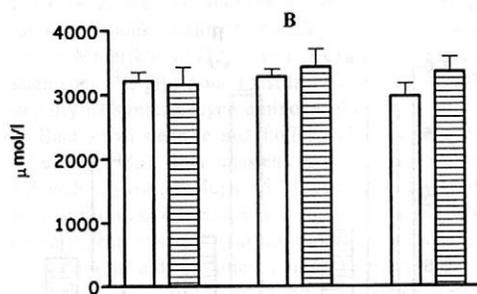
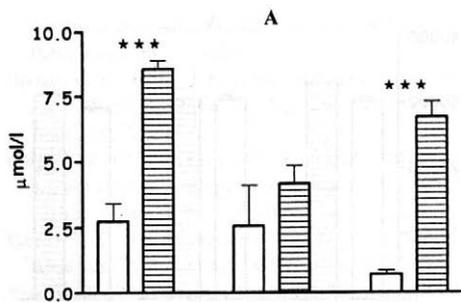
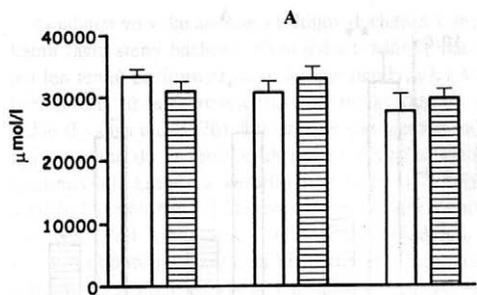
## VÝSLEDKY

Porovnaním koncentrácií trojice aminokyselín Glu, Lys a Arg na mukózne strane bachora (obr. 1) sme zistili signifikantne nižšiu koncentráciu len pri Glu u jahniat oproti dospelým ovciam pri 300  $\mu\text{mol/l}$  ( $198,8 \pm 17,6$  oproti  $300 \pm 13$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $P < 0,001$ ). Pri ostatných východiskových koncentráciách neboli zistené rozdiely pre žiadnu z troch sledovaných aminokyselín.

Na serózne strane bachora sme zistili rozdiely u Glu a Arg pri všetkých troch východiskových koncentráciách a koncentrácie lyzínu sa štatisticky neodlišovali (obr. 2). Koncentrácia Glu bola vždy nižšia u jahniat oproti dospelým ovciam: pri koncentracii 30 000  $\mu\text{mol/l}$   $2,74 \pm 0,68$  a  $8,56 \pm 0,34$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $P < 0,001$ ; pri 3 000  $\mu\text{mol/l}$   $0,48 \pm 0,07$  a  $2,75 \pm 0,4$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $P < 0,001$ . Pri koncentracii 300  $\mu\text{mol/l}$  sme zistili prestup iba u dospelých oviec  $0,66 \pm 0,16$   $\mu\text{mol/l}$  a u jahniat bolo na serózne strane nedetekovateľné množstvo. U Arg boli namerané nižšie hodnoty u jahniat ako u dospelých oviec: pri koncentracii 30 000  $\mu\text{mol/l}$   $0,7 \pm 0,18$  a  $6,66 \pm 0,62$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $P < 0,001$ ; pri koncentracii 3 000  $\mu\text{mol/l}$   $0,74 \pm 0,16$  a  $3,68 \pm 0,52$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $P < 0,001$ ; pri 300  $\mu\text{mol/l}$  koncentracii  $1,86 \pm 0,06$  a  $6,6 \pm 0,16$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $P < 0,001$ .

Porovnaním koncentrácií trojice aminokyselín Gly, Ala a Leu na mukózne strane bachora (obr. 3) sme zistili signifikantne nižšiu koncentráciu len u Leu u jahniat oproti dospelým ovciam pri koncentracii 3 000  $\mu\text{mol/l}$  ( $2468 \pm 146$  oproti  $3252 \pm 64$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $P < 0,001$ ) a pri 300  $\mu\text{mol/l}$  ( $268 \pm 16$  oproti  $322 \pm 10$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $P < 0,05$ ). Pri ostatných východiskových koncentráciách neboli zistené rozdiely pre žiadnu z troch sledovaných aminokyselín.

Na serózne strane bachora sme zistili rozdiely u Gly, Ala a Leu pri východiskových koncentráciách 30 000 a 3 000  $\mu\text{mol/l}$  a pri koncentracii 300  $\mu\text{mol/l}$  bol rozdiel iba u Leu (obr. 4). Koncentrácia Gly bola signifikantne vyššia u jahniat oproti dospelým ovciam: pri koncentracii 30 000  $\mu\text{mol/l}$   $8,46 \pm 1,18$  a  $3,26 \pm 0,48$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $P < 0,01$ ; pri koncentracii 3 000  $\mu\text{mol/l}$   $1,72 \pm 0,22$  a  $0,78 \pm 0,1$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $P < 0,01$ . U Ala boli tiež namerané vyššie hodnoty u jahniat ako u dospelých oviec: pri koncentracii 30 000  $\mu\text{mol/l}$   $6,54 \pm 1,04$  a  $2,50 \pm 0,38$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $P < 0,05$ ; pri koncentracii 3 000  $\mu\text{mol/l}$   $1,8 \pm 0,04$  a  $0,74 \pm 0,18$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $P < 0,01$ . U Leu boli vyššie namerané hodnoty u jahniat oproti dospelým ovciam pri všetkých troch východiskových koncentráciách: pri koncentracii 30 000  $\mu\text{mol/l}$   $6,42 \pm 0,68$  a  $2,34 \pm 0,36$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $P < 0,05$ ; pri koncentracii 3 000  $\mu\text{mol/l}$   $1,32 \pm 0,42$  a  $0,58 \pm 0,2$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $P < 0,05$  a pri koncentracii 300  $\mu\text{mol/l}$   $1,18 \pm 0,06$  a  $0,62 \pm 0,06$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $P < 0,001$ .



1. Koncentrácia aminokyselín na mukózne strane bachora u jahniat a u dospelých ovčíc po inkubácii. Pôvodná koncentrácia aminokyselín ( $\mu\text{mol/l}$ ): A = 30 000, B = 3 000, C = 300;  $n = 12$ ; priemer  $\pm$  SEM; \*\*\*  $P < 0,001$  – Concentration of amino acids on mucous side of the rumen in lambs and adult sheep after incubation. Original concentration of amino acids ( $\mu\text{mol/l}$ ): A = 30 000, B = 3 000, C = 300;  $n = 12$ ; means  $\pm$  SEM; \*\*\*  $P < 0.001$

2. Koncentrácia aminokyselín na seróznej strane bachora u jahniat a u dospelých ovčíc po inkubácii. Pôvodná koncentrácia aminokyselín ( $\mu\text{mol/l}$ ): A = 30 000, B = 3 000, C = 300;  $n = 12$ ; priemer  $\pm$  SEM; \*\*\*  $P < 0,001$  – Concentration of amino acids on serous side of the rumen in lambs and adult sheep after incubation. Original concentration of amino acids ( $\mu\text{mol/l}$ ): A = 30 000, B = 3 000, C = 300;  $n = 12$ ; means  $\pm$  SEM; \*\*\*  $P < 0.001$

<sup>1</sup>lambs, <sup>2</sup>adult sheep

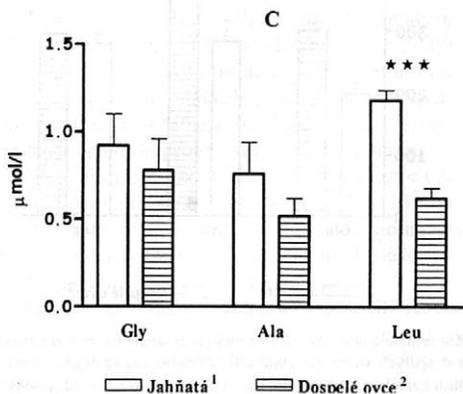
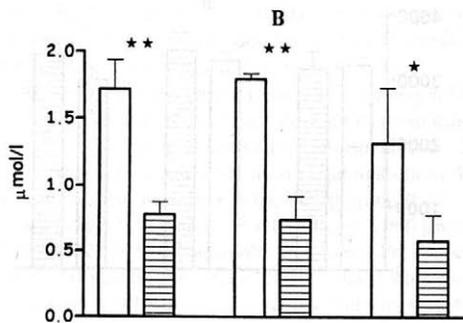
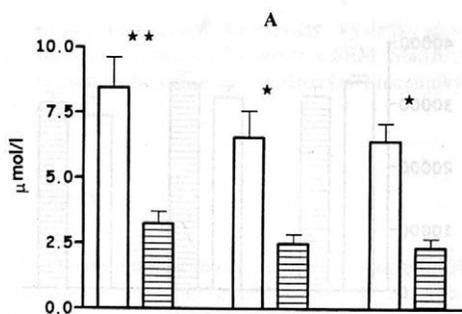
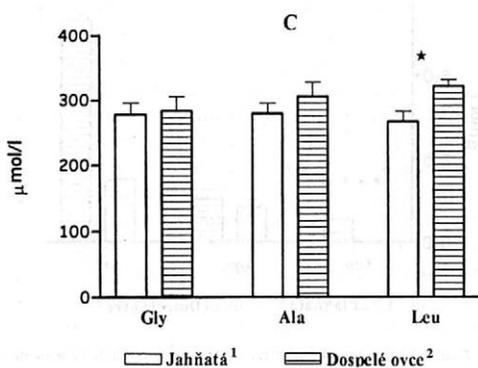
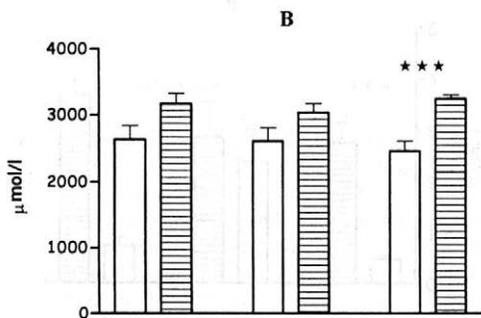
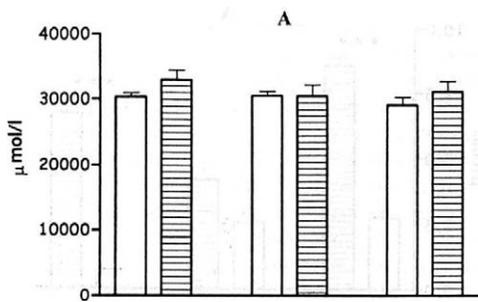
<sup>1</sup>lambs, <sup>2</sup>adult sheep

## DISKUSIA

Z našich pokusov vyplýva, že medzi faktory ktoré ovplyvňujú prestup aminokyselín cez bachorový epitel, patrí morfológický a funkčný stav bachora prežúvavcov v určitém veku.

Zaujímavé výsledky sme zistili v prestupe kyseliny glutámovej. Pri koncentrácii 300  $\mu\text{mol/l}$  sme na mu-

kóznej strane zistili signifikantne nižšie hodnoty kyseliny glutámovej a na seróznej strane bolo u jahniat jej množstvo pod hranicou merateľnosti. Výsledky naznačujú, že úbytok kyseliny glutámovej na mukózne strane bachora ešte neznamená, že aminokyselina prestúpila cez bachorovú stenu a na seróznej strane sa objavila



3. Koncentrácia aminokyselín na mukózne strane bachora u jahňat a u dospelých ovčiek po inkubácii. Pôvodná koncentrácia aminokyselín ( $\mu\text{mol/l}$ ): A = 30 000, B = 3 000, C = 300;  $n = 12$ ; priemer  $\pm$  SEM; \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$  – Concentration of amino acids on mucous side of the rumen in lambs and adult sheep after incubation. Original concentration of amino acids ( $\mu\text{mol/l}$ ): A = 30 000, B = 3 000, C = 300;  $n = 12$ ; means  $\pm$  SEM; \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$

<sup>1</sup>lambs, <sup>2</sup>adult sheep

v podobe tej istej aminokyseliny, ako opustila mukóznú stranu bachora.

