

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

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

22. dubna 1999

2

VOLUME 44
PRAHA
FEBRUARY 1999
ISSN 0375-8427

25/1999

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

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

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

Jílové u Prahy, Czech Republic

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

Editor-in-Chief – Vedoucí redaktorka

Ing. Zdeňka Radošová

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

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

Časopis je citován v bibliografickém časopise Current Contents – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, a abstrakty z časopisu jsou zahrnuty v těchto databázích: 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, vydavatelství 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).

ALPHA-TOCOPHEROL AND HEPATIC PARAMETERS IN DAIRY COWS WITH LIVER FAILURE*

ALFA-TOKOFEROL A HEPATÁLNE UKAZOVATELE U DOJNÍC S HEPATÁLNOU INSUFICIENCIOU

P. Mudroň¹, J. Rehage², C. Meier², H. Scholz², G. Kováč¹

¹ *Clinic for the Internal Diseases of Ruminants and Swine, Veterinary University, Košice, Slovak Republic*

² *Clinic for the Diseases of Cattle, Veterinary School, Hannover, Germany*

ABSTRACT: Dairy cows with liver failure were studied to gain information about plasma concentrations of α -tocopherol; forty-five Holstein-Friesian dairy cows with left displacement of abomasum were used in the present study. After surgery the cows were divided into two groups: A – cows with liver failure ($n = 15$) and B – cows without liver failure (controls; $n = 30$). The diagnosis of hepatic failure was based on clinical signs (symptoms of hepatic encephalopathy) and on laboratory analyses of ammonia concentration $> 30 \mu\text{mol/l}$ and of amino acid-index < 4.0 (valine + leucine + isoleucine/tyrosine + phenylalanine). The cows with liver failure did not differ significantly from controls in both liver triglyceride and glycogen contents. Serum levels of total bilirubin, AST, GLDH and GGT were higher ($p < 0.01$) and of cholesterol were lower ($p < 0.01$) in cows with hepatic failure than in controls. There were no significant differences in FFA and BHB mean serum concentrations between the groups. The cows with liver failure were clearly deficient in plasma α -tocopherol levels that were significantly lower ($p < 0.01$) in comparison with the control cows ($0.91 \pm 0.12 \text{ mg/l}$, $1.82 \pm 0.13 \text{ mg/l}$, respectively). We conclude that the clear vitamin E deficiency in dairy cows suffering from hepatic failure could increase the risk of uncontrolled lipid peroxidative processes in the liver and thus lead to severe tissue damage.

α -tocopherol; liver failure; hepatic encephalopathy; dairy cows

ABSTRAKT: U dojníc s hepatálnou insuficienciou sme v plazme študovali hladiny α -tokoferolu. Do sledovania bolo zahrnutých 45 dojníc holštejsko-frízskeho plemena, ktoré boli na kliniku prijaté za účelom terapie ľavostrannej dislokácie slezu. Niekoľko dní po chirurgickom zákroku boli zvieratá rozdelené do dvoch skupín: A – dojnice s hepatálnou insuficienciou ($n = 15$) a B – kontrolné zvieratá ($n = 30$). Diagnostika pečenevého zlyhania sa zakladala na prítomnosti klinických zmien (symptómy hepatálnej encefalopátie), na výsledkoch laboratórnych analýz amoniaku v krvi ($>30 \mu\text{mol/l}$) a na zmenách v pomere aminokyselín (valín + leucín + izoleucín/tyrozín + fenylalanín < 4). Medzi skupinami neboli zistené významné rozdiely v obsahu triglyceridov a glykogénu v pečeni. Aktivity enzýmov AST, GLDH a GGT ako aj hladiny celkového bilirubínu boli vyššie ($p < 0,05$) u dojníc s pečenevým zlyhaním. Naopak, koncentrácia cholesterolu bola v tejto skupine významne nižšia ($p < 0,05$). Nezaznamenali sme významné rozdiely medzi skupinami v hladinách neesterifikovaných mastných kyselín a kyseliny beta-hydroxymaslovej. Dojnice s pečenevým zlyhaním mali výrazný deficit vitamínu E v plazme, pričom jeho hladiny boli v tejto skupine významne nižšie ($p < 0,05$) ako u kontrolných zvierat ($0,91 \pm 0,12 \text{ mg/l}$, resp. $1,82 \pm 0,13 \text{ mg/l}$). Záverom možno konštatovať, že výrazný nedostatok vitamínu E zistený u dojníc postihnutých hepatálnou insuficienciou môže zvyšovať riziko vzniku nekontrolovateľných lipoperoxidačných procesov v pečeni a tým zvyšovať nebezpečenstvo ťažkého poškodenia pečenevého tkaniva.

vitamín E; hepatálna insuficiencia; hepatálna encefalopátia; dojnice

INTRODUCTION

Fatty liver is supposed to be the most frequent cause of hepatic failure in dairy cows. An imbalance between nutritional energy intake and energy output in milk after calving triggers an excessive lipomobilisation.

When the rate of hepatic fatty acid esterification exceeds the capacity of the liver to secrete the re-established triglycerides, an accumulation of fat may occur in the liver (Grummer, 1993; Van Den Top et al., 1995). However, it has been shown that the development of hepatic failure does not exclusively depend on the rate

* In honour of Prof. Dr. Slanina's seventieth birthday.

of simple hepatic triglyceride accumulation (Scholz et al., 1992; Meier, 1992). There is a concern that an increasing hepatic uptake of free fatty acids can be associated with an acceleration of lipid peroxidation in liver tissue leading to cell death (Sevanian and Hochstein, 1985). Micronutrients with antioxidative effects like selenium, tocopherol, β -carotene, and antioxidative enzymes including glutathion peroxidase, catalase, and superoxide dismutase play a protective role against peroxidative processes in tissues. Peroxidative tissue damage can be accelerated when the supply of antioxidants is not sufficient. Vitamin E has been recognised as an essential antioxidant, neutralising free radicals before lipid oxidation develops among highly unsaturated fatty acids in cellular and subcellular membranes (Machlin, 1991). Hidiroglou and Hartin (1982) have demonstrated very low α -tocopherol concentrations in the plasma of dairy cows with fat cow syndrome. Recently, it was shown that the cows with increased liver triglyceride had low plasma α -tocopherol levels, increased malonaldehyde production in the liver, and limited uptake capability for dietary tocopherol (Mudroň et al., 1997).

The objective of the study was to gain information about plasma concentrations of α -tocopherol in dairy cows suffering from liver failure.

MATERIAL AND METHODS

Forty-five Holstein-Friesian dairy cows with left displacement of the abomasum (LDA), with the mean age of 4.8 years, admitted to the Clinic for the Diseases of Cattle, were used in the present study. Three to five days after successful surgical correction of LDA the cows were divided into two groups:

A – cows with hepatic failure ($n = 15$),

B – cows without hepatic failure (controls, $n = 30$).

The diagnosis of hepatic failure was based on the clinical signs (symptoms of hepatic encephalopathy) and on biochemical analyses of ammonia concentration $> 30 \mu\text{mol/l}$ and amino acid-index < 4.0 (valine + leucine + isoleucine/tyrosine + phenylalanine) measured in venous plasma (Scholz et al., 1992; Meier, 1992).

Blood samples were drawn from the jugular vein once between the 3rd and 5th day after surgery. Plasma concentrations of amino acids (Meier, 1992) and of α -tocopherol (Rammel et al., 1983) were determined by high performance liquid chromatography. Plasma ammonia concentrations (Boehringer, Mannheim, Germany) and serum levels of total bilirubin (Hoffmann La-Roche, Basel, Swiss), aspartate aminotransferase (Hoffmann La-Roche, Basel, Swiss), glutamate dehydrogenase (Boehringer, Mannheim, Germany), γ -glutamyl transferase (Hoffmann La-Roche, Basel, Swiss), cholesterol (Hoffmann La-Roche, Basel, Swiss), free fatty acids (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany), and β -hydroxybutyrate (Sigma Diagnostics, Deisenhofen, Germany) were determined enzymatically with commercially available kits using an automatic analysing

system (COBAS MIRA^R, Hoffman La Roche, D-79630 Grenzach-Wyhlen). At the same time, when blood was collected, liver samples for triglyceride and glycogen content determination were taken by percutaneous needle biopsy (Scholz et al., 1989). The enzymatic method described by Bickhardt et al. (1988) was used for triglyceride and glycogen analyses.

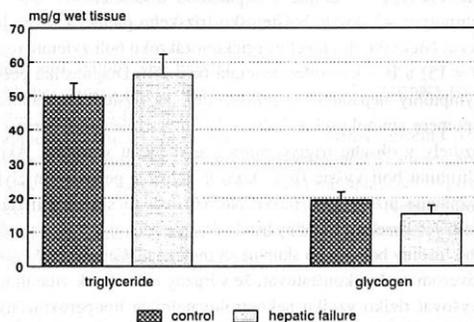
Statistical analysis was carried out by one-way analysis of variance (ANOVA) using the GLM procedure of the Statistical Analysing System (SAS). The group means are presented with a standard error of mean (SEM).