Bachorová stena obsahuje dva enzýmy s aktivitou glutamátdehydrogenázy, jeden z nich (pravdepodobne adsorbovaný) má bakteriálny pôvod, zatiaľ čo druhý je

4. Koncentrácia aminokyselín na serózne strane bachora u jahňat a u dospelých ovčiek po inkubácii. Pôvodná koncentrácia aminokyselín ( $\mu\text{mol/l}$ ): A = 30 000, B = 3 000, C = 300;  $n = 12$ ; priemer  $\pm$  SEM; \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  – Concentration of amino acids on serous side of the rumen in lambs and adult sheep after incubation. Original concentration of amino acids ( $\mu\text{mol/l}$ ): A = 30 000, B = 3 000, C = 300;  $n = 12$ ; means  $\pm$  SEM; \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$

<sup>1</sup>lambs, <sup>2</sup>adult sheep

konštitučný tkanivový enzým (Lenártová a i., 1985). Enzým glutamátdehydrogenáza katalyzuje deamináciu kyseliny glutámovej na kyselinu  $\alpha$ -ketoglutárovú a tiež reverznú reakciu.

U jahniat vo veku asi osem týždňov dochádza k prudkému rastu steny bachora. Kým jednotýždňový bachor má len tenkú bachorovú stenu a malé papily, už v šiestom týždni sú bachorové epitelálne bunky drsné a vypuklé (Lysons a i., 1976). Glutamátdehydrogenáza môže byť zapojená do anabolických reakcií (syntéza keratohyalinových granúl a keratínu (Stallcup a i., 1990) a môže byť dôležitá pri katabolizme proteínov v epiteli bachora (Fell a Weekes, 1975). Predpokladáme, že v tomto období intenzívnych biosyntetických procesov v bachorovej stene u jahniat v dôsledku zvýšenej aktivity glutamátdehydrogenázy bola kyselina glutámová počas 60-minútovej inkubácie rozložená na  $\alpha$ -ketoglutaráta a amoniak. Podobné výsledky dosiahli aj Makarcev a Materikin (1972), ktorí inkubovali bachorovú sliznicu s  $^{14}\text{C}$ -glycínom a zistili, že uhlíkatý skelet bol použitý na syntézu iných aminokyselín.

Bachorová stena je metabolicky aktívna (Šlesárová a Teleha, 1983). Bola tu zistená aktivita enzýmov močovinového cyklu (Chalupa a i., 1970). Rozdiely v prestupe arginínu cez bachorovú stenu jahniat a dospelých oviec možno vysvetliť tým, že arginín je súčasťou cyklu, v ktorom sa detoxikuje amoniak a vzniká močovina (Krvavica a i., 1971; Davenport a i., 1990). Odlišné zapojenie arginínu do toho cyklu pravdepodobne súvisí s rozdielnou schopnosťou jahniat a oviec utilizovať amoniak v bachore.

Výsledky tejto práce ukázali, že existujú rozdiely v prestupe aminokyselín cez bachorovú stenu u jahniat na mliečnej výžive a u dospelých oviec.

## LITERATÚRA

- Davenport G. M., Boling J. A., Schilo K. K. (1990): Nitrogen metabolism and somatotropin secretion in beef heifers receiving abomasal arginine infusions. *J. Anim. Sci.*, **68**, 1683–1692.
- Faixová Z., Várady J. (1997): Zadržanie aminokyseliny v bachorovom epiteli oviec. *Vet. Med. – Czech*, **42**, 61–65.
- Fell B. F., Weekes T. E. C. (1975): Food intake as a mediator of adaptation in the ruminal epithelium. In: McDonald, I. W., Warner A. C. I. (eds.): *Digestion and Metabolism in the Ruminants*. Armidale The University of New England Publishing Unit, 101–118.
- Hoover W. H., Miller T. K. (1991): Rumen digestive physiology and microbial ecology. *Vet. Clin. N. Amer. – Food Anim. Pr.*, **7**, 311–325.
- Chalupa W., Clark J., Opliger P., Kavker R. (1970): Ammonia metabolism in rumen bacteria and mucosa from sheep fed soy protein or urea. *Nutrition*, **100**, 161–169.
- Church D. C. (1972): *Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants*. Vol. I. Oregon OSV Book Stores, 316.
- Krvavica S., Prosenjak M., Kučan D., Pavič H. (1971): Activities of ammonia-binding enzymes in the stratified-squamous epithelium of the ruminant forestomach. *Vet. Arhiv*, **41**, 169–174.
- Kurilov N. V., Krotkova A. P. (1971): *Fiziológia i biochimia piščevarenia žvačnych*. Moskva, Kolos, 1–432.
- Lenártová V., Holovská K., Havassy I., Javorský P., Rybošová E. (1985): Ammonia-utilizing enzymes of adherent bacteria in the sheep rumen. *Physiol. Bohemoslov.*, **34**, 512–517.
- Lysons R. J., Alexander T. J., Wellstead P. D., Jennings I. W. (1976): Observations on the alimentary tract of gnotobiotic lambs. *Res. Vet. Sci.*, **20**, 70–76.
- Makarcev N. G., Materikin A. M. (1972): Obmen glicina- $^{14}\text{C}$  v stenke rubca u ovci. Povyšenie efektívnosti ispolzovania pitateľnych veščestv racionov. Moskva, Kolos, 127–131.
- Stallcup O. T., Kreidre D. L., Rekes J. M. (1990): Histological development and histochemical localization of enzymes in rumen and reticulum in bovine fetuses. *J. Anim. Sci.*, **68**, 1783–1789.
- Šlesárová L., Teleha M. (1983):  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (GGTP) isolated from the bovine rumen mucosa membranes. In: Bođa K. (ed.): *Nitrogen Metabolism of Farm Animals*. Košice, Slovak Academy of Sciences, Institute of Animal Physiology, 107–111.
- Várady J. (1985): Výmenné procesy dusíkatých látok medzi krvou a tráviacim traktom prežúvavcov. Bratislava, Veda, 112.

Received: 98–03–16

Accepted after correction: 98–09–22

---

### Kontaktná adresa:

MVDr. Zita Faixová, CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika  
Tel. +421 95 633 21 11–15, fax +421 95 632 36 66, e-mail: faixova@vsvnov.uvm.sk

---

## CENTAUR NEWSLETTER FLASH INFORMATION

The CENTAUR NEWSLETTER FLASH INFORMATION (CNFI), published since January 1998, is an electronic bulletin providing a discussion forum to the CENTAUR Network and unique scientific and professional information available through FAO, WHO, OIE, IAEA and from other sources. The CNFI is edited at the Veterinary Research Institute, Brno, in cooperation with other countries and FAO. Fourteen issues, bringing more than 700 topical information since January 1998, have been already available to all veterinary officers, researchers, diagnosticians and university teachers, who can subscribe to this bulletin free of charge by an order e-mailed to the address "CNFI@hruska@vri.cz". Offices of the state veterinary administrations, universities and national veterinary institutes are encouraged and authorized to copy this bulletin and distribute the issues to those who have not yet access to Internet e-mail. All the previous issues are available at <http://www.clark.cz/vri/biotech.htm>. The special CNFI web site is under construction. Important papers, more information with easier selection from the index and direct links to the important web sites will be available.

CNFI contributes to linking of the CENTAUR network members and CNFI subscribers with interesting

and important web sites. Twenty three web sites have been introduced by CNFI this year.

Objectives of CNFI are as follows:

- to provide topical information for the staff of research institutes and diagnostic
- laboratories, veterinary administration authorities, and university teachers and students
- to support taking advantage of Internet for communication by e-mail and using
- the information presented in world wide web
- to provide information on the activities of institutions and individual members
- of the CENTAUR network
- to support the utilization of regional intellectual and material resources
- to improve the communication in English
- to contribute to the search for partners for joint research projects
- to support the utilization of experience gained by individual members for the training in novel methods, and to facilitate the utilization of expensive instruments

*Karel Hruška*

## PAPERS FROM ABROAD ARE WELCOME

Authors from the following foreign universities and institutes published their papers in the journal *Veterinary Medicine* in 1998:

Alberta Hospital, Canada; Environmental Protection Agency, U.S.A.; Friedrich Schiller University, Germany; National Veterinary Institute, Sweden; Parasitological Institute, Poland; South Dakota State University, U.S.A.; Swedish University of Agricultural Sciences; National Institute of Health, Slovakia; Technical University, Slovakia; University of Quebec, Canada; University of Complutense, Spain; University of Florida, U.S.A.; University of Kiel, Germany; University of

Maiduguri, Nigeria; University of Manitoba, Canada; University of Munich, Germany; University of North Carolina, U.S.A.; University of Santiago de Compostela, Spain; University of Zagreb, Croatia; P.J.Safařík University, Slovakia; University of Veterinary Medicine, Slovakia; Institute of Experimental Veterinary Medicine, Slovakia.

Instruction for the authors are available in English at the web site <http://www.clark.cz/vri/Pokynya.htm>

The manuscripts are peer reviewed and published within three to six months if no correction is needed.

*Karel Hruška*

# IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN DOGS WITH *JUVENILE PANOSTITIS*\*

## IMUNOLOGICKÉ PARAMETRY U PSŮ S JUVENILNÍ PANOSTITIDOU

M. Faldyna<sup>1</sup>, P. Trnková<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic*

<sup>2</sup> *Faculty of Veterinary Medicine, Veterinary and Pharmaceutical University, Brno, Czech Republic*

**ABSTRACT:** A set of immunological tests, expressing the activity of both cellular and humoral immunity, was used to examine peripheral blood samples collected from thirty canine patients suffering from *juvenile panostitis*. Sixteen dogs were sampled before and fourteen different dogs during the treatment. Increased numbers of eosinophilic and neutrophilic granulocytes were found in 43.3% and 23.3% of the patients, respectively. An increase in the concentration of blood serum lysozyme, reduced activity in the lymphocyte blastic transformation test and an increased number of monocytes were demonstrated in 16.7%, 10% and 6.7% of them, respectively. A comparison of mean values among group of normal dogs and of patients sampled before, or during the treatment period showed significant differences in test of chemiluminescence and in levels of circulating immunocomplexes and lysozyme. These differences reflect probably secondary changes associated with the inflammation. It is concluded that, generally, the immune system is not significantly involved in the pathogenesis of canine panostitis. Possible local effects were not detectable by the set of tests used in our investigation.

dog; *panostitis juvenilis*; cellular immunity; humoral immunity

**ABSTRAKT:** Periferní krev třiceti psů rozdílných plemen s diagnózou *panostitis* byla vyšetřena na aktivitu imunitního systému. Byly provedeny testy aktivity buněčné složky imunitního systému (celkový a diferenciální počet leukocytů, test fagocytózy methakrylátových částic, test chemiluminescence, test blastické transformace lymfocytů a zastoupení subpopulací lymfocytů metodou průtokové cytometrie) i stanovení některých sérových faktorů (koncentrace celkových imunoglobulinů, hladina sérového lysozymu, hladina cirkulujících imunokomplexů a ANA-test). Krev šestnácti psů byla odebrána před zahájením a krev čtrnácti psů po zahájení terapie. Srovnáním jednotlivých vyšetřených psů s našimi referenčními hodnotami bylo zjištěno, že 43,3 % psů mělo vyšší počet eosinofilních granulocytů, 23,3 % mělo vyšší počet neutrofilních granulocytů, 16,7 % mělo vyšší hladinu sérového lysozymu, 10 % psů mělo nižší aktivitu lymfocytů v testu blastické transformace a 6,7 % mělo vyšší počet monocytů. Srovnáním průměrných hodnot tří skupin – kontrolních psů, psů vyšetřených před zahájením terapie a psů vyšetřených až po zahájení terapie – byly zjištěny některé statisticky významné rozdíly. Tyto rozdíly byly nalezeny v testu chemiluminescence a v hladině sérového lysozymu u skupiny vyšetřené po zahájení a v množství cirkulujících imunokomplexů u skupiny vyšetřené před zahájením terapie. Tyto změny ale jsou patrně až sekundární a souvisí se zánětem. Proto se dá usuzovat, že imunitní systém na úrovni celého organismu nemá významný podíl na vzniku a rozvoji panostitidy psů. Tyto údaje nevylučují možnost změn na lokální úrovni, toto ale nelze námi použitými testy postihnout.

pes; *panostitis juvenilis*; buněčná imunita; humorální imunita

### INTRODUCTION

*Juvenile panostitis* (JP) is known by other names, including juvenile osteomyelitis, canine panosteitis, osteomyelitis of young dogs, enostosis and eosinophilic panosteitis. JP is a disease with unknown ethiology, diagnosed most frequently in young dogs of larger breeds, including particularly German Shepherds, Doberman Pinschers, Great Danes, Pointers, Irish Setters,

Airedale Terriers, Labradors, and Pitbull Terriers, while medium and small breeds are affected only rarely. Thus 86 of a set of 100 dogs suffering from JP and examined by Böhning et al. (1970) were German Shepherds. JP develops most frequently in dogs aged 5 to 15 months, extreme recorded ages were 2 months and 5 years. Males are affected more often than females. The set of 100 dogs examined by Böhning et al. (1970) consisted of 79 males and 21 females.

\* Supported by Faculty of Veterinary Medicine, Veterinary and Pharmaceutical University, Brno, Czech Republic (Internal grant No. 8102632) and by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Grant No. EP6082).

JP is a painful disease of long bones affecting diaphyses and metaphyses and characterized by medullar endostosis and, in some patients, formation of subperiosteal neoplastic structures. The inflammation usually develops in a single long bone (most frequently *humerus, radius, ulna, femur, or tibia*). Lesions in several bones are found in approx. 25% patients. Clinical signs may disappear temporarily. The most apparent signs are mild to severe lameness and strong palpatory pain at the affected site. Decisive for the diagnosis of JP are radiograms showing an increase in intramedullar opacity, endosteal thickening and laminar smooth thickening of the bone. Radiological examination also allows the distinction between JP and other diseases manifested by lameness, such as hypertrophic osteodystrophy, osteochondrosis dissecans and incomplete fractures.

Although several hypotheses concerning the cause of JP, including infectious or hereditary factors, temporal vascular anomalies, allergic or autoimmune reactions, and metabolic disorders, have been postulated (Barrett et al., 1968; Evers, 1969; Turnier and Silverman, 1978), none of them has been confirmed so far. Böhning et al. (1970) obtained negative results of bacteriological examination of radiodense bone lesions and found normal blood serum concentration of calcium and phosphorus and activity of alkaline phosphatase, while Yoshizawa et al. (1989) pointed out a marked increase in the activity of alkaline phosphatase in their case report. Only symptomatic treatment, consisting in the administration of non-steroid antiinflammatory drugs, analgetics and antibiotics, is possible owing to the unknown cause of the disease. Absolute quiet of the patient for at least three weeks and a balanced ration are necessary for successful treatment of the disease.

The aim of our investigations was to assess the role of the immune system in the pathogenesis of JP.

## MATERIAL AND METHODS

### Animals

Thirty dogs of various breeds suffering from panostitis and treated at the Clinic of Surgery and Orthopaedics of University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, were tested for immunological parameters. The set with a mean age of 13.2 months (range 4 months to 4 years, 25 dogs were younger than 15 months) included twenty males and ten females. Panostitis was diagnosed on the basis of clinical signs and radiographic findings. Most of them were German Shepherds (12 = 40%), followed by Doberman Pinschers, English Setters and Rottweilers. The period from beginning of clinical manifestation to start of treatment was different. Blood samples of sixteen dogs were collected before starting the therapy (referred to as untreated henceforth). Blood samples of fourteen differ-

ent dogs were collected in period five to seven days after starting the therapy. The patients were treated with Finadyne pro inj. (Essex, Germany, Flunixinum meglonicum 83 mg/ml, 1 ml per 40 kg live weight, i.v.) and Clamoxyl L.A. inj. ad us. vet. (Smith Kline Beecham Animal Health, Belgium, Amoxycillinum 150 mg/ml, 1 ml per 10 kg live weight, i. m.). A control group included thirty-four clinically healthy dogs.

### Blood collection

Blood was collected from vena cephalica antebrachii. Heparin (15 i.u./ml) was used as an anticoagulant for tests of cell activity. Blood for serological tests was collected without anticoagulant. The samples were processed in the day withdrawal.

### Immunological tests

**Total and differential leukocyte counts.** Total leukocyte counts were determined using the Digicell 500 cell counter (Contraves AG, Switzerland). Differential leukocyte counts were calculated from blood smears stained with May-Grünwald and Giemsa-Romanowski.

**Phagocytosis of methacrylate particles.** Phagocytosis by neutrophils and monocytes of methacrylate particles (MSHP, Artim, Prague) was determined in the whole blood using a modification (Toman and Pšikal, 1985) of the test described by Větvička et al. (1982).

**Chemiluminescence test.** Metabolic activity of neutrophils and monocytes was expressed as their chemiluminescence after reaction with luminol (Allen et al., 1972) in a test modified for canine blood (Makimura and Sawaki, 1992). Results were read using the BioOrbit 1251 luminometer (BioOrbit Oy, Finland).

**Lymphocyte transformation test.** Canine lymphocytes were separated from blood in a cell separating medium with a density of 1.077 g/ml (Verografin, Léciva Prague) and their activity after stimulation with phytohaemagglutinin (PHA), concanavalin A (ConA), or pokeweed mitogen (PWM) was tested using the lymphocyte transformation test (Kristensen et al., 1982). The incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine was measured with the liquid scintillation counter Packard Tricarb CA 1600 (Canberra-Packard Instruments).

**Flow cytometry.** Lymphocyte subsets were enumerated in ten blood samples by flow cytometry. The enumeration was done using the indirect whole blood lysis technique. Fifty  $\mu\text{l}$  of blood was incubated with monoclonal antibodies at room temperature for 15 min and subsequently treated with a haemolytic solution (8.26 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 g  $\text{KHCO}_3$  and 0.037 g  $\text{Na}_4\text{EDTA}$  in 1 litre of distilled water). After centrifugation and removal of the supernatant, secondary antibody was added and the suspension was incubated at 4 °C for 20 min. Three ml of washing solution (1 g natrium-azid and 1.84  $\text{Na}_4\text{EDTA}$

in 1 litre of PBS) was added into all tubes, the suspension was centrifuged and after removal of supernatant, the cells were resuspended in the washing solution supplemented with paraformaldehyde. The enumeration was done using the flow cytometer FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA) immediately, or the samples were kept overnight at 4 °C.

Murine monoclonal antibodies anti-canine CD3 (CA17.2A12), CD4 (CA13.1E4), CD8 $\alpha$  (CA9.JD3), and CD21 (CA2.1D6) kindly provided by P. Moore (Davis, USA) and murine anti-CD8 $\alpha$  (DOG10.8E) kindly provided by E. Kremmer (Munich, Germany) were used as primary antibodies. These antibodies were presented at the first canine leucocyte antigens workshop (Cobbold and Metcalfe, 1994). Fluorescein isothiocyanate-labelled swine anti-mouse immunoglobulin (SwAM-FITC, Sevac, Prague) was used as a secondary antibody.

**Total immunoglobulins.** The total immunoglobulin concentration was determined spectrophotometrically measuring the turbidity resulting from the addition of zinc sulfate to serum. The procedure was a modification (Krejčí, 1975) of the method described by McEwan et al. (1970).

**Lysozyme level.** The concentration of lysozyme in blood serum was determined by a spectrophotometric measurement of clarification of a *Micrococcus lysodeicticus* suspension as described by Richter and Procházková (1986), in a modification described by Toman et al. (1997b).

**Circulating immunocomplexes (CIK).** The concentration of CIK in blood serum were determined by nephelometric detection of soluble antigen-antibody complexes after their precipitation with polyethylenglycol (Hašková, 1986).

**Antinuclear antibody (ANA)-test.** An impression of rat liver was made on a slide and fixed with a frozen (-13 °C) mixture of methanol and acetone (1 : 1). Then 1–2  $\mu$ l of the tested serum, positive (VMRD, Inc., Pullman, WA) and negative control were added on impression and were incubated at room temperature for 1 hour. After washing with PBS, fluorescein-isothiocyanate-labelled rabbit anti-canine IgG, prepared in our laboratory, was added and the slide was incubated at room temperature for 1 hour. After washing, a drop of glycine with PBS was added on impression. The sample was viewed using a fluorescence microscope.

## Evaluation of results and statistical analysis

The results of the immunologic tests were used for both individual immunologic diagnoses and for the comparative assessment of the activity of the immune system in groups at the same stage of treatment and group of clinically normal dogs. Individual immunologic diagnoses were determined in terms of criteria for reduced or increased activities in immunological tests (Toman et al., 1997b). A comparison of lymphocyte subsets distribution was done using the distribution patterns found in Beagle dogs of the same age by Faldyna and Toman (1998) as reference values. Statistical analysis was done using the programme STAT plus version 1.10 (Matoušková et al., 1992). Mean values, standard deviations and statistical significance using Student's *T*-test were calculated.

## RESULTS

Comparison with our reference values of the data obtained in individual patients showed increased peripheral eosinophil counts in thirteen (43.3%) animals, the increase being marked in five of them. Six of them were sampled before and seven after the treatment had been started. Increased peripheral neutrophil counts were found in seven (23.3%) dogs including four untreated and three treated ones. Increased blood serum lysozyme levels were demonstrated in two untreated and three treated (16.7%) dogs and reduced values in blastic transformation test and increased counts of peripheral monocytes in three (10%) and two (6.7%) dogs, respectively.

Tab. I contains data on total and differential leukocyte counts. An insignificant decrease in total leukocyte counts, involving neutrophil granulocytes and lymphocytes, and insignificant increases in counts of peripheral eosinophil granulocytes were observed in both groups affected by panostitis. Relative counts of eosinophils were  $10.1 \pm 7.3$  and  $9.5 \pm 6.7$  in groups affected dogs and  $3.1 \pm 2.6$  in control dogs.

Tab. II shows values of phagocytary activity expressed in terms of percentages of phagocytizing neutrophil granulocytes and monocytes and metabolic activity of phagocytizing cells measured using the chemiluminescence test. Data demonstrate a higher spontaneous, i. e.

I. Leukocyte counts of dogs with panostitis

		Control dogs (n = 34)	Affected dogs untreated (n = 16)	Affected dogs treated (n = 14)
Leukocytes	(10 <sup>9</sup> /l)	10.7 $\pm$ 2.7	9.5 $\pm$ 2.4	9.5 $\pm$ 2.2
Lymphocytes	(10 <sup>9</sup> /l)	3.6 $\pm$ 1.5	2.8 $\pm$ 0.9	2.9 $\pm$ 1.0
Neutrophils	(10 <sup>9</sup> /l)	6.3 $\pm$ 2.5	5.2 $\pm$ 1.8	5.1 $\pm$ 1.6
Monocytes	(10 <sup>9</sup> /l)	0.4 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.3
Eosinophils	(10 <sup>9</sup> /l)	0.3 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.7	0.9 $\pm$ 0.8

unstimulated chemiluminescence and consequently significantly lower stimulation indexes in the treated dogs.

The results of lymphocyte blastic transformation test are shown in Tab. III. The only significant difference was a weaker response to the stimulation with the pokeweed mitogen in the untreated group when compared with controls.

Tab. IV contains blood serum characteristics including levels of total immunoglobulins, circulating immunocomplexes and lysozyme. The significant difference was found in the level of circulating immunocomplexes between the untreated and the control groups, and in the level of serum lysozyme between the treated and the control groups. All ANA-tests were negative.