RESULTS

Fig. 1 shows that, on average, cows with liver failure did not differ significantly from controls in liver triglyceride (56.3 ± 6.0 , and $49.5 \pm 4.2 \text{ mg/g}$ wet liver tissue, respectively). Similarly, no significant differences were found between the groups in liver glycogen (15.1 ± 2.6 vs. $19.4 \pm 2.4 \text{ mg/g}$ wet liver tissue, Fig. 1).

Serum levels of total bilirubin, AST, GLDH and GGT were higher ($p < 0.01$) and of cholesterol were lower in cows with hepatic failure than in controls (Tab. I). There were no significant differences in FFA and BHB mean serum concentrations between the groups (Tab. I).

In cows with liver failure mean plasma α -tocopherol levels ($0.9 \pm 0.1 \text{ mg/l}$) were lower ($p < 0.01$) than in the control group ($1.8 \pm 0.1 \text{ mg/l}$, Fig. 2).



1. Liver triglyceride and glycogen contents (mean \pm sem) in cows with and without liver failure

DISCUSSION

Severe damage of liver tissue alters key liver functions like bilirubin conjugation, ammonia and amino acid metabolism and is commonly associated with an increased release of cellular enzymes from hepatocytes as AST, GLDH and GGT into blood (Evans, 1988). The selection of the cows suffering from hepatic failure

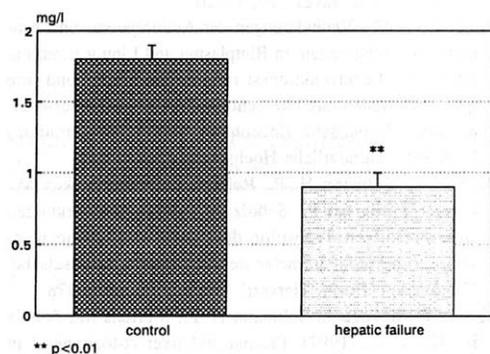
I. Values of amino acid-index (AAI), blood concentrations of NH₃, AST, GLDH, GGT, total bilirubin (TB), cholesterol (chol), NEFA and β-hydroxybutyrate (BHB) in cows with (A) and without (B) hepatic failure (mean ± sem)

Variable		Group A (n = 15)	Group B (n = 30)	Group effect
AAI (#)	(index)	3.4 ± 0.3	6.1 ± 0.4	**
NH ₃ (#)	(μmol/l)	45.8 ± 6.50	19.6 ± 2.21	**
AST	(kat/l)	3.57 ± 0.75	1.65 ± 0.13	**
GLDH	(kat/l)	1.08 ± 0.42	0.45 ± 0.06	**
GGT	(kat/l)	1.08 ± 0.32	0.55 ± 0.05	**
TB	(μmol/l)	32 ± 4.6	13 ± 1.1	**
Chol	(mmol/l)	1.12 ± 0.22	1.63 ± 0.12	**
FFA	(mmol/l)	1.31 ± 0.13	1.07 ± 0.12	n.s.
BHB	(mmol/l)	1.91 ± 0.52	1.23 ± 0.21	n.s.

** = $p < 0.01$

n.s. = not significant

= selection criteria



2. Plasma α-tocopherol levels (mean ± sem) in cows with and without liver failure

was based on clinical signs of hepatic encephalopathy, increased concentrations of ammonia in blood, and on decreased amino acid-index. According to the previous studies (Scholz et al., 1992, Meier, 1992) these criteria are sufficiently sensitive and specific to make a diagnosis of liver failure in dairy cows. Thus, the cows which were ranked as the animals with hepatic failure showed significantly higher serum levels of enzymes and total bilirubin than the control cows. The alteration of liver functions was also demonstrated by the very low levels of serum cholesterol in the cows with liver failure. Ruminants depend on their own cholesterol synthesis, most of which is provided by the liver; small quantities of cholesterol are synthesized in the intestinal mucosa, adrenal glands, and gonads (Karlson, 1980). Thus, serum cholesterol may be used in cows as a parameter reflecting the synthesizing liver functions (Reid et al., 1983; Uhlig et al., 1988). No differences between the groups in FFA and BHB serum levels were probably due to the similar pre-examination history of the experimental animals. All the cows used in the present study were within the periparturient period, which is

commonly associated with negative energy balance, and additionally were stressed by abomasal displacement and by consequent surgical treatment. Both later events can promote mobilisation of adipose tissue resulting in increased blood concentrations of free fatty acids (Mudroň et al., 1994). FFA are taken up by the liver and are oxidised into ketone bodies (Gerloff et al., 1986). Both FFA and BHB serum levels were, in both groups, above the physiological values accepted for dairy cows (Scholz, 1990).

Dairy cows suffering from abomasal displacement have a high incidence of fatty liver. Muylle et al. (1990) reported that 64 percent of the cows with left displacement of abomasum had increased liver triglycerides. An even higher incidence of fatty liver in cows suffering from left abomasal displacement was reported by Holtenius and Niskanen (1985). All the cows included in their study had elevated triglyceride contents in the liver. The mean values of triglyceride liver content found in both groups of the present study were clearly below 100 mg/g wet liver tissue, i.e. the cows were not suffering from a severe degree of fat accumulation (Gaal et al., 1983). No significant differences in mean hepatic triglyceride and glycogen contents between the groups show that high fat accumulation and glycogen depletion in the liver are not the only risk factors in the development of liver failure in dairy cows.

The measurement of α-tocopherol concentrations in plasma or serum is regarded as a satisfactory method for assessing vitamin E status in dairy cows (Herd and Stowe, 1991; Njeru et al., 1994). Values below a marginal band of 1.0–1.5 mg/l are regarded as deficient for ruminants (Pehrson and Hakkarainen, 1986; Herdt and Stowe, 1991). Mean levels of plasma α-tocopherol found in the cows with hepatic failure in the present study were clearly deficient; α-tocopherol concentrations measured in the control group were moderately low, and were similar to those found in a previous study on dairy cows with the left displacement of the abomasum (Mudroň et al., 1994). The cows examined

in the present study were less than six weeks after parturition, which is the period characterized by lower vitamin E blood levels (Blaxter and Brown, 1952). However, Hidirolglou and Hartin (1982) reported vitamin E plasma levels above 3 mg/l in healthy dairy cows during the first two weeks after calving, whereas cows suffering from fat cow syndrome were deficient in α -tocopherol. It was shown in laboratory animals that insufficient vitamin E supply can lead to hepatocytic cell necrosis (Machado et al., 1971; Parola et al., 1992). Accordingly, our results indicate that vitamin E deficiency could play a certain role in the pathogenesis of hepatic failure in dairy cows with fatty liver. Vitamin E status depends on its dietary intake, intestinal resorption and its transport in the blood. Therefore, even if vitamin E dietary intake is sufficient, its low blood concentrations can occur when vitamin E resorption is altered (Hidirolglou et al., 1992). It was reported that, in contrast to healthy cows, there was no increase in vitamin E serum concentrations in cows with liver disease after oral vitamin E administration, but a considerable rise after parenteral administration (Shendrik, 1986). In humans suffering from severe liver disease intestinal malabsorption of vitamin E was observed due to reduced bile production (Sokol et al., 1993).

In conclusion, we found that dairy cows suffering from hepatic failure were clearly deficient in vitamin E plasma concentrations and thus they could be at a greater risk of uncontrolled lipid peroxidative processes in the liver. However, we cannot decide whether the low plasma vitamin E levels in cows with liver failure are due to inadequate dietary vitamin E supply or to reduced intestinal resorption of vitamin E.