Absolute counts of lymphocyte subpopulations are given in Tab. V. The percentages obtained in individual groups were comparable, but absolute total and subpopulation counts were lower in the groups affected by panostitis.

## DISCUSSION

Non-specific activity of the immune system was tested in twenty male and ten female dogs aged 4 months to 4 years (mean age 13.2 months) suffering from panostitis. German Shepherds were affected most frequently (40% of the patients). Similar findings as to the age and breed were published by Cotter et al. (1968), Hardy and Stockman (1969), and Böhning et al. (1970).

A comparison with our reference values obtained in normal dogs (Toman et al., 1997b) showed an increase in eosinophilic granulocyte counts in 43.3% of the patients. While Hardy and Stockman (1969) reported this increase in 35% of their patients, Böhning et al. (1970) described it on only one of twenty-one patients tested for differential counts of leukocytes. Cotter et al. (1968) did not classify their findings as eosinophilia, but they compared their data with values published by Schalm (1961). In case of comparison with the refer-

### II. Phagocytic activity of dogs with panostitis in test of phagocytosis of methacrylate particles and chemiluminescence test

	Control dogs (n = 34)	Affected dogs untreated (n = 16)	Affected dogs treated (n = 14)
Phagocytosis (%)	77.6 ± 20.8	74.5 ± 15.1	74.1 ± 14.3
Chemiluminescence test unstimulated cells (mV)	0.9 ± 0.5	1.2 ± 0.6	1.7 ± 0.6*▲
Stimulation index	53.1 ± 17.4	43.0 ± 18.9	28.6 ± 11.3*▲

\*  $P < 0.05$  for untreated vs. treated

▲  $P < 0.01$  for control vs. treated

stimulation index – ratio of activated and unstimulated cells

### III. Activity of lymphocytes of dogs with panostitis in lymphocyte transformation test

	Control dogs (n = 34)	Affected dogs untreated (n = 16)	Affected dogs treated (n = 14)
Rest cells (CPM)	260 ± 139	211 ± 132	278 ± 151
Stimulation index			
PHA	43.2 ± 25.5	39.3 ± 17.1	40.8 ± 24.6
ConA 1	42.1 ± 28.7	43.4 ± 24.9	49.8 ± 22.5
ConA 2	40.5 ± 29.4	32.6 ± 19.6	38.0 ± 20.6
PWM	36.2 ± 19.8	24.3 ± 12.0*	34.2 ± 20.6

\*  $P < 0.05$  for control vs. untreated

CPM – count per minute

### IV. Serological parameters of dogs with panostitis

	Control dogs (n = 34)	Affected dogs untreated (n = 16)	Affected dogs treated (n = 14)
Total Ig (g/l)	7.4 ± 3.3	8.1 ± 3.9	7.3 ± 1.8
CIK	16.9 ± 9.9	23.8 ± 12.5*	27.8 ± 22.6
Lysozyme (g/l)	2.5 ± 1.1	2.4 ± 1.4	3.3 ± 1.2▲

\*  $P < 0.05$  for control vs. untreated

▲  $P < 0.05$  for control vs. treated

Ig – immunoglobulins

CIK – circulating immunocomplexes

Lymphocytes	Healthy Beagle dogs (n = 7)	Dogs with panostitis (n = 10)
Total (10 <sup>9</sup> /l)	4.0 ± 0.3	2.8 ± 0.9*
CD3 -positive (10 <sup>9</sup> /l)	3.1 ± 0.3	2.2 ± 0.5*
CD21 -positive (10 <sup>9</sup> /l)	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.3
CD4 -positive (10 <sup>9</sup> /l)	1.7 ± 0.3	1.1 ± 0.4*
CD8 -positive (10 <sup>9</sup> /l)	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.2*
CD4/CD8 ratio	2.5 ± 0.5	2.6 ± 1.2

\* P < 0.01

ence values described by Toman et al., 1997b, eosinophilia would be diagnosed in four (25%) of their dogs used for obtaining. It is evident that the diagnosis of eosinophilia is a matter of setting the upper limit of the normal range.

Between-group differences in the results of chemiluminescence test and concentrations of blood serum lysozyme in the dogs suffering from JP were apparently due to the stage of the condition, because there was a one-week difference between the group sampled during the treatment period and that sampled before the treatment period. Both groups affected by JP showed higher concentrations of circulating immunocomplexes than the control group of clinically normal dogs. The nonsignificant character of this increase in the group sampled during the treatment period apparently resulted from higher SD. Clinical relevance of this increase is reduced by the fact that the nature and type of the antigen components were not identified. In spite of the statistical significance, the increase did not exceed the upper limit of our reference values in any of the patients and therefore it cannot be considered relevant to the pathogenesis of JP.

The distribution of lymphocyte subpopulation in the dogs affected by JP was compared with results obtained in a group of Beagle dogs of the same age published previously (Faldyna and Toman, 1998). However, breed effects, that may play an important role as indicated by Toman et al. (1997a) were disregarded. Despite this fact, or just therefore, no differences in the percentages of individual subpopulations were found. The differences in absolute counts were apparently due to the lower total lymphocyte counts in the groups affected by JP.

The results presented here allow us to conclude that none of the parameters of the immune status in dogs affected by JP is suggestive of the participation at the level of the whole organism in the pathogenesis of this condition. On the other hand, local effects, such as that of interleukin-1 cannot be precluded. The production of this cytokine is stimulated by various substances including adjuvants administered as vaccine components repeatedly particularly to younger dogs. The effects of interleukin-1 on bone is characterized by a decrease of

the concentration of alkaline phosphate in osteoblasts and an increase in the collagenase activity in osteoclasts. The effects of interleukin-1 on bone may be more marked during the growth phase in pups of large breeds.

## REFERENCES

- Allen R. C., Sijernholm R. I., Steele R. H. (1972): Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 47, 679–685.
- Barrett R. B., Schall W. D., Lewis R. E. (1968): Clinical and radiographic features of canine eosinophilic panosteitis. *J. Am. Anim. Hosp.*, 4, 94–104.
- Böhning R. H., Suter P. F., Hohn R. B., Marshall J. (1970): Clinical and radiologic survey of canine panosteitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 156, 870–883.
- Cobbold S., Metcalfe S. (1994): Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: Summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). *Tissue Antigens*, 43, 137–154.
- Cotter S. M., Griffiths R. C., Leav I. (1968): Enostosis of young dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 153, 401–410.
- Evers W. H. (1969): Enostosis in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 154, 799–803.
- Faldyna M., Toman M. (1998): The effect of age on the distribution of lymphocyte and neutrophil granulocyte subsets in the peripheral blood of dog. *Vet. Med. – Czech*, 43, 193–199.
- Hašková V. (1986): Průkaz cirkulujících imunokomplexů. In: Procházková J., John C. (eds.): *Vybrané diagnostické metody lékařské imunologie*, Praha, Avicenum, pp. 114–119.
- Hardy W. D., Jr., Stockman W. S. (1969): Clinico-pathologic conference. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 154, 1600–1608.
- Krejčí J. (1975): Stanovení hladiny gamaglobulinů v krevním séru telat. *Zprávy ÚSVÚ*, 15–17.
- Kristensen B., Kristensen F., Vandevalde M., Higgins R. J., De Weck A. L. (1982): Canine lymphocyte cultures *in vitro*: Evaluation of peripheral blood lymphocyte response to mitogens. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 3, 439–448.
- Makimura S., Sawaki M. (1992): Evaluation of phagocytic function of canine peripheral polymorphonuclear leukocytes by whole blood chemiluminescence. *J. Vet. Med. Sci.*, 54, 63–67.
- Matoušková O., Chalupa J., Cigler M., Hruška K. (1992): STAT Plus – uživatelská příručka. Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství. 168 pp.
- Mcewan A. D., Fischer E. W., Selman I. E., Penhale W. J. (1970): A turbidity test for estimation of immune globulin levels in neonatal calf serum. *Clin. Chim. Acta*, 27, 155–163.
- Richter J., Procházková J. (1986): Lysozym – fotometrická metoda. In: Procházková J., John C. (eds.): *Vybrané diagnostické metody lékařské imunologie*, Praha, Avicenum, pp. 109–110.

- Schalm O. W. (1961): Veterinary hematology. 2nd ed. Philadelphia, Lea & Febiger.
- Toman M., Pšikal I. (1985): Test fagocytární aktivity krevních leukocytů telat. *Vet. Med. – Czech*, 30, 393–400.
- Toman M., Rybníček J., Faldyna M. - Svoboda M. (1997a): Immunosuppression and/or immunodeficiency in German Shepherds with pyoderma. In: 14th Annual Congress ESVD-ECVD, Pisa, Italy, 1997. Proceedings, p. 203.
- Toman M., Svoboda M., Rybníček J., Krejčí J., Faldyna M., Bárta O. (1997b): Immunosuppression in dogs with pyoderma and/or demodicosis. *Vet. Med. – Czech*, 42, 299–306.
- Turnier J. C., Silverman S. (1978): A case study of canine panosteitis: Comparison of radiographic and radioisotopic studies. *Am. J. Vet. Res.*, 39, 1550–1552.
- Větvička V., Fornůsek L., Kopecěk J. (1982): Phagocytosis of human blood leukocytes: a simple micro-method. *Immunol. Lett.*, 5, 97–100.
- Yoshizawa K., Goryo M., Umemura T., Hayashi T. (1989): A case of canine panosteitis. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 42, 339–342.

Received: 98-07-11

Accepted: 98-09-03

---

*Contact Address:*

MVDr. Martin Faldyna, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudecova 70, 621 32 Brno, Česká republika  
Tel. +420 5 41 32 12 41, fax +420 5 41 21 12 29, e-mail: faldyna@vri.cz

---

# IMPAIRMENT OF NEUTROPHIL AND LYMPHOCYTE FUNCTIONS IN DOGS WITH UNCOMPLICATED AND PYODERMA COMPLICATED DEMODICOSIS

## POŠKODENIE FUNKCIE NEUTROFILOV A LYMFOCYTOV U PSOV S NEKOMPLIKOVANOU DEMODIKÓZOU A DEMODIKÓZOU KOMPLIKOVANOU S PYODERMOU

J. Mojžišová, Š. Paulík, D. Baranová

*University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak republic*

**ABSTRACT:** The objective of investigation was to determine the degree of phagocytic ability of neutrophils and lymphocyte blastogenesis in dogs with different duration of uncomplicated localized (LD) and generalized (GD) demodicosis, in comparison with the values in dogs with demodicosis complicated with pyoderma and the clinically normal dogs. At the time of analysis, the dogs received no medical therapy. Pyoderma was detected in the group of dogs which exhibited GD over five weeks from the appearance of clinical signs. Depression of phagocytic activity (% of phagocytosis) and ingestion capacity (index of phagocytic activity) have been demonstrated in the dogs suffering from GD, but not in the LD dogs. Neutrophil dysfunction depended on the duration of clinical signs manifestation. Neutrophils from the dogs with pyoderma complicated GD exhibited significantly lower ingestion capacity than those from the dogs with uncomplicated GD. It was proposed that the presence of bacterial infection may be related to the neutrophil alteration initiated by demodicosis. Lymphocyte blastogenesis suppression to Con A accompanied not only uncomplicated GD, but also LD. This immunosuppression develops with the duration of clinical disease. Lymphocytes from the dogs with uncomplicated GD and pyoderma complicated GD responded to Con A equally, however their response was significantly lower in comparison with the control. We do not assume that the immunosuppression in the investigated dogs with complicated GD was due to the secondary bacterial infection. In conclusion, the dysfunction of both lymphocytes and neutrophils could predispose to the development of secondary pyoderma, a common sequela to generalized demodicosis.

dogs; demodicosis; neutrophils; lymphocytes; phagocytic activity; blastogenesis

**ABSTRAKT:** Predmetom štúdia bolo určiť úroveň fagocytárnej schopnosti neutrofilov a blastogenézy lymfocytov u psov s rozdielnym trvaním nekomplikovanej lokalizovanej (LD) a generalizovanej demodikózy (GD) v porovnaní s hodnotami u psov s demodikózou komplikovanou pyodermou a klinicky zdravých psov. Počas doby sledovania psy neboli podrobené žiadnej terapii. Pyoderma bola zistená u skupiny psov s generalizovanou demodikózou trvajúcou viac ako päť týždňov od objavenia sa klinických príznakov. Zníženie fagocytárnej aktivity (percento fagocytózy) a ingesčnej kapacity (index fagocytárnej aktivity) bolo preukázané u psov s GD, ale nie u psov s LD. Dysfunkcia neutrofilov bola závislá na trvaní manifestácie klinických príznakov. Neutrofily psov s GD komplikovanou s pyodermou mali významne nižšiu ingesčnú kapacitu ako neutrofily psov s nekomplikovanou GD. Predpokladáme, že prítomnosť bakteriálnej infekcie je vo vzťahu k alterácii neutrofilov iniciovanej demodikózou. Supresia lymfocytárnej blastogenézy ku Con A doprevádza nielen nekomplikovanú GD, ale aj LD. Táto imunosupresia sa vyvíja s trvaním klinického ochorenia. Lymfocyty psov s nekomplikovanou GD a GD komplikovanou pyodermou reagovali na Con A podobne, avšak ich reakcia bola významne nižšia v porovnaní s kontrolou. Nepredpokladáme, že imunosupresia u vyšetrovaných psov s komplikovanou GD bola dôsledkom sekundárnej bakteriálnej infekcie. Záverom je možné konštatovať, že dysfunkcia lymfocytov a neutrofilov mohla byť predispozičným faktorom pre rozvoj sekundárnej pyodermy, obvyklého následku generalizovanej demodikózy.

psy; demodikóza; neutrofily; lymfocyty; fagocytárna aktivita; blastogenéza

### INTRODUCTION

Demodicosis is a frequent skin disease of dogs (Sischo et al., 1989; Toman et al., 1996) associated with modulation of host's immunity (Lemarie, 1996; Paulík et al., 1996a). The most frequently studied immune aspect of

this disease is a suppression of cellular immunity, especially in view of lymphocytic reactivity to T-cell mitogens (Scott et al., 1974, 1976; Corbett et al., 1975, 1976; Healey and Gaafar, 1977; Barta et al., 1981; Barriga et al., 1992; Paulík et al., 1996b, c and others) and recently in view of suppression of interleukin-2 production (Lemarie and Horohov, cit. Lemarie, 1996).

There is only a limited number of reports dealing with the activity of non-specific immunity in demodicosis, even those available are in contradiction. While Scott (cit. Muller et al., 1989) and Toman et al. (1995) did not report any deficiency in the functional activity of neutrophils, others demonstrated suppression of spontaneous and chemotactic motility (Latimer et al., 1983; Schmitt et al., 1994) and decrease in phagocytic activity (Schmitt et al., 1994) of these blood cells.

Pathogenesis of demodicosis has not yet been completely understood. Many questions have not yet been explained. They concern for example the always proclaimed (Muller et al., 1989; Georgi and Georgi, 1992; Ginel, 1996), but not yet proved hereditary defect of T-cells; the principle (an effect of serum factor only) of immunosuppression (Hirsh et al., 1975; Kraiß, 1987; Paulik et al., 1996b) and the immunopathogenesis of juvenile-onset or adult-onset of demodicosis (Scott et al., 1976; Wilkie et al., 1979; Krawiec and Gaafar, 1980; Duclos et al., 1994); and even the very cause (uncomplicated demodicosis or pyoderma associated demodicosis) of immunosuppression associated with clinical disease (Scott et al., 1976; Barta et al., 1983; Barriga et al., 1992; Paulik et al., 1996c; Toman et al., 1996).

This study was undertaken: 1) To assess the degree of phagocytic ability of blood neutrophils in demodectic dogs exhibiting clinical signs of varying duration, taking into consideration blood lymphocyte reactivity to mitogen; 2) To assess an association between the suppression of lymphocyte blastogenesis and demodicosis without or with pyoderma taking into consideration the phagocytic ability of neutrophils.

## MATERIAL AND METHODS

### Animals and protocol

The observations were carried out on 12 healthy dogs (7 breeds) and 28 dogs with demodicosis. Three of the healthy dogs were males and nine were females. Average age of healthy dogs was 1.3 years (4 mo. to

4 yr. old). These dogs came from private owners and were examined together with sick dogs.

Fifteen dogs (5 breeds; 6 males and 9 females; of average age 1.1 years, 6 mo. to 2 yr. old) from the sick dogs were diagnosed clinically as having active localized demodicosis (LD; persisted for 1–10 weeks) and 13 (6 breeds; 8 males and 5 females; of average age 1.4 years, 5 mo. to 5.0 yr. old) as having active generalized demodicosis (GD; persisted for 4–16 weeks). The diagnosis was confirmed parasitologically. None of the dogs with LD and GD with the disease duration of less than 5 weeks showed clinical signs of pyogenic dermatitis at the time of investigation. From the GD dogs that had skin lesions for more than 5 weeks, superficial pyoderma was clinically and bacteriologically (*Staphylococcus aureus*) diagnosed in 4 dogs. The phagocytic ability of blood neutrophils and the blastogenesis of blood lymphocytes in demodicosis affected dogs were investigated (according to acceptance of sick dogs at our clinic for small animals) by the same procedures as in clinically healthy dogs. At the time of analysis, the dogs did not receive any pharmacotherapy. Animals were divided to groups and evaluated according to Tab. I.

### Examination

Blood samples were obtained from the *v. cephalica* and placed into a tube containing heparin (5 units/ml of blood).

**Phagocytic ability of blood neutrophils.** Evaluation was carried out as described by Větvička et al. (1982), using the phagocytosis of 2-hydroxyethylmetacrylate copolymer particles (MSHP, diameter: 1.2 µm; ARTIM Prague). Fresh heparinized blood in volume of 0.1 ml was mixed with 0.05 ml of MSHP suspension. The mixture was incubated for 1 hour at 37 °C with occasional shaking. Phagocytic activity (PA) was expressed from the number of neutrophils (by differentiation of 200 leukocytes) as the percentage of cells able to phagocytize more than 3 MSHP. The index of phagocytic activity (IPA) was calculated as the ratio of the

### I. Groups of dogs with demodicosis used in this study

Groups of dogs	Time affected		Number of dogs	
	week	mean ± SD		
LD	1. both groups (2. + 3.)	1–10	5.6 ± 2.7	15
	2. to 5 weeks	1–5	3.3 ± 1.5	7
	3. over 5 weeks	6–10	7.6 ± 1.5	8
GD	1. both groups (2. + 3.)	4–16	8.2 ± 3.9	13
	2. to 5 weeks	4–5	4.5 ± 0.5	5
	3. over 5 weeks	6–16	10.5 ± 3.1	8
	3a. (GD)	6–16	10.5 ± 4.4	4
	3a. (GD + SP)	9–12	10.5 ± 1.7	4

LD = localized demodicosis

GD = generalized demodicosis

GD + SP = GD complicated with superficial pyoderma

number of phagocytized MSHP and the number of phagocytizing cells.

**Blastogenic response of blood lymphocytes to mitogen.** The lymphocytes were isolated using the Ficoll (Pharmacia Biotech AB, Sweden), according to the method described by Procházková (1979). The majority (> 95%) of isolated cells were defined as mononuclear

## RESULTS

The comparison of parameters of phagocytic ability of blood neutrophils and blood lymphocyte blastogenesis in investigated groups of dogs with demodicosis and the control group (C group) is shown in Tab. II. The percentage of phagocytic neutrophils was significantly

II. Phagocytic capacity of blood neutrophils and blastogenesis of blood lymphocytes in dogs with different duration of demodicosis

Groups of dogs		Parameters		
		PA (%)	IPA	SI
LD	1. to 5 weeks	66.0 ± 8.2 <sup>a,c</sup>	7.0 ± 1.7	4.7 ± 1.6 <sup>x,a,b</sup>
	2. over 5 weeks	50.1 ± 12.0 <sup>b,c</sup>	6.2 ± 1.9 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.8 <sup>x,b</sup>
GD	1. to 5 weeks	53.4 ± 7.3 <sup>a,d</sup>	6.0 ± 1.4 <sup>b</sup>	2.9 ± 0.5 <sup>x,a,c</sup>
	2. over 5 weeks	37.4 ± 11.6 <sup>x,b,d</sup>	3.1 ± 1.3 <sup>x,a,b</sup>	1.4 ± 0.4 <sup>x,c</sup>
Control		59.2 ± 8.4	7.2 ± 2.8	7.8 ± 1.8

LD and GD = see Tab. I; PA (%) = phagocytic activity; IPA = index PA; SI = stimulation index

x =  $P < 0.001$  (vs. control)

PA: a, b =  $P < 0.05$ , c, d =  $P < 0.025$

IPA: b =  $P < 0.01$ , a =  $P < 0.005$

SI: a =  $P < 0.05$ , b, c =  $P < 0.001$  (the values designated by the same letter are significantly different)

cells. Viability of these cells exceeded 95%, as determined by trypan blue exclusion. The cultivation, mitogen stimulation and the measurement of response of lymphocytes to Con A by ethidium bromide (EB) fluorescence assay were investigated, as described in our previous paper (Paulik et al., 1996b). Briefly, separated cells were resuspended in culture medium (RPMI 1640 containing 15% autologous dog serum) to give  $1 \times 10^6$  cells per ml. Five hundred microliters of the lymphocyte suspension were cultured in the presence of 500  $\mu$ l of the mitogen concanavalin A (25  $\mu$ g/ml; Sigma Chemical Co., USA). As a control, 500  $\mu$ l of the culture medium was added instead of the mitogen. The cultures were set up in triplicate and incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in humidified air for 96 hours. After incubation cell pellets of samples were solubilized with sodium dodecyl sulphate (Aldrich Chemie, Germany) solution and kept at room temperature for 30 minutes. Afterward, EB (Aldrich Chemie, Germany) solution was added. Mixtures without lymphocytes were used as a background of fluorescence intensity (FI). FI was measured by a spectrofluorometer (Jasco FP-550, Japan). Stimulation index was calculated as follows: (A-C)/(B-C); where A is mean FI with mitogen, B is mean FI without mitogen, C is background FI.

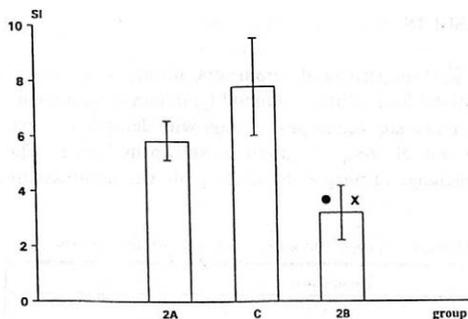
### Statistical analysis

Data obtained were expressed as mean  $\pm$  standard deviation and analysed by Student's *t*-test. Only the *P* values equal to 0.05 or smaller than 0.05 were considered statistically significant.

lower only in the GD dogs (groups 2) when compared with C group. The comparison of groups (i.e. 1 and 2) between LD and GD dogs revealed a significant reduction in the percentage of phagocytic neutrophils in GD dogs in all the cases. A significantly higher number of neutrophils phagocytized in the LD and GD dogs that showed signs of clinical disease for less than 5 weeks from the appearance of the first skin lesions (i.e. group 1 in LD and GD) in comparison with the dogs manifesting clinical signs over 5 weeks (i.e. group 2 in LD and GD). The index of phagocytic activity was significantly decreased only in GD dogs (group 2) when compared with the C group. Significantly lower IPA values were found in the GD dogs of group 2 when compared with the same groups (i.e. group 2) in the LD dogs. No significant difference was observed between group 1 of LD and GD dogs. The comparison of the degree of IPA in LD and GD dogs that show clinical signs for less and more than 5 weeks from the appearance of the first skin lesions has demonstrated a significant reduction only in the GD dogs of group 2.