REFERENCES

- Bickhardt K., Neumann M., Steinmann C. (1988): Zur Bestimmung von Metaboliten des Energiestoffwechsels in Leber-Biopsieproben – Ein Beitrag zur Charakterisierung der Schafketose. *J. Vet. Med. A*, 35, 790–799.
- Blaxter K. L., Brown F. (1952): Vitamin E in the nutrition of farm animals. *Nutr. Abst. Rev.*, 22, 1–21.
- Evans R. J. (1988): Hepatobiliary damage and dysfunction. A critical overview. In: Blackmoore D. J. (Hrsg.): *Animal Clinical Biochemistry. The Future*. Cambridge, New York, Cambridge University Press, 117–150.
- Gaal T., Reid I. M., Collins R. A., Roberts C. J., Pike B. V. (1983): Comparison of biochemical and histological methods of estimating fat content of liver of dairy cows. *Res. Vet. Sci.*, 34, 245–248.
- Gerloff B. J., Herd T. H., Emery R. S. (1986): Relationship of hepatic lipidosis to health and performance in dairy cattle. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 188, 845–850.
- Grummer R. R. (1993): Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 76, 3882–3896.
- Herd T. H., Stowe H. D. (1991): Fat-soluble vitamin nutrition for dairy cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 7, 391–415.
- Hidirolglou M., Hartin K. E. (1982): Vitamins A, E and selenium blood levels in the fat cow syndrome. *Can. Vet. J.*, 23, 255–258.
- Hidirolglou N., Cave N., Atwal A. S., Farnworth E. R., McDowell L. R. (1992): Comparative vitamin E requirements and metabolism in livestock. *Ann. Rech. Vet.*, 23, 337–359.
- Holtenius P., Niskanen R. (1985): Leberzellverfettung bei Kühen mit Labmagenverlagerung. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 92, 398–400.
- Karlson P. (1980): *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 11. Aufl. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.
- Machlin L. J.: Vitamin E. In: Machlin L. J. (1991): *Handbook of vitamins*. 2nd ed. New York, Basel, Marcel Dekker, Inc., 99–144.
- Machado E. A., Porta E. A., Hartroft W. S., Hamilton F. (1971): Studies on dietary hepatic necrosis: II. Ultrastructural and enzymatic alteration of the hepatocytic plasma membrane. *Lab. Invest.*, 24, 13–20.
- Meier C. (1992): Veränderungen der Aminosäuren- und Ammoniakkonzentrationen in Blutplasma und Liquor cerebrospinalis bei Leberfunktionsstörung des Rindes und ihre mögliche Bedeutung für zentralnervöse Ausfallserscheinungen („Hepatische Encephalopathie“). [Dissertation.] Hannover, Tierärztliche Hochschule.
- Mudroň P., Sallmann H. P., Rehage J., Höltershinken M., Kováč G., Bartko P., Scholz H. (1994): Auswirkungen einer operativen Reposition der linksseitigen Labmagenverlagerung auf Parameter des Energiestoffwechsels bei Milchkühen. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 101, 376–378.
- Mudroň P., Rehage J., Sallmann H. P., Martens M., Scholz H., Kováč G. (1997): Plasma and liver α -tocopherol in dairy cows with left abomasal displacement and fatty liver. *J. Vet. Med. A*, 44, 91–97.
- Mudroň P., Scholz H., Sallmann H. P., Rehage J., Kováč G., Bartko P., Höltershinken M. (1994): Effect of vitamin E injection on cortisol and white blood cell response to surgical stress in dairy cows. *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 64, 176–180.
- Muylle E., Van Den Hende C., Sustronck B., Deprez P. (1990): Biochemical profiles in cows with abomasal displacement estimated by blood and liver parameters. *J. Vet. Med. A*, 37, 259–263.
- Njeru C. A., McDowell L. R., Shireman R. M., Williams S. N. (1994): Assessment of vitamin E nutritional status in yearling beef heifers. *J. Anim. Sci.*, 72, 3207–3212.
- Parola M., Leonarduzzi G., Biasi F., Albano E., Biocca M. E., Poli G., Dianzani M. U. (1992): Vitamin E dietary supplementation protects against carbon tetrachloride-induced chronic liver damage and cirrhosis. *Hepatology*, 16, 1014–1021.
- Pehrson B., Hakkarainen J. (1986): Vitamin E status of healthy Swedish cattle. *Acta Vet. Scand.*, 27, 351–360.
- Rammell C. G., Cunliffe B., Kienoom A. J. (1983): Determination of α -tocopherol in biological specimens by HPLC. *J. Liquid Chromatogr.*, 6, 1123–1130.
- Reid I. M., Rowlands G. J., Dew A. M., Collins R. A., ROBERTS C. J., Manston R. (1983): The relationship between postparturient fatty liver and blood composition in dairy cows. *J. Agric. Sci.*, 101, 473–480.

- Scholz H. (1990): Stoffwechselkontrolle in der Milchkuhherde an Hand von Blut- und Milchparametern. *Prakt. Tierarzt*, 71, Coll. Vet., 21, 32-35.
- Scholz H., Zipori G., Höltershinken M. (1989): Erfahrungen mit einem neuen Instrumentarium für die Leberbiopsie beim Rind. *Prakt. Tierarzt*, 70, Coll. Vet., 19, 21-22.
- Scholz H., Rehage J., Meier C., Mertens M., Höltershinken M. (1992): Veränderungen von Aminosäuren-Index und Ammoniakkonzentrationen in Blut und Liquor cerebrospinalis des Rindes mit Leberschaden. In: *Proc. XVIIIth World Buiatrics Congress*, St. Paul, Minnesota, USA, 3, 312-318.
- Sevanian A., Hochstein P. (1985): Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann. Rev. Nutr.*, 5, 365-390.
- Shendrik N. D. (1986): Effektivnost vedenija vitaminov A i E boljnym gepatozom korovam raznymi sposobami (Effectiveness of administering vitamins A and E by various routes to cows with hepatosis). *Veterinariya (Mosc.)*, 63, 63-64.
- Sokol R. J., Devereaux M., Khandwala R., O'Brien K. (1993): Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes. *Hepatology*, 17, 869-881.
- Uhlig A., Schfer M., Johannsen U. (1988): Untersuchung zur Leberfunktion der Milchkühe im peripartalen Zeitraum. 2. Mitt.: Verhalten labor diagnostischer Kennwerte mit Beziehung zur Leberfunktion. *Arch. Exp. Vet.-Med.*, 42, 108-117.
- Van Den Top A. M., Wensing T., Geelen M. J. H., Wentink G. H., Klooster A. T. van't, Beynen A. C. (1995): Time trends of plasma lipids and enzymes synthesizing hepatic triacylglycerol during postpartum development of fatty liver in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 78, 2208-2220.

Received: 98-06-02

Accepted after corrections: 98-11-03

Contact Address:

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

**Nejčerstvější informace o časopiseckých člancích
poskytuje automatizovaný systém**

Current Contents

na disketách

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna odebírá časopis „**Current Contents**“ řadu „**Agriculture, Biology and Environmental Sciences**“ a řadu „**Life Sciences**“ na disketách. Řada „**Agriculture, Biology and Environmental Sciences**“ je od roku 1994 k dispozici i s abstrakty. Obě tyto řady vycházejí 52krát ročně a zahrnují všechny významné časopisy a pokračovací sborníky z uvedených oborů.

Uložení informací z **Current Contents** na disketách umožňuje nejrozmanitější referenční služby z prakticky nejčerstvějších literárních pramenů, neboť báze dat je **doplňována každý týden** a neprodleně expedována odběratelům. V systému si lze nejen prohlížet jednotlivá čísla **Current Contents**, ale po přesném nadefinování sledovaného profilu je možné adresně vyhledávat informace, tisknout je nebo kopírovat na disketu s možností dalšího zpracování na vlastním počítači. Systém umožňuje i tisk žádanek o separát apod. Kumulované vyhledávání v šesti číslech **Current Contents** najednou velice urychluje rešeršní práci.

Přístup k informacím Current Contents je umožněn dvojím způsobem:

- 1) Zakázkový přístup** – po vyplnění příslušného zakázkového listu (objednávky) je vhodný především pro mimopražské zájemce.

Finanční podmínky: – použití PC – 15 Kč za každou započatou půlhodinu

- odborná obsluha – 10 Kč za 10 minut práce
- vytištění rešerše – 1 Kč za 1 stranu A4
- žádanky o separát – 1 Kč za 1 kus
- poštovné + režijní poplatek 15 %

- 2) „Self-service“** – samoobslužná práce na osobním počítači v ÚZLK.

Finanční podmínky jsou obdobné. Vzhledem k tomu, že si uživatel zpracovává rešerši sám, je to maximálně úsporné. (Do kalkulace cen nezapočítáváme cenu programu a databáze **Current Contents**.)

V případě Vašeho zájmu o tyto služby se obraťte na adresu:

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna

Dr. Bartošová

Slezská 7

120 56 Praha 2

Tel.: 02/24 25 79 39, l. 520, fax: 02/24 25 39 38

Na této adrese obdržíte bližší informace a získáte formuláře pro objednávku zakázkové služby. V případě „self-servisu“ je vhodné se předem telefonicky objednat. V případě zájmu je možné si objednat i průběžné sledování profilu (cena se podle složitosti zadání pohybuje čtvrtletně kolem 100 až 150 Kč).

DEFINED IODINE INTAKE AND CHANGES OF ITS CONCENTRATION IN URINE AND MILK OF DAIRY COWS*

DEFINOVANÝ PŘÍJEM JODU A ZMĚNY JEHO KONCENTRACE V MOČI A MLÉČE DOJNIC

I. Herzig¹, B. Písaříková¹, J. Kurša², J. Říha¹

¹Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

²University of South Bohemia, Faculty of Agriculture, České Budějovice, Czech Republic

ABSTRACT: Changes in iodine concentrations in urine and milk were monitored in dairy cows, receiving rations without iodine supplementation but ensuring the standard requirement, after termination of its supply and in the course of application of a preparation containing iodine (Jodonal B) to the skin of mammary gland. When feeding the ration comprising meadow and lucerne hay, cereal meals (wheat and barley 1 : 1), wheat brans and barley straw *ad libitum*, it means without iodine supplement, iodine concentrations in urine and milk were 44 ± 8.3 and 20 ± 5.2 $\mu\text{g/l}$ (Figs. 1 and 2). Iodine sources were potassium iodide (KI) and ethylenediamine dihydroiodide (EDDI) with iodine contents 76.45 and 80.53%, respectively, which were applied in doses corresponding to 33, 66 and 100% of iodine daily requirement. Ensuring of 33% of iodine requirement (Figs. 1 and 2) by administration of KI or EDDI resulted in an increase of its urinary contents to 108 ± 5.8 ($P < 0.01$) or 98 ± 49.1 $\mu\text{g/l}$, respectively. Iodine content in milk increased from 20 $\mu\text{g/l}$ to 50 ± 15.2 or 37 ± 9.0 $\mu\text{g/l}$ ($P < 0.01$). Significant increase ($P < 0.01$) of urinary iodine concentrations (154 ± 6.3 or 157 ± 2.5 $\mu\text{g/l}$) occurred after covering of 66% of the requirement. Milk iodine concentrations also increased significantly ($P < 0.01$) to 80 ± 3.0 or 64 ± 13.9 $\mu\text{g/l}$. At 100% coverage the urinary iodine concentrations were 321 ± 88.3 or 346 ± 78.2 $\mu\text{g/l}$, it means significantly higher compared with the control ($P < 0.01$) and on the following days the values further moderately increased. Milk iodine concentrations rose to 173 ± 39.3 ($P < 0.05$) or to 121 ± 52.8 $\mu\text{g/l}$. Elimination of iodine supplement from the ration (Fig. 3) was accompanied by a significant decrease ($P < 0.01$) of urinary iodine concentrations on Day 8 to 90 ± 16.7 $\mu\text{g/l}$, and on Day 11 the recorded concentration was 44 ± 24.6 $\mu\text{g/l}$. No linear decrease was observed in milk, on Day 4 after iodine elimination the values were nonsignificantly lower, on Day 8 a significant decrease to 61 ± 39.0 $\mu\text{g/l}$ was observed but on Day 11 a moderate increase of the concentrations (103 ± 23.0 $\mu\text{g/l}$) was recorded. Prior to the application of Jodonal B on the skin of mammary gland the average iodine concentrations in milk of control and experimental cows were 36.4 and 47.3 $\mu\text{g/l}$, respectively. Differences between the average values are nonsignificant from Day 2 to Day 5 of the experiment to the values in control animals ranged between 16.4 and 42.7 $\mu\text{g/l}$. In experimental cows a highly significant increase of the values (185.5 $\mu\text{g/l}$) was recorded on Day 2 already and further gradual increase was observed, reaching the value 377.2 $\mu\text{g/l}$ on Day 5. Statistical significance was confirmed on Days 2, 3, 4 and 5 ($P < 0.05$, or 0.01) between control and experimental cows and in comparison with the original values prior to application of Jodonal B (Fig. 4).

potassium iodine (KI); ethylenediamine dihydroiodide (EDDI); Jodonal B; oral administration; application to the mammary gland

ABSTRAKT: Změny obsahu jodu v těle dojnic mají řadu příčin a predispozičních faktorů. Rolí hrají restriktivní opatření v krmné technice, především zkrmování vlastních zdrojů jadrných krmiv bez použití minerálních doplňků s obsahem jodu, nevyváženost živin krmné dávky i kvalita krmiv, zkrmování objemných krmiv a napájení vodou s vyšším obsahem dusičnanů a nabídka krmiv s obsahem glukosinolatů. Byly sledovány změny koncentrací jodu v moči a mléce dojnic při podávání krmné dávky bez doplňku jodu, při zajištění normované potřeby a při aplikaci přípravku s obsahem jodu (Jodonal B) na kůži mléčné žlázy. Do pokusu, uspořádaného za přesně definovaných podmínek v experimentálních stájích ústavu, byla zařazena skupina šesti dojnic českého strakatého plemene, tvořená třemi analogickými dvojicemi, vyrovnané živou hmotností, věkem, pořadím laktace, užitkovostí a stadiem reprodukčního cyklu (otelením). Zdrojem jodu byly kalium iodatium (KI) a ethylenediamin dihydrojodid (EDDI) s obsahem 76,45, resp. 80,53 % jodu, aplikované v dávkách, které odpovídaly 33, 66 a 100 % denní potřeby jodu. Jod v moči a mléce byl stanoven spektrofotometricky podle Sandell-Kolthoffa po alkalickém spalování (Bednář aj., 1964). Při podávání krmné dávky, sestávající z lučního a vojtěškového sena, obilních šrotů (pšenice a ječmen 1 : 1), pšeničných otrub a ječné slámy *ad libitum*, tedy bez doplňku jodu, byly koncentrace jodu v moči 44 ± 8.3 a v mléce 20 ± 5.2 $\mu\text{g/l}$

* Supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Grant No. 524/97/0654) and Grant Agency of the Ministry of Agriculture (RE 5568).

(obr. 1 a 2). Při zajištění 33 % potřeby jodu (obr. 1 a 2) podáním KI, resp. EDDI (3,8 mg jodu) se obsah jodu v moči zvýšil na $108 \pm 5,8$ ($P < 0,01$), resp. $98 \pm 49,1$ $\mu\text{g/l}$, v mléce z 20 $\mu\text{g/l}$ na $50 \pm 15,2$, resp. $37 \pm 9,0$ $\mu\text{g/l}$ ($P < 0,01$). Krytí potřeby na 66 % (7,6 mg) se projevilo statisticky významným ($P < 0,01$) vzestupem hodnot jodu v moči ($154 \pm 6,3$, resp. $157 \pm 2,5$ $\mu\text{g/l}$) a v mléce vzestupem na $80 \pm 3,0$, resp. $64 \pm 13,9$ $\mu\text{g/l}$, rovněž statisticky vysoce významným ($P < 0,01$). Při 100% zajištění potřeby (11,5 mg) byly v moči nalezeny hodnoty $321 \pm 88,3$, resp. $346 \pm 78,2$ $\mu\text{g/l}$, statisticky významně vyšší oproti kontrole ($P < 0,01$) a v následujících dnech se koncentrace dále mírně zvyšovaly. V mléce hodnoty vzrostly na $173 \pm 39,3$ ($P < 0,05$), resp. $121 \pm 52,8$ $\mu\text{g/l}$. Vyloučení doplňku jodu z krmné dávky (obr. 3) bylo provázeno statisticky významným ($P < 0,01$) poklesem koncentrace jodu v moči, 8. den na $90 \pm 16,7$ $\mu\text{g/l}$ a 11. den byla nalezená koncentrace $44 \pm 24,6$ $\mu\text{g/l}$. V mléce nebyl zaznamenán lineární pokles, 4. den po vyřazení byly hodnoty nevýznamně nižší, 8. den došlo k významnému poklesu na $61 \pm 39,0$ $\mu\text{g/l}$, ale 11. den k mírnému zvýšení hodnot ($103 \pm 23,0$ $\mu\text{g/l}$). Před aplikací Jodonalu B na kůži mléčné žlázy byly průměrné hodnoty jodu v mléce kontrolních dojnic $36,4$, u pokusných $47,3$ $\mu\text{g/l}$. Rozdíl průměrů nejsou statisticky významné. Od 2. do 5. dne pokusu se hodnoty u kontrolních zvířat pohybovaly v rozmezí od $16,4$ do $42,7$ $\mu\text{g/l}$. U pokusných dojnic byl již druhý den zaznamenán statisticky vysoce významný nárůst hodnot ($185,5$ $\mu\text{g/l}$), který se postupně zvyšoval a 5. den dosáhl hodnotu $377,2$ $\mu\text{g/l}$. Statistická významnost byla prokázána 2., 3., 4. a 5. den ($P < 0,05$, resp. $0,01$), a to jak mezi kontrolními a pokusnými dojnicemi, tak oproti původním hodnotám před aplikací Jodonalu B (obr. 4).

kalium iodatum (KI); ethylendiamin dihydrojodid (EDDI); Jodonal B; perorální aplikace; aplikace na mléčnou žlázu

INTRODUCTION

Sufficient iodine intake is of essential importance for physiological functions of the thyroid gland. Thyroid hormones are an important part of systems controlling the metabolism and basal functions in the organism. Hypofunction of the thyroid gland due to low iodine intake is always accompanied by health disorders.