A significant decrease in SI values was observed in all groups of LD and GD dogs when compared with those in the group C. Significantly lower blastogenesis of lymphocytes was observed in group 1 of GD dogs when comparing groups 1 and 2 between LD and GD dogs. No significant difference was observed between groups 2 of LD and GD dogs. In both LD and GD dogs, SI values were significantly higher in dogs with shorter duration of clinical disease (i.e. group 1).

When LD dogs of group 1 were divided into 2 subgroups (2A = disease lasting for 1-3 weeks,  $n = 4$ ; 2B = disease lasting for 4-5 weeks,  $n = 3$ ) regarding skin lesion duration, only SI value in dogs of subgroup 2B



1. Blastogenic response of blood lymphocytes to mitogen in dogs with different duration of LD to 5 weeks from the appearance of clinical signs

SI = stimulation index

2A = dogs with 1-3 week demodicosis

2B = dogs with 4-5 week demodicosis

C = control

x =  $P < 0.001$  (vs. control)

● =  $P < 0.025$  (vs. 2A)

was significantly lower in comparison with the group C (Fig. 1). In four dogs from group 3 ( $n = 8$ , Tab. I) of dogs with GD, demodicosis was complicated with superficial pyoderma. When these dogs (group GD + SP, disease lasting on average  $10.5 \pm 1.7$  weeks) were compared to four dogs with uncomplicated GD (group GD, disease lasting on average  $10.5 \pm 4.4$  weeks) no significant difference was found in lymphocyte blastogenesis. However, lower IPA ( $P < 0.05$ ) and PA ( $P > 0.05$ ) values were observed. All parameters investigated in GD + SP and GD groups were significantly lower in comparison with the control dogs (Tab. III).

## DISCUSSION

The results reported in this paper demonstrate the degree of phagocytic ability of blood neutrophils in the dogs with different duration of uncomplicated LD and GD with regard to lymphocyte blastogenesis, in comparison with those in the clinically healthy dogs and the dogs with demodicosis complicated with pyoderma.

Significant depression of the PA and IPA values was observed only in the GD dogs with the duration of clinical disease exceeding 5 weeks. Neutrophil dysfunctions in the dogs with chronic demodicosis complicated with bacterial infection with regard to random and chemotactic movement were described previously (Latimer et al., 1983). One report demonstrated that GD is accompanied by depression of the IPA values, bactericidal capacity and chemotaxis in the polymorphonuclear granulocytes (Schmitt et al., 1994). The authors did not mention whether chronic demodicosis was or was not complicated with bacterial infection. Nevertheless, our findings contribute to the as yet limited knowledge about the degree of phagocytic ability in the dogs with uncomplicated LD, and that in the dogs with uncomplicated LD is also described.

In inflammatory skin disease, neutrophils play a crucial role in the defense mechanism against pathogenic bacteria (Muller et al., 1989). Defective chemotaxis or phagocytosis in the neutrophils is an important cause of increased susceptibility to opportunistic pathogens (Rotrosen and Gallin, 1987). In fifty percent of the GD dogs which manifested skin lesions over 5 weeks, demodicosis was complicated with superficial pyoderma. Neutrophils from these dogs exhibited significantly lower ingestion capacity and insignificant change in the phagocytic activity, in contrast to the dogs with uncomplicated GD (Tab. III). It is possible to conclude that superficial pyoderma complicated demodicosis occurs when the neutrophil function falls below a certain limit or that secondary bacterial infection causes augmentation of demodicosis initiated depression of phagocytic ability of neutrophils. Neutrophil dysfunctions have also been described in pyoderma affected dogs (Latimer et al., 1982, 1983; Couto et al., 1989; Toman et al., 1995). Further studies are necessary to elucidate this relation. The exact pathomechanism of phagocytic deficit of neutrophils in the GD dogs is not known. The inhibition of chemotaxis of control neutrophils after the incubation in demodectic dog serum gives putative evidence of the presence of serum inhibitor or deactivator in neutrophilic chemotaxis. The inhibiting substance was not characterized (Latimer et al., 1983). There is no indication that the depression of phagocytic ability observed in the present study (group 2 of GD dogs; Tab. II) was associated with suppression of lymphocyte

III. Functional ability of blood neutrophils and lymphocytes in dogs with GD and GD complicated with superficial pyoderma

Groups of dogs	Parameters		
	PA (%)	IPA	SI
GD (over 5 weeks)	$43.4 \pm 13.1^{xx}$	$3.9 \pm 0.7^x$	$1.4 \pm 0.2^{xxx}$
GD + SP (over 5 weeks)	$31.4 \pm 6.7^{xxx}$	$2.2 \pm 0.8^{xx,a}$	$1.4 \pm 0.5^{xxx}$
Control	$59.2 \pm 8.4$	$7.2 \pm 2.8$	$7.8 \pm 1.8$

GD, GD + SP and PA, IPA, SI - see Tab. I and II

x =  $P < 0.05$

xx =  $P < 0.025$

xxx =  $P < 0.001$  (vs. control)

a =  $P < 0.05$  (vs. IPA in GD)

blastogenesis, because blastogenesis was significantly suppressed also in other groups of dogs with uncomplicated GD and LD. Prolonged exposure of neutrophils to high concentrations of inflammatory mediators could result in generalized deactivation of all cellular functions due to receptor down-regulation (Donabedian and Gallis, 1981). In our study depression of phagocytic ability of neutrophils has been demonstrated in dogs suffering from GD, but not in LD dogs. Neutrophil dysfunction was a secondary phenomenon with respect to the disease process and it depended on the duration of clinical signs. Thus, the presence of staphylococcal infection may be related to the neutrophil alteration, which may be induced by mediators of the severe inflammatory process that accompanied longer durative GD.

Initial studies showed that GD is associated with serum substance (s) – induced T-cell suppression (Scott et al., 1974, 1976; Hirsh et al., 1975; Corbett et al., 1975 and others). It was demonstrated that the dogs with LD and early GD did not exhibit any T-cell suppression (Scott et al., 1976) and the relationship between the lymphocyte response to mitogens and the clinical state of GD was indicated (Scott et al., 1976; Krawiec and Gaafar, 1980). Our results demonstrate that the lymphocyte blastogenesis suppression to Con A was associated not only with GD, but also with LD and that this immunosuppression developed with the duration of clinical disease in both forms of demodicosis. These findings confirmed the results of recent reports in this respect (Barriga et al., 1992; Paulik et al., 1996c). Generalized demodicosis is often associated with secondary pyoderma. There is an indication that the lymphocyte blastogenesis suppression in demodicosis is due to the secondary bacterial infection and is absent in dogs with uncomplicated demodicosis (Barta et al., 1983; Toman et al., 1995). In contrast, in our study lymphocytes from dogs with uncomplicated and complicated GD responded to Con A equally but showed significantly depressed responses to mitogen as compared with the control dogs (Tab. III). In addition, lymphocytes from dogs with bacterial pyoderma had a normal response to Con A (Barriga et al., 1992; Toman et al., 1995), whereas the dogs with uncomplicated GD responded poorly (Barriga et al., 1992). Therefore, we cannot assume that the immunosuppression in the superficial pyoderma complicated GD dogs was due to the secondary bacterial infection. In conclusion, both lymphocyte blastogenesis suppression and depression of phagocytic ability of neutrophils could predispose to the development of secondary pyoderma, a common sequela to generalized demodicosis.

## REFERENCES

- Barriga O. O., Al-Khalidi N. W., Martin S., Wyman M. (1992): Evidence of immunosuppression by *Demodex canis*. *Vet. Immunol. Immunopath.*, 32, 37–46.
- Barta O., Oyekan P. P. (1981): Lymphocyte transformation test in veterinary clinical immunology. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 4, 209–221.
- Barta O. C., Waltman C., Oyekan P. O., McGrath R. K., Hribernik T. N. (1983): Lymphocyte transformation suppression caused by pyoderma-failure to demonstrate it in uncomplicated demodectic mange. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 6, 9–17.
- Corbett R., Banks K., Hinrichs D., Bell T. (1975): Cellular immune responsiveness in dogs with demodectic mange. *Transpl. Proc.*, 7, 557–559.
- Corbett R., Perryman L. E., Gorham J. R., Bell T. (1976): The cell-mediated immune response, its inhibition and *in vitro* reversal in dogs with demodectic mange. *Fed. Proc.*, 35, 589–592.
- Couto C. G., Krakowka G., Johnson P. (1989): *In vitro* immunologic features of Weimaraner dogs with neutrophil abnormalities and recurrent infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 23, 103–112.
- Donabedian H., Gallin, J. I. (1981): Deactivation of human neutrophils by chemoattractants: effect on receptors for the chemotactic factor f-met-leu-phe. *J. Immunol.*, 127, 839–844.
- Duclos D. D., Jeffers J. G., Shanley K. J. (1994): Prognosis for treatment of adult-onset demodicosis in dogs: 34 cases (1979–1990). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 204, 616–619.
- Georgi J. R., Georgi M. E. (1992): *Canine Clinical Parasitology*. Philadelphia, Lea and Febiger (ed.), 51–53.
- Ginel P. J. (1996): Canine demodicosis. *Waltham Focus*, 6, 2–7.
- Healey M. C., Gaafar S. M. (1977): Immunodeficiency in canine demodectic mange. II. Skin reactions to phytohemagglutinin and concanavalin A. *Vet. Parasitol.*, 3, 133–140.
- Hirsh D. C., Baker B. B., Wiger N., Yaskulski S. G., Osburn B. I. (1975): Suppression of *in vitro* lymphocyte transformation by serum from dogs with generalized demodicosis. *Am. J. Vet. Res.*, 36, 1591–1595.
- Kraiss A. (1987): Zur Proliferationsfähigkeit von Lymphozyten demodikosekranker Hunde bei immunzellstimulierende Therapie. *Tierärztl. Prax.*, 15, 63–66.
- Krawiec D. R., Gaafar S. M. (1980): Studies on the immunology of canine demodicosis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 16, 669–676.
- Latimer K. S., Prasse K. W., Dawe D. L. (1982): A transient deficit in neutrophilic chemotaxis in a dog with recurrent staphylococcal pyoderma. *Vet. Pathol.*, 19, 223–229.
- Latimer K. S., Prasse K. S., Mahafey E. A., Dawe D. L., Lorenz M. D., Duncan J. R. (1983): Neutrophil movement in selected canine skin disease. *Am. J. Vet. Res.*, 44, 601–605.
- Lemarie S. L. (1996): Canine demodicosis. *Comp. Contin. Educ. Pract. Vet.*, 18, 354–357, 360–368.
- Muller G. H., Kirk R. W., Scott D. W. (1989): *Small Animal Dermatology*. 4th ed. Philadelphia, W. B. Saunders Co., 382–385, 428–436.
- Paulik Š., Mojžišová J., Bajová V., Paulíková I. (1996a): Demodicosis of dogs and its immunologic aspects. *Veterinářství*, 5, 196–198.
- Paulik Š. J., Mojžišová J., Bajová V., Baranová D., Paulíková I. (1996b): Evaluation of canine lymphocyte blastogenesis

- prior and after *in vitro* suppression by dog demodicosis serum using ethidium bromide fluorescence assay. *Vet. Med. – Czech.*, *41*, 7–12.
- Paulík Š., Mojžišová J., Bajová V., Baranová D., Paulíková I. (1996c): Lymphocyte blastogenesis to concanavalin A in dogs with localized demodicosis according to duration of clinical disease. *Vet. Med. – Czech.*, *41*, 245–249.
- Procházková A. (1979): Separation of lymphocytes by means of verografin. *Immunol. Zprav.*, *2*, 17–19.
- Rotrosen D., Gallin J. I. (1987): Disorders of phagocyte function. *Ann. Rev. Immunol.*, *5*, 127–150.
- Scott D. W., Farrow B. R. H., Schultz R. D. (1974): Studies on the therapeutic and immunologic aspects of generalized demodectic mange in the dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, *10*, 233–244.
- Scott D. W., Schultz R. D., Baker E. (1976): Further studies on the therapeutic and immunologic aspects of generalized demodectic mange in the dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, *12*, 203–213.
- Schmitt M., Esslinger J., Seeger K., Blobel H. (1994): IgA – Defizienz und verminderte Infektabwehr bei Hunden mit chronischen Dermatitiden. *Mh. Vet.-Med.*, *49*, 285–287.
- Sischo W. M., Ihrke P. J., Franti C. E. (1989): Regional distribution of ten common skin diseases in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, *195*, 752–756.
- Toman M., Rybníček J., Svoboda M., Krejčí J. (1995): Secondary immunodeficiency or immunosuppression in dogs. In: Fourth International Veterinary Immunology Symposium, Davis, 167.
- Toman M., Svoboda M., Rybníček J., Svobodová V., Krejčí J. (1996): The occurrence of immunodeficiencies in dogs and possibilities of their diagnostics. *Veterinářství*, *7*, 288–291.
- Větvíčka V., Fornusek I., Kopeček J., Kamínková J., Kašpárek I., Vránová M. (1982): Phagocytosis of human blood leukocytes a simple micromethod. *Immunol. Lett.*, *5*, 97–100.
- Wilkie B. N., Markham R. J. F., Halzlett C. (1979): Deficient cutaneous response to PHA-P in healthy puppies from a kennel with a high prevalence of demodicosis. *Can. J. Comp. Med.*, *43*, 415–419.