Changes in iodine levels in the organism can be due to a series of causes and predisposition factors. Restrictive measures in feeding techniques play an important role, especially at feeding cereals produced on the farm, without mineral supplementation with iodine (Kursa et al., 1996) as well as unbalanced nutrients in the ration and quality of feedstuffs. Feeding of roughage and supply of water with higher content of nitrates can be also significant (Van der Heide and Schröder-Van der Elst, 1993; Písaříková et al., 1996), and the same importance can be attached to feeding feedstuffs with glucosinolates that results in lower accumulation of iodine in the thyroid gland. Feedstuffs containing rape meal with glucosinolates (10 mmol/kg) increased significantly the weight of the thyroid gland in pigs and poultry and inhibited their growth (Schöne et al., 1993a, 1993b; Burešová, 1998). Stopping of skin disinfection of the mammary gland with preparations containing iodine (Kroupová and Brožová, 1986) as well as a large scale character of breeding of farm animals connected with increased load of the organism are another important factors (Hennig, 1992).

These facts have impacts not only on health status of cattle but consequently they may enhance iodine deficiency in humans, especially in children, as their major sources of iodine in food are milk and milk products (Hemken, 1980; Buliňski et al., 1988; Pennington, 1990).

Farm animals, especially ruminants, serve as an ideal indicator of iodine deficiency for a certain area, as they are fed feedstuffs especially from the area they

live in. Monitoring of iodine levels in urine became a decisive index of iodine supplies to human organisms (Pohunková and Němec, 1988; Bourdoux, 1993). Herzig et al. (1996) tested the possibility to use the system in dairy cows. Besides ioduria, monitoring of thyroid gland function and analysis of blood serum, determination of iodine concentration in milk is also used for the assessment of covering the demands for iodine, as its concentration in milk varies in dependence on the diet (Ewy et al., 1962; Hemken et al., 1972; Groppe, 1993). Parenteral intake of iodine has also impacts on iodine concentration in milk. In this regard attention is paid to the role of disinfectants containing iodine that are applied at the control and prevention of mastitis in the form of sprays or solutions to teat surface as a possible supplementary iodine source. Influencing the intake and metabolism of iodine in the organism of dairy cow in this way is derived from its high resorption potential. It is known that iodine is highly absorbed even by intact skin.

Some differences of ruminants, especially anatomic structure of the gastrointestinal tract, relatively high iodine output by milk, possibility of a long-term intake of goitrogens and other factors that might have effect on iodine concentrations in urine and milk of dairy cows, have set up a reason for monitoring the changes in iodine concentrations at elimination of iodine sources from the ration, at ensuring a standard dose, and after application of an iodine-containing preparation to the skin of a mammary gland.

MATERIAL AND METHODS

Six dairy cows of the Bohemian Pied cattle have been included into the experiment arranged under precisely defined conditions in the experimental stables of the institute. Two groups were set, formed of three analogical pairs of the same weight, age, number of

lactation, milk production and stage of reproductive cycle (calving).

Dairy cows received the ration, corresponding to the yield of 10 l of milk, which included 15 kg of meadow and lucerne hay, 1 kg of cereal meals (wheat and barley 1 : 1), 1 kg of wheat brans and barley straw *ad libitum*. No mineral supplement with iodine was added to the basal ration.

Cows were administered the preparation Jodid 200 – Merck, containing 216.6 g potassium iodine (KI) in one tablet (200 µg of iodine) or ethylenediamine dihydroiodide – Sigma (EDDI) from which a solution containing 1 mg of iodine in 0.1 ml was prepared. KI tablets were applied in a small piece of fodder beet with a hole made in advance which was closed after filling with a necessary number of tablets. EDDI solution was applied in a similar way but flour was used as an absorptive material in the beet hole. The imposed dose of iodine was always readily and completely accepted. The applied doses corresponded to 33, 66 and 100% of the daily requirement for iodine, which is 0.8 mg/kg dry matter of the ration (Sommer et al., 1994). To ensure 33, 66 and 100% of iodine requirements represents 3.8, 7.6 and 11.5 mg of iodine, respectively.

In another experiment iodine concentrations in milk and urine were observed after application of Jodonal B (Bochemie, Bohumín) to the mammary gland. 20% so-

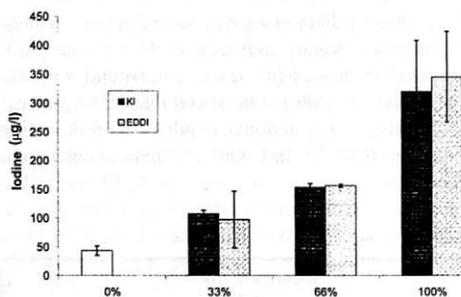
lution Jodonal B containing 1.7–1.8% of active iodine was applied for 4 days always in the morning. A special vessel with 20 ml of Jodonal B solution was attached to the mammary gland, the rest was applied to the surface of the mammary gland. 68–72 mg of iodine was applied daily to the skin of mammary gland. Iodine levels in milk were determined prior to the application on Day 0 and after Jodonal B application on Days 2, 3, 4 and 5, and in urine prior to the application and after the application on Day 5.

Iodine levels in milk and urine were determined by means of spectrophotometry by Sandell-Kolthoff after alkaline combustion (Bednář et al., 1964). The obtained results were evaluated statistically and processed graphically using the programme STAT-plus (Matoušková et al., 1992).

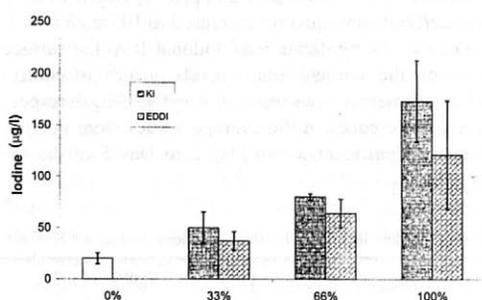
RESULTS

After a fortnight application of the ration without iodine supplementation (composition see methodology) its concentration in urine was 44 ± 8.3 and in milk 20 ± 5.2 µg/l (Figs. 1 and 2).

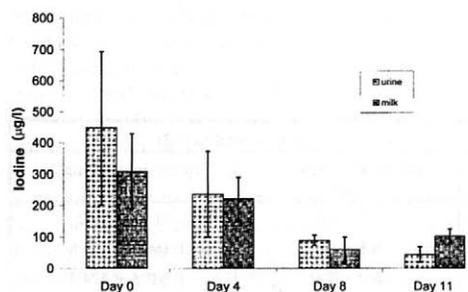
Covering of 33% of iodine requirement by application of KI or EDDI resulted in significant increase of iodine concentration to 108 ± 5.8 ($P < 0.01$) or to $98 \pm$



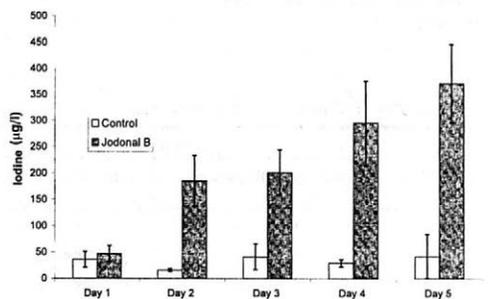
1. Urinary iodine in cows fed rations without iodine supplementation and after supplementation with potassium iodine (KI) and ethylenediamine dihydroiodide (EDDI) and ensuring 33, 66 and 100% of its requirement



2. Iodine in milk of dairy cows fed rations without iodine supplementation and after supplementation with potassium iodine (KI) and ethylenediamine dihydroiodide (EDDI) and ensuring 33, 66 and 100% of its requirement



3. Iodine in urine and milk after termination of supplementation with potassium iodine (KI) and ethylenediamine dihydroiodide (EDDI)



4. Iodine in milk of dairy cows prior to and after application of Jodonal B to the mammary gland

49.1 µg/l. Complementation with the above sources to 66% of iodine requirement resulted in another significant increase of iodine concentrations to 154 ± 6.3 or 157 ± 2.5 µg/l ($P < 0.01$), and finally 100% supply of iodine requirement resulted also in a significant increase of values to 321 ± 88.3 or 346 ± 78.2 µg/l ($P < 0.01$) (Fig. 1).

The natural ration without iodine supplementation ensured iodine concentration in milk 20 ± 5.2 µg/l (Fig. 2). Fortification of the ration to 33% of iodine requirement by KI or EDDI resulted in iodine increase in milk to 50 ± 15.2 or 37 ± 9.0 µg/l ($P < 0.01$), respectively. Covering of the requirement to 66% corresponded to the increase to 80 ± 3.0 or 64 ± 13.9 µg/l ($P < 0.01$), respectively. The values 173 ± 39.3 ($P < 0.05$) or 121 ± 52.8 µg/l of milk were recorded at 100% covering of the requirement.

Differences of iodine concentrations in urine and milk, calculated from values obtained after administration of KI or EDDI, were not statistically significant.

Termination of KI or EDDI administration was accompanied by a statistically significant ($P < 0.01$) decrease of iodine concentrations in urine and milk (Fig. 3). Decrease of urinary iodine was observed after 4 days (237 ± 136.1 µg/l) and continued on Days 8 and 11 of the investigation (90 ± 16.7 ; 44 ± 24.6 µg/l). The situation in milk differed (Fig. 3) when the original concentration 310 ± 118.8 µg/l dropped on Day 8 to 61 ± 39.0 µg/l but subsequently increased to 103 ± 23.0 µg/l.

Prior to the application of Jodonal B to the surface of udder, the average iodine levels in milk of control and experimental cows were 36.4 and 47.3 µg/l, respectively. Differences in the average values were not statistically significant. From Day 2 to Day 5 of the ex-

periment, the values in control animals ranged between 16.4 and 42.7 µg/l. In experimental cows a statistically significant increase of the values (185.5 µg/l) was observed on Day 2 of the experiment and further increase reaching the value 377.2 µg/l on Day 5. Statistical significance was demonstrated on Days 2, 3, 4 and 5 between control and experimental cows and also in comparison with the original values prior to application of Jodonal B (Fig. 4).

Urinary iodine levels were determined prior to the application of Jodonal B and on Day 5 of the experiment. Prior to the application of Jodonal B the average values of urinary iodine in control and experimental cows were 43.6 and 29.2 µg/l, the differences in the average values were not significant. On Day 5 the urinary iodine level in the control group was 31.9 µg/l, in the experimental group an increase to 125.0 µg of iodine/l was recorded. The differences were statistically significant (Tab. I).

Conversion of the values to the milk yield is shown in Tab. II. Regarding the fact that the average milk productions in control and experimental dairy cows were very low, the total iodine levels followed the trends shown in Fig. 4.

DISCUSSION

The ration for dairy cows without iodine supplementation provided urinary iodine level 44 µg/l and milk iodine level 20 µg/l. Milk levels correspond with the data by Vlčková (1986), who stated that feeding cereal meals without using Jodonal resulted in milk iodine levels lower than 20 µg/l. Our previous investigation

I. Urinary iodine levels (µg/l) after application of Jodonal B to the skin of mammary gland

Group	Control (n = 3) $\bar{x} \pm s$	Experimental (n = 3) $\bar{x} \pm s$
Day 0	44 ± 12.3	29 ± 8.4
		Days 1-4 after application of Jodonal B
Day 5	32 ± 7.9	125 ± 19.7 a**b**

a) significance compared with Day 0

b) significance compared with control

** $P < 0.01$

II. Iodine in milk after application of Jodonal B

Group	Control (n = 3)		Experimental (n = 3)	
	average milk yield (l) $\bar{x} \pm s$	iodine in milk (µg/l) $\bar{x} \pm s$	average milk yield (l) $\bar{x} \pm s$	iodine in milk (µg/l) $\bar{x} \pm s$
Day 0	6.7 ± 2.4	219.0 ± 10.1	6.5 ± 1.7	313.2 ± 16.2
Day 2	6.2 ± 1.4	98.7 ± 13.7	6.6 ± 1.3	$1\ 169.5 \pm 190.6$
Day 3	7.3 ± 1.6	280.7 ± 93.6	6.0 ± 1.8	$1\ 207.5 \pm 424.9$
Day 4	6.5 ± 1.8	197.3 ± 90.0	6.0 ± 1.3	$1\ 827.9 \pm 828.2$
Day 5	6.7 ± 1.9	315.8 ± 161.1	6.3 ± 1.2	$2\ 172.5 \pm 1\ 386.4$

(Herzig et al., 1996) showed that average urinary iodine in the investigated herd ($n = 41$) with no iodine supplementation was $53.2 \mu\text{g/l}$, and after iodine supplement it increased to $316.2 \mu\text{g/l}$ ($n = 46$).

Extensive monitoring of iodine concentrations in selected herds of cattle revealed that of the investigated set of 672 dairy cows 27.5% had urinary iodine concentrations lower than $20 \mu\text{g/l}$ (Herzig et al., 1996), which can be considered as iodine deficiency. Janssen et al. (1994) stated that iodine deficiency can decrease iodine excretion in urine by 80%.

Potassium iodine (76.45% of iodine) and ethylenediamine dihydroiodide (80.53% of iodine) were orally administered as iodine supplements. During their administration an even increase of iodine levels in urine and milk was observed, and supplies that met the full iodine requirement resulted in its average levels 336 and $147 \mu\text{g/l}$ in urine and milk, respectively. Further moderate increases of iodine concentrations were observed in the following period. The differences of average values between the groups supplemented with KI and EDDI were not statistically significant. Bobek et al. (1997) found the same development of iodine levels after oral administration of KI and EDDI with nonsignificantly higher values for KI. Similar values were found in dairy cows of the herd LOS P (316.2 g/l) where iodine was supplied in the form of KI (Herzig et al., 1996). Higher iodine levels were recorded in milk after KI administration compared with EDDI.

Elimination of iodine sources from cow rations was accompanied by a gradual decrease of urinary iodine concentrations. However, no similar decrease was observed in milk. Besides our subject of investigation, our experience concerning a dramatic iodine increase in milk after EDDI administration (iodine concentration 80.3%) can be used for prevention (50 mg/day) or treatment of hoof disease (200 mg/day). Iodine intake of 200 mg/day increased its concentration in milk to undesirable $1551 \mu\text{g/l}$ (Miller and Swanson, 1973).

Percentage of iodine excreted in milk was 11.6%, 9.5% and 12.8% at ensuring 33%, 66% and 100% of iodine requirement, respectively. These values ranged between 7 and 27% of those mentioned by Kirchgessner (1959) and correspond (7–10%) with the data by Binnerts (1989). Kaufmann et al. (1998) report negative correlations between intake and excretion of iodine by milk at supplementation of 20, 60 and 150 mg of iodine per day, except for the period when 60 mg was supplemented. Besides natural or anthropogenic goitrogens having effect on the use of iodine from feedstuffs and on its levels in urine and milk, another cause of its low levels in milk is lack of disinfection by preparations containing iodine of the skin of udder and premises for milking and milk storage. This has subsequently an impact on the health status of cattle and indirectly on supplying humans with iodine.

Kroupová and Brožová (1986) stated that a regular external application of Jodonal is accompanied by iodine absorption through the skin which has impacts on

total metabolism of iodine. In herds where in the period 1983–1984 commercial feed mixtures supplemented with trace elements including iodine were fed and Jodonal was used for disinfection, iodine concentration in milk reached $98.7 \mu\text{g/l}$. In stables where Jodonal had not been used, average iodine concentration in milk was $57.5 \mu\text{g/l}$ (Kursa et al., 1994). Šucman et al. (1984) found that after application of Jodonal M, iodine concentration in milk increased from the original $122 \mu\text{g/l}$ to a maximum of $831 \mu\text{g/l}$ and this increased level lasted for fourteen days. Application of a disinfectant containing 1% iodine for the same purpose was accompanied by an increased concentration of iodine in milk approximately by 100 g/l (Conrad and Hemken, 1978). Treatment of the mammary gland with disinfectants prepared by hand dilution and containing higher, non-specified iodine concentrations induced an increase of iodine concentration in milk up to $4000 \mu\text{g/l}$ (Hemken, 1979).

Our investigations revealed that application of Jodonal B to the mammary gland increased rapidly and significantly iodine contents in both milk and urine. Compared with the data by Kroupová and Brožová (1986), dairy cows in our experiment were not applied iodine as a mineral supplement but its source was a ration consisting of roughage and cereals and iodine in a preparation used for disinfection of the mammary gland.

Increased urinary concentrations confirmed its penetration through the skin of the mammary gland and the fact that the total iodine metabolism can be influenced in this way. It seems that the essential effect is exerted directly in the mammary gland as urinary iodine concentrations were 3x lower than those in milk, however significantly different compared with the control cows. Therefore we can assume that external use of iodine preparations has a significant effect on iodine levels in milk, urine and the whole organism.

Arguments are often heard against the use of iodine preparations for the treatment of the mammary gland as there is a direct contact with milk which can have an effect on iodine level in milk or iodine residues might penetrate into milk from the treated milking equipment. Our experiments did not confirm any of those arguments. Endogenous origin of milk iodine was confirmed in similar experiments by Conrad and Hemken (1978), when they found that disinfection of only the right quarters of udder resulted in iodine increase in milk not only from the right udder quarters but also from the left ones. Iodine in milk increased also in such a case that disinfection preparation was applied to skin but the mammary gland was protected.

REFERENCES

- Benďář J., Röhling S., Vohnout S. (1964): Příspěvek ke stávení proteinového jodu v krevním séru. Českoslov. Farmacie, 13, 203–209.