Received: 98-04-01

Accepted after corrections: 98-10-09

---

**Contact Address:**

MVDr. Jana Mojžišová, PhD., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika  
Tel. +421 95 633 21 11-15, fax +421 95 76 76 75, e-mail: mojzisova@uvm.sk

---

# IDENTIFICATION OF STRAINS OF *CITROBACTER* GENOMOSPECIES 10 ISOLATED FROM WELL WATER

## IDENTIFIKACE KMENŮ *CITROBACTER* GENOMOSPECIES 10 IZOLOVANÝCH ZE STUDNIČNÍ VODY

Z. Páčová, E. Urbanová, P. Benda

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

**ABSTRACT:** Twenty one strains (54%) of *Citrobacter* genomospecies 10 were identified from 39 strains of citrobacteria isolated from well water in the region of North Moravia during one year. Two strains of genomospecies 10 isolated from raw milk and milking machines (Urbanová and Páčová, 1997) were added to the collection of 21 strains and so the total of 23 strains were studied. It is probable that the origin of the strains from milk sources is water, too. The strains were identified using the commercial kit ENTEROtest 16 (Lachema, a.s., Brno) including OXItest and ONPtest supplemented with the following tests: arginine dihydrolase, sodium acetate, melibiose, raffinose, dulcitol, alpha-methyl-D-glucoside. The current database of numerical identification system TNW (Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University, Brno) does not contain any reference data for identification of genomospecies 10, therefore the result of identification – *Citrobacter werkmanii* – was incorrect (Tab. II). Both *C. werkmanii* and genomospecies 10 are ornithine and indolles negative, malonate positive. The two characteristics useful for their differentiation are inability of genomospecies 10 to hydrolyze urea and inability to utilize sodium citrate as a sole carbon source. Some minor differences between the biochemical results reported in Tab. I and those reported for the three strains of genomospecies 10 by Brenner et al. (1993) and O'Hara et al. (1995) are as follows: 96% (previously 67%) H<sub>2</sub>S positive, 4% (previously 0%) esculin positive, 74% (previously 100%) delayed Simmons citrate positive, 100% (previously 67%) melibiose and cellobiose positive, 0% (previously 100%) delayed arginine dihydrolase positive. It is probable that genomospecies 10 is one of the citrobacteria most frequently isolated from well water which were previously identified as *Citrobacter freundii*. Four representative strains of this genomospecies were kindly reidentified by O'Hara in CDC Atlanta, U.S.A. These strains have been deposited in our Collection as *Citrobacter* sp. (genomospecies 10): CCM 4513 (= CDC 4562-98, milking machine), CCM 4514 (= CDC 4563-98, raw milk), CCM 4515 and CCM 4711 (= CDC 4564-98 and CDC 4565-98, well water).

*Citrobacter* genomospecies 10; identification; well water

**ABSTRAKT:** Bylo testováno 23 kmenů citrobakterů genomospecies 10 izolovaných ze studniční vody (21 kmenů), ze syrového mléka a stěru z mléčnice (dva kmeny) za použití komerčního diagnostického setu ENTEROtest 16, OXItestu a ONPtestu (Lachema, a.s., Brno) a šesti konvenčních testů: arginin dihydroláza, využívání octanu sodného, oxyselování melibiózy, rafinózy, dulcitolu a alfa-methyl-D-glukosidu. Identifikace byla provedena pomocí tabulek dle autorů Brenner aj. (1993) a O'Hara aj. (1995), resp. dle dichotomického klíče (O'Hara, 1995) a numerického identifikačního programu TNW (Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova univerzita, Brno). Zatímco při použití diferenciačního klíče a tabulek byla identifikace genomospecies 10 správná, TNW programem byla zcela neúspěšná, protože současná databáze systému nezahrnuje údaje o tomto genomospecies. Proto bylo nesprávně určeno 22 kmenů (96 %) jako *Citrobacter werkmanii* na úrovni velmi dobré (61 %) až rodové identifikace (35%). Jeden kmen (4 %) byl určen jako *Enterobacter cancerogenus*. Pro rychlou, předběžnou identifikaci genomospecies 10 lze doporučit identifikační klíč dle O'Hara aj. (1995). K odlišení *Citrobacter* genomospecies 10 od *C. werkmanii* doporučujeme především ureázu a využívání octanu sodného (oba testy jsou pozitivní u *C. werkmanii* a negativní u genomospecies 10).

*Citrobacter* genomospecies 10; identifikace; studniční voda

### ÚVOD

Rod *Citrobacter* byl reklasifikován na základě DNA hybridizace Brennerem aj. (1993) do osmi druhů (*C. freundii*, *C. koseri*, *C. amalonaticus*, *C. farmeri*, *C. youngae*, *C. braakii*, *C. werkmanii*, *C. sedlakii*) a tří nepo-

jmenovaných genomospecies (9, 10, 11). Schauer aj. (1995) pojmenovali genomospecies 9 jako *C. rodentium*, genomospecies 10 a 11 zůstávají dále nepojmenována.

V současné době vzrůstá počet izolací citrobakterů z klinického materiálu. Druhy *C. freundii*, *C. koseri*, *C. amalonaticus*, *C. braakii* a *C. youngae* se podílí přede-

vším na infekcích močového a respiračního traktu (Ramaní aj., 1988; Janda aj., 1994) a proto je jim v humaní klinické mikrobiologii věnována patřičná pozornost. Málo informací je o výskytu citrobakterů v potravinách, popř. ve vodách, kde jejich výskyt může být následně příčinou například enterokolitid, alimentárních nebo nosokomiálních infekcí (Thurm a Gericke, 1994). Proto jsme se pokusili o zmapování výskytu citrobakterů v potravinách (Urbanová a Páčová, 1997) a ve vodách (nepublikováno).

Během testování 39 kmenů citrobakterů izolovaných z individuálních zdrojů pitné vody (studny) na severní Moravě (okres Šumperk), bylo 21 kmenů identifikováno jako *Citrobacter* genomospecies 10. K tomuto souboru byly přidány dva kmene téhož genomospecies, izolované ze syrového mléka a stěru z mléčnice (Urbanová a Páčová, 1997). Protože jde pravděpodobně o první ucelenou skupinu tohoto genomospecies izolovanou v České republice, je cílem této práce publikovat výsledky jejich identifikace pomocí komerčního diagnostického setu ENTEROtest 16 (Lachema, a.s., Brno), dodatkových konvenčních testů, identifikačních tabulek dle autorů Brenner aj. (1993), O'Hara aj. (1995) a identifikačního programu TNW (Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova univerzita, Brno) a upozornit na možnost izolace genomospecies 10 z vodních zdrojů.

## MATERIÁL A METODY

### Kmeny

Bylo testováno celkem 23 kmenů, z toho 21 kmenů bylo izolováno standardními vyšetřovacími metodami pro kontrolu zdrojů pitných vod ze studniční vody, ze syrového mléka byl izolován jeden kmen a ze stěru z mléčnice rovněž jeden kmen. Čtyři kmene z tohoto souboru byly zařazeny do České sbírky mikroorganismů, Brno (CCM) pod číslu: CCM 4513 (= CDC 4562-98, stěr z mléčnice), CCM 4514 (= CDC 4563-98, syrové mléko), CCM 4515 a CCM 4711 (= CDC 4564-98 a CDC 4565-98, studniční voda). CDC = Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA.

### Biochemické reakce

Byly provedeny komerčním diagnostickým setem ENTEROtest 16 (tvorba sirovodíku a indolu, dekarboxylace lyzinu a ornitinu, deaminace fenylyalaninu, hydrolýza eskulinu, ureáza, využívání Simmons citrátu a malonátu, okyselení inositolu, adonitolu, celobiózy, sacharózy, sorbitolu, trehalózy, manitolu), včetně OXItestu a ONPtestu (Lachema a. s., Brno). Doplněny byly šesti konvenčními testy: okyselení dulcitolu, alfa-methyl-D-glukosidu, rařinózy a melibiózy (Hugh a Leifson, 1953), arginin dihydroláza (Brooks a Sode-man, 1974) a využívání octanu sodného (Trabulsi a Ewing, 1962).

### Identifikace

Identifikace byla provedena pomocí diferenčních tabulek (Brenner aj., 1993; O'Hara aj., 1995), dichotomického identifikačního klíče (O'Hara aj., 1995) a programem TNW (Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova univerzita, Brno).

## VÝSLEDKY

### Biochemická charakteristika

Výsledky biochemických reakcí, které jsou uvedeny v tab. I, jsou většinou v souladu s biochemickými profily uvedenými v literárních citacích (Brenner aj., 1993; O'Hara aj., 1995). Pouze u sirovodíku, melibiózy, celobiózy a eskulinu jsme obdrželi vyšší procento pozitivních výsledků, naopak u sacharózy, argininu a Simmons citrátu jsme obdrželi méně pozitivních výsledků nebo i výsledek negativní.

### Identifikace

Vzhledem k tomu, že biochemické reakce korespondují s popisy genomospecies 10 (Brenner aj., 1993; O'Hara aj., 1995) byla identifikace dle tabulek a identifikačního klíče téměř bezproblémová. Nesprávná identifikace u všech testovaných kmenů byla pomocí TNW programu (tab. II). Většina kmenů (22) byla určena jako *Citrobacter werkmanii* – velmi dobrá, případně rodová identifikace.

## DISKUSE

I když se po popisu nových druhů citrobakterů objevilo několik prací, týkajících se jejich zastoupení v klinickém materiálu, popř. v potravinách (Janda aj., 1994; Thurn a Gericke, 1994; Wauters aj., 1995), genomospecies 10 nebylo v souboru testovaných kmenů nikdy identifikováno. V roce 1997 Urbanová a Páčová při identifikaci citrobakterů ze surovin a potravin izolovaly dva kmene, které byly určeny jako *Citrobacter* genomospecies 10. Zatímco Brenner aj. (1993) popsali toto genomospecies na základě tří kmenů (dva z klinického materiálu a jeden z potravin), podařilo se nám izolovat a identifikovat homogenní skupinu 23 kmenů tohoto genomospecies.