- Binnerts W. T. (1989): Milk analysis for the iodine status of dairy cows. *Z. Des. Hyg.*, 35, 12–15.
- Bobek S., Sechman A., Brzóska F., Pyska H. (1997): Zastoso-
wanie lizawek dla krów mlecznych z dodatkiem EDDI
i KI i ich wpływ na podziom jodu w mleku. In: *Związki
mineralne w żywieniu zwierząt. II. konferencja naukowa.*
Kraków, 22.–23. 9. 1997, 165–170.
- Bourdoux P. P. (1993): Biochemical evaluation of iodine
status. In: *Delange F. et al.: Iodine Deficiency in Europe.*
N. Y., Plenum Press, 119–124.
- Buliński R., Marzec Z., Koktyś N. (1988): Badania zawar-
tości jodu w mleku i produktach mlecznych. *Rocz. PZH,*
39, 198–202.
- Burešová R. (1998): Částečná náhrada sojového extrahova-
ného šrotu řepkovým extrahovaným šrotem ve výkrmu
prasat. *Náš chov*, 3, 28–30.
- Conrad L. M., Hemken R. W. (1978): Milk iodine as influ-
enced by an iodophor teat tip. *J. Dairy Sci.*, 55, 776–780.
- Ewy Z., Bobek S., Kaminski J. (1962): Badania nad wyste-
powaniem niedoboru jodu u zwierząt w województwach
krakowskim. *Rocz. Nauk Rol.*, 79–83, 311–334.
- Groppel B. (1993): Jodmangel beim Tier. In: *Anke M.,
Gürtler H.: Mineralstoffe und Spurenelemente in der Er-
nährung.* Gersdorf, Verlag Media Touristik, 127–156.
- Hemken R. W. (1979): Factors that influence the iodine con-
tent of milk and meat. *J. Anim. Sci.*, 48, 981–985.
- Hemken R. W. (1980): Milk and meat iodine content: rela-
tion to human health. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 176,
1119–1121.
- Hemken R. W., Vandersall J. H., Oskarsson M. A., Frymann
L. R. (1972): Iodine intake related to milk iodine and
performance of dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 55, 931–934.
- Hennig A. (1992): Mineralstoffe, Vitamine, Ergotropika.
Dtsch. Land. Verlag, 636 pp.
- Herzig I., Říha J., Písaříková B. (1996): Urinary iodine level
as an intake indicator in dairy cows. *Vet. Med. – Czech,*
41, 97–101.
- Janssen K. P., Van Der Heide D., Visser T. J., Kaptein E.,
Beynen A. C. (1994): Thyroid function and deiodinase
activities in rats with marginal iodine deficiency. *Biol.
Trace Elem. Res.*, 40, 237–246.
- Kaufmann S., Kursa J., Kroupová V., Rambeck W. A.
(1998): Iodine in milk by supplementing feed: an addi-
tional strategy to erase iodine deficiency? *Vet. Med. –
Czech*, 43, 173–178.
- Kirchgessner M. (1959): Wechselbeziehungen zwischen
Spurenelementen in Futtermitteln und tierischen Substan-
zen sowie Abhängigkeitsverhältnisse zwischen einzelnen
Elementen bei der Retention. *Z. Tierphysiol. Tieren-
ährung Futtermitt.*, 14, 270–277.
- Kroupová V., Brožová V. (1986): Jod v mléce dojníc v jiho-
západních Čechách. *Sbor. Vys. Šk. Zeměd. Fak. agron.,
zootechn. řada*, 3, 57–67.
- Kursa J., Kroupová V., Kratochvíl P. (1994): Společně proti
výskytu strumy. *Zemědělec*, 6, 8.
- Kursa J., Kroupová V., Kratochvíl P., Trávníček J., Jezdinský
P. (1996): K diagnostice strumy skotu. *Veterinářství*, 3,
91–96.
- Matoušková O., Chalupa J., Cigler M., Hruška K. (1992):
STAT Plus – uživatelská příručka. Brno, VÚVeL, 168 s.
- Miller J. K., Swanson E. W. (1973): Metabolism of ethylene-
diamine dihydroiodide and sodium or potassium iodine by
dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 56, 378–384.
- Pennington J. A. T. (1990): Iodine concentrations in US
milk: variation due to time, season, and region. *J. Dairy
Sci.*, 73, 3421–3427.
- Písaříková B., Herzig I., Říha J. (1996): Inorganic anions
with potential strumigenic effects in potable water for hu-
mans and animals. *Vet. Med. – Czech*, 41, 33–39.
- Pohunková D., Němec J. (1988): Aktuální otázky endemické
strumy a jodového deficitu. *Čas. Lék. Čes.*, 127, 641–647.
- Schöne F., Geinitz D., Grün M., Hennig A. (1993a): Einfluss
der Glucosinolat- und Lodzufuhr auf den Schilddrüsenhor-
mon-, Vitamin A- und Spurenelementstatus Rapsextraktions-
schrotgefütterter Schweine. *Mh. Vet.-Med.*, 48, 75–78.
- Schöne F., Groppel B., Hennig A., Jahreis G. (1993b): Eval-
uation of diets with thioglycosides on growth, serum thy-
roid hormone level and thyroid iodine content in pigs.
In: *Delange F. et al.: Iodine Deficiency in Europe.* N.Y.,
Plenum Press, 450.
- Sommer A., Čerešňáková Z., Frydrych Z., Králík O., Králič-
ková Z., Krása A., Pajtáš M., Petrikovič P., Pozdíšek J.,
Šimek M., Třináctý J., Vencel B., Zeman L. (1994): Potře-
ba živin a tabulky výživné hodnoty krmiv pro přežvýkav-
ce. *Pohořelice, Česká akademie zemědělských věd.* 196.
- Šucman E., Cvak Z., Kalous F., Synek O. (1984): Some
questions concerning the iodine content in milk. *Acta Vet.
Brno*, 53, 65–69.
- Van der Heide D., Schröder-Van der Elst J. P. (1993): Iodine
and goitre in the Netherlands: a role for nitrate pollution?
In: *Delange F. et al.: Iodine Deficiency in Europe.* N. Y.,
Plenum Press, 450.
- Vlčková L. (1986): Jod v mléce dojníc v první fázi laktace.
[Diplomová práce.] Praha, Vysoká škola zemědělská, Fa-
kulta agronomická, České Budějovice, 74.

Received: 98–07–10

Accepted after corrections: 98–10–12

Contact Address:

Doc. MVDr. Ivan Herzig, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32, Brno, Česká republika
Tel. +420 5 41 32 12 41, fax +420 5 41 21 12 29, e-mail: herzig@vri.cz

AUTORADIOGRAPHIC DETECTION OF RNA AND GLYCOPROTEIN SYNTHESIS IN EPITHELIAL CELLS OF THE OVIDUCT IN OVULATED HEIFERS

AUTORÁDIOGRAFICKÁ DETEKCIA SYNTÉZY RNA A GLYKOPROTEÍNOV V EPITELOVÝCH BUNKÁCH VAJCOVODU JALOVÍC PO OVULÁCII

J. Pivko, P. Grafenau, V. Uhrín, V. Kopečný

Research Institute of Animal Productions, Nitra, Slovak Republic

ABSTRACT: Heifers ($n = 9$) of the Black-Pied Holstein-Friesian breed were slaughtered on the 3rd, 6th and 9th day of the synchronized cycle, respectively (heat = day 0). Tissue samples from the ampullar part of the oviduct were collected immediately after slaughter and treated for histoautoradiographic (ARG) analyses. They were cultured for 20 min on air in 0.25 ml medium Dulbecco PBS at 38 °C enriched with 100 $\mu\text{Ci/ml}$ of $[5\text{-}^3\text{H}]$ uridine (specific activity 740 GBq/mM, UVVVR Prague) for detection of the RNA synthesis. For the ARG detection of glycoprotein synthesis the samples of oviductal tissue were cultured for 60 or 240 min on air, respectively, in 0.25 ml medium Dulbecco PBS at 38 °C to which 100 $\mu\text{Ci/ml}$ of L- $[6\text{-}^3\text{H}]$ fucose (specific activity 0.55–1.1 TBq/mM, Amersham Int., Great Britain) was added. After incubation, the samples were fixed, dehydrated and embedded in Epon 812. Semithin (1 μm) or ultrathin sections were coated with nuclear liquid emulsion K.5 or L.4, respectively. After one-month exposure they were developed using D 19 developer and after staining or contrasting they were observed using either light-microscopy or electron microscopy (using an electron microscope JEM 100 CX at 80 kV). Investigated autoradiograms revealed an intensive synthesis of RNA in both ciliated as well as in secretory cells of the oviduct epithelium. The intensity of RNA synthesis remains comparable during the early luteal phase from the 3rd to the 9th day of the cycle. The glycoproteins, synthesized first in the Golgi apparatus in the supranuclear region were seen to move to the apical region of the epithelial cells later on. The most intensive autoradiographic reaction of newly synthesized glycoproteins was detected on the 3rd day of the cycle without an evident change on the 6th day but decreasing on the 9th day.