Testované kmene byly identifikovány pomocí ENTEROtestu 16 a šesti dodatkových testů, identifikačních tabulek a dichotomického identifikačního klíče (Brenner aj., 1993; O'Hara aj., 1995). Dodatkové testy byly vybrány tak, aby vykazovaly vysokou diskriminační schopnost při identifikaci nových druhů citrobakterů. Dosahené výsledky (tab. I) jsou většinou v souladu s literárními údaji (Brenner aj., 1993; O'Hara aj., 1995). Genomospecies 10 tvoří poměrně homogenní skupinu, ornitin a indol negativní. Stejně jako *C. werk-*

I. Srovnání výsledků biochemických reakcí *Citrobacter* genomspesies 10 s literárními údaji (Brenner et al., 1993; O'Hara aj., 1995) – Comparison of the results of biochemical reactions of *Citrobacter* genomspesies 10 with literary data (Brenner et al., 1993; O'Hara et al., 1995)

Test <sup>1</sup>	Naše výsledky (23 kmenů) <sup>2</sup>	Brenner et al. (1993) a O'Hara et al. (1995) (3 kmene) <sup>3</sup>
ENTEROtest 16		
sirovodík – hydrogen sulfide	96*	67
lysin – lysine	0	0
indol – indole	0	0
ornitin – ornithine	0	0
ureáza – urease	0 (0)**	0
fenylalanin – phenylalanine	0	0
eskulin – esculin	4	0
Simmons citrát – Simmons citrate	43 (74)**	33 (100)**
malonát – malonate	100	100
inozitol – inositol	0	0
adonitol – adonitol	0	0
celobióza – cellobiose	100	67
sacharóza – saccharose	0	33
sorbitol – sorbitol	100	100
trehalóza – trehalose	100	100
manitol – mannitol	100	100
OXItest	0	0
ONPtest	100	67 (100)**
Konvenční testy – conventional tests		
arginin dihydroláza – arginine dihydrolase	0	33 (100)**
octan sodný – sodium acetate	0	0
melibióza – melibiose	100	67
rafinóza – raffinose	0	0
dulcitol – dulcitol	0	0
α-methyl-D-glukosid – alpha-methyl-D-glucoside	0	0

\* = procento pozitivních reakcí – positive reaction percentage

()\*\* = opožděná reakce u konvenčních testů (5 až 7 dnů kultivace) – delayed reaction in conventional tests (5–7 days of cultivation)

<sup>1</sup>test, <sup>2</sup>our results (23 strains), <sup>3</sup>Brenner et al. (1993) and O'Hara et al. (1995) (3 strains)

II. Identifikace 23 kmenů *Citrobacter* genomspesies 10 programem TNW – Identification of 23 strains of *Citrobacter* genomspesies 10 by TNW program

Počet kmenů <sup>1</sup>	Identifikováno jako <sup>2</sup>	Slovní vyjádření <sup>3</sup>
14	<i>Citrobacter werkmanii</i>	velmi dobrá identifikace <sup>4</sup>
8	<i>Citrobacter werkmanii</i>	rodová identifikace <sup>5</sup>
1	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	intermediární kmen <sup>6</sup>

<sup>1</sup>strain number, <sup>2</sup>identified as, <sup>3</sup>verbal description, <sup>4</sup>very good identification, <sup>5</sup>generic identification, <sup>6</sup>intermediary strain

*manii* je malonát pozitivní, na rozdíl od tohoto druhu však genomspesies 10 nehydrolyzuje ureu a nevyužívá octan sodný. Z doplňujících testů lze pro odlišení *C. werkmanii* od genomspesies 10 dále použít i melibiózu a celobiózu (*C. werkmanii* negativní, genomspesie-

es 10 pozitivní v 67 %) a arginin (*C. werkmanii* pozitivní ve 100 %, genomspesies 10 v 33 %). Naše výsledky vzhledem k literárním údajům (Brenner aj., 1993; O'Hara aj., 1995) potvrzují opožděnou reakci u Simmonsova citrátu, kdy v ENTEROtestu 16 bylo za 24 h pozitivních 43 %, zatímco do tří dnů konvenční metodou 74 % kmenů. Brenner aj. (1993) uvádějí u tohoto testu 100 % pozitivních kmenů do sedmi dnů. U žádného kmene jsme nezachytili hydrolyzu argininu, zatímco Brenner aj. (1993) uvádějí až 100 pozitivních výsledků. Tito autoři však použili klasickou Moellerovu metodu, hodnocenou do sedmi dnů, zatímco námi použitý mikrotest (Brooks and Sodeman, 1974) se hodnotí za 6 h, orientačně za 24 h. Žádný z našich kmenů neokyseloval do 24 h v ENTEROtestu 16 sacharózu (Brenner aj., 1993, uvádějí 33 %), naopak 100 % našich kmenů na rozdíl od literárních údajů okyselovalo melibiózu a celobiózu (tab. I).

Identifikace genom-species 10 pomocí TNW programu byla neúspěšná, jelikož v databázi tohoto systému není genom-species 10 a 11 zatím zařazeno. Při nesprávné identifikaci se nejčastěji objevil nejbližší biochemicky příbuzný druh *C. werkmanii* a to v 61 % jako velmi dobrá identifikace a v 35 % jako rodová identifikace. K ověření správnosti naší identifikace genom-species 10 jsme čtyři kmeny zaslali do CDC, Atlanta, kteří identifikaci potvrdili. Tyto čtyři kmeny byly zařazeny do České sbírky mikroorganismů, Brno (viz materiál a metody) a jsou mikrobiologické veřejnosti k dispozici jako srovnávací materiál.

Z vysokého počtu námi izolovaných kmenů ze studničních vod vyplývá, že přirozeným prostředím *Citrobacter* genom-species 10 je pravděpodobně voda. Pracovníci hygienických laboratoří se tak mohou s tímto citrobakterem, jehož klinický význam není zatím zcela jasný, setkat při rozbořech pitných vod, zejména z individuálních zdrojů. V zemědělské prvovýrobě a ve zpracovatelském potravinářském průmyslu lze předpokládat výskyt těchto kmenů zejména u menších provozů, které využívají individuální zdroje pitné vody k čištění a oplachování technologických zařízení nebo k chlazení surovin, resp. jatečného masa a drůbeže.

#### Poděkování

Autoři děkují Dr. O'Hara z CDC v Atlantě za laskavou reidentifikaci čtyř kmenů *Citrobacter* genom-species 10.

#### LITERATURA

Brenner D. J., Grimont P. A. D., Steigerwalt A. G., Fanning G. R., Ageron E., Riddle C. F. (1993): Classification of citrobacteria by DNA hybridization: Designation of *Citrobacter farmeri* sp. nov., *Citrobacter youngae* sp. nov., *Citrobacter braakii* sp. nov., *Citrobacter werkmanii* sp.

- nov., *Citrobacter sedlakii* sp. nov., and three unnamed *Citrobacter* genom-species. Int. J. Syst. Bact., 43, 645–658.
- Brooks K., Sodeman T. (1974): A rapid method for determining decarboxylase and dihydrolase activity. J. Clin. Pathol., 27, 148–152.
- Hugh R., Leifson E. (1953): The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. J. Bact., 66, 24–26.
- Janda J. M., Abbott S. L., Cheung W. K. W., Hanson D. F. (1994): Biochemical identification of citrobacteria in the clinical laboratory. J. Clin. Microbiol., 32, 1850–1854.
- O'Hara C. M., Roman S. B., Miller J. M. (1995): Ability of commercial identification systems to identify newly recognised species of *Citrobacter*. J. Clin. Microbiol., 33, 242–245.
- Ramani A., Kundaje G. N., Rao M. S., Shivananda P. G. – Ramani R. (1988): *Citrobacter* as frequent urinary pathogen in hospital patients. Indian J. Med. Res., 88, 23–25.
- Schauer D. B., Zabel B. A., Pedraza I. F., O'Hara C. M. – Steigerwalt A. G., Brenner D. J. (1995): Genetics and biochemical characterization of *Citrobacter rodentium* sp. nov. J. Clin. Microbiol., 33, 2064–2068.
- Thurm V., Gericke B. (1994): Identification of infant food as a vehicle in a nosocomial outbreak of *Citrobacter freundii*: Epidemiological subtyping by allozyme, whole-cell protein and antibiotic resistance. J. Appl. Bact., 76, 553–558.
- Trabulsi L. R., Ewing W. H. (1962): Sodium acetate medium for the differentiation of *Shigella* and *Escherichia* cultures. Public Health Lab., 20, 137–140.
- Urbanová E., Páčová Z. (1997): Identification of species of the genus *Citrobacter* and their presence in raw materials and foods. Vet. Med. – Czech, 42, 87–91.
- Wauters G., Boel A., Voorn G. P., Verhaegen J., Meunier F., Janssens M., Verbist L. (1995): Evaluation of a new identification system, Crystal Enteric/Non-Fermenter, for Gram-negative bacilli. J. Clin. Microbiol., 33, 845–849.

Received: 98–08–27  
Accepted: 98–09–24

#### Kontaktní adresa:

RNDr. Zdena Páčová, Česká sbírka mikroorganismů, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Tvrdého 14, 602 00 Brno, Česká republika  
Tel. +421 5 43 24 72 31, fax +421 5 43 24 73 39, e-mail: zdena@sci.muni.cz

## POKYNY PRO AUTORY

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

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

O uveřejnění práce rozhoduje redakční rada časopisu, a to se zřetelem k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu a kvalitě práce. Redakce přijímá práce 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 zkratk nepoužívat.

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

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

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

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

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

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

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

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

**Klíčová slova** mají umožnit vyladění 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.

Úplné znění pokynů pro autory s dodatky najdete na URL adrese <http://www.clark.cz/vri/Pokyny.htm>

For full text of instruction for authors see <http://www.clark.cz/vri/Pokynya.htm>

## 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 44, No. 1, January 1999

## CONTENTS

Reiterová K., Dubinský P., Klímenko V. V., Tomašovičová O., Dvorožňáková E.: Comparison of <i>Trichinella spiralis</i> larva antigens for the detection of specific antibodies in pigs .....	1
Faixová Z., Faix Š., Várady J.: The passage of amino acids through the rumen epithelium in lamb and adult sheep <i>in vitro</i> .....	7
Faldyna M., Trnková P.: Immunological parameters in dogs with <i>juvenile panostitis</i> (in English).....	13
Mojžišová J., Paulík Š., Baranová D.: Impairment of neutrophil and lymphocyte functions in dogs with uncomplicated and pyoderma complicated demodicosis (in English) .....	19
Páčová Z., Urbanová E., Benda P.: Identification of strains of <i>Citrobacter</i> genomspecies 10 isolated from well water .....	25
INFORMATION	
Hruška K.: Information for authors contributing to Veterinary Medicine .....	6
Hruška K.: Centaur Newsletter Flash Information (in English).....	12
Hruška K.: Papers from abroad are welcome (in English).....	12

# VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

---

Ročník 44, č. 1, Leden 1999

## OBSAH

Reiterová K., Dubinský P., Klímenko V. V., Tomašovičová O., Dvorožňáková E.: Porovnanie antigénov lariev <i>Trichinella spiralis</i> pre detekciu špecifických protilátok u ošípaných.....	1
Faixová Z., Faix Š., Várady J.: Prestup aminokyselín cez bachorový epitel jahniat a dospelých oviec <i>in vitro</i> .....	7
Faldyna M., Trnková P.: Imunologické parametry u psů s juvenilní panostitidou.....	13
Mojžišová J., Paulík Š., Baranová D.: Poškodenie funkcie neutrofilov a lymfoeytov u psov s nekomplikovanou demodikózou a demodikózou komplikovanou s pyodermou .....	19
Páčová Z., Urbanová E., Benda P.: Identifikace kmenů <i>Citrobacter</i> genomspecies 10 izolovaných ze studniční vody.....	25
INFORMACE	
Hruška K.: Informace pro autory časopisu Veterinární medicína.....	6
Hruška K.: Centaur Newsletter Flash Information .....	12
Hruška K.: Vítáme příspěvky ze zahraničí .....	12