RNA; glycoproteins; autoradiography; heifers; oviduct

ABSTRAKT: Jalovice ($n = 9$ ks) čiernostrakatého HF plemena boli zabíjané na 3., 6. a 9. deň synchronizovaného pohlavného cyklu (prvý deň ruje = 0). Excízie z ampulárnej časti vajcovodov boli odoberané ihneď po zabíí spracované pre autorádiografické (ARG) analýzy. Odoberaté vzorky vajcovodov boli inkubované 20 min na vzduchu v 0,25 ml média Dulbecco PBS pri teplote 38 °C s prídavkom 100 $\mu\text{Ci/ml}$ $[5\text{-}^3\text{H}]$ uridínu so špecifickou aktivitou 740 GBq/mM (UVVVR Praha), pre sledovanie RNA syntézy. Pre autorádiografickú analýzu syntézy glykoproteínov boli vzorky vajcovodov inkubované 60 min a 240 min na vzduchu v 0,25 ml média Dulbecco PBS pri teplote 38 °C s prídavkom 100 $\mu\text{Ci/ml}$ L- $[6\text{-}^3\text{H}]$ fukózy so špecifickou aktivitou 0,55–1,1 TBq/mM (Amersham Int., Anglicko). Po inkubácii boli vzorky fixované, odvodnené a zaliate do Eponu 812. Zhotovené 1 μm alebo ultratenké rezy boli pokryté nukleárnou emulziou Ilford K.5 a exponované. Po jednomesačnej expozícii boli vyvolané vo vývojke D 19 a po farbení alebo kontrastovaní prehliadané svetelným alebo elektrónovým mikroskopom JEM 100 CX II pri urýchľovacom napätí 80 kV. Autorádiografickou analýzou sa zistila intenzívna syntéza RNA v ciliárnych a sekrečných bunkách epitelu vajcovodu. Intenzita syntézy RNA v priebehu skorej luteálnej fázy sa nemení a má vyrovnanú tendenciu od 3. do 9. dňa pohlavného cyklu. Glykoproteíny, syntetizované najskôr v Golgího aparáte v supranukleárnej oblasti, prechádzajú do apikálnej oblasti buniek v sekrečných bunkách epitelu vajcovodu. Najintenzívnejšia reakcia bola na 3. deň cyklu. Tvorba glykoproteínov na 6. deň ostáva rovnaká a na 9. deň v sekrečných bunkách klesá.

RNA; glykoproteíny; autorádiografia; jalovice; vajcovod

ÚVOD

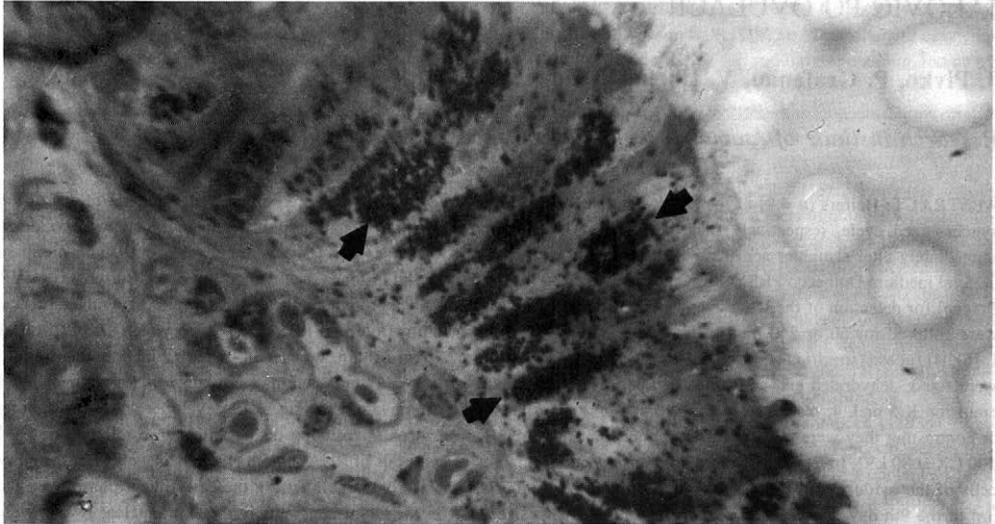
V poslednom čase získali štúdie vzťahu vajcovod – maternica – embryo mohutný impulz vďaka poznatkom

o vplyve rastových faktorov produkovaných embryom, lymfocytmi, makrofágmi, epitelmi vajcovodov a maternice v celom rade metabolických parametrov embrya, predovšetkým pri jeho osamostatnení na začiatku

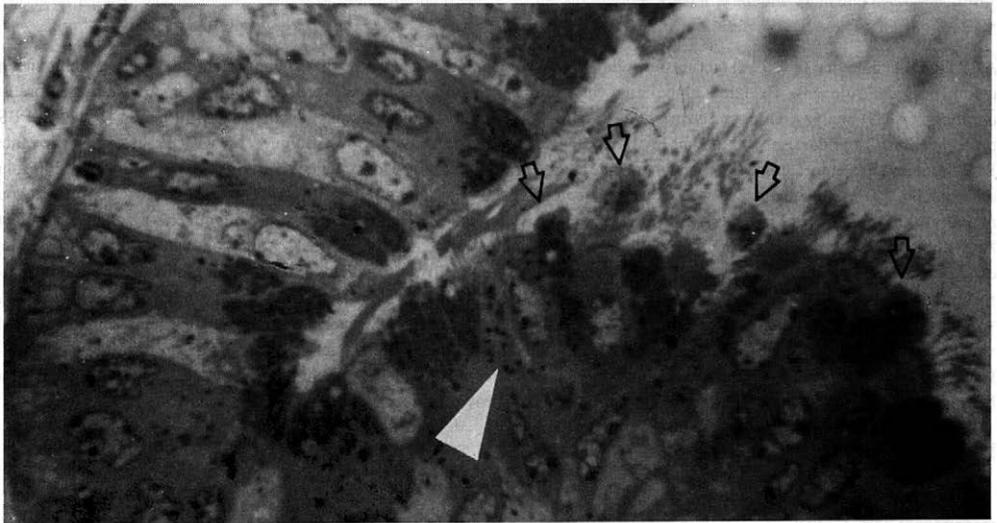
embryonálnej transkripcie (Schultz a Heyner, 1993). Tieto poznatky stimulujú tiež ďalší výskum sekrečnej činnosti vajcovodu a maternice, ktorá bola intenzívne sledovaná i v predchádzajúcich dekadach. Pokiaľ ide o sekrečnú činnosť vajcovodu, veľká pozornosť je venovaná sekrétom glykoproteínovej povahy, ktoré boli

detegované v období ruje vo vajcovodoch všetkých analyzovaných cicavčích druhov (Hill a i., 1997).

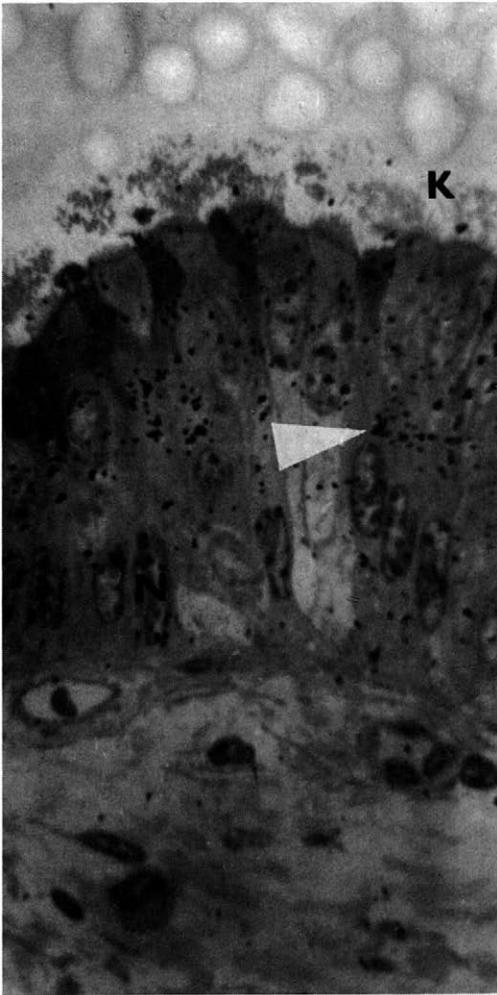
V predloženej práci uvádzame naše výsledky z tejto oblasti, ktoré pomocou histoautorádiografie na úrovni svetelného i elektrónového mikroskopu sledujú úroveň transkripcie (= syntézu RNA) a produkciu glykoproteínového sekrétu v epiteli vajcovodov.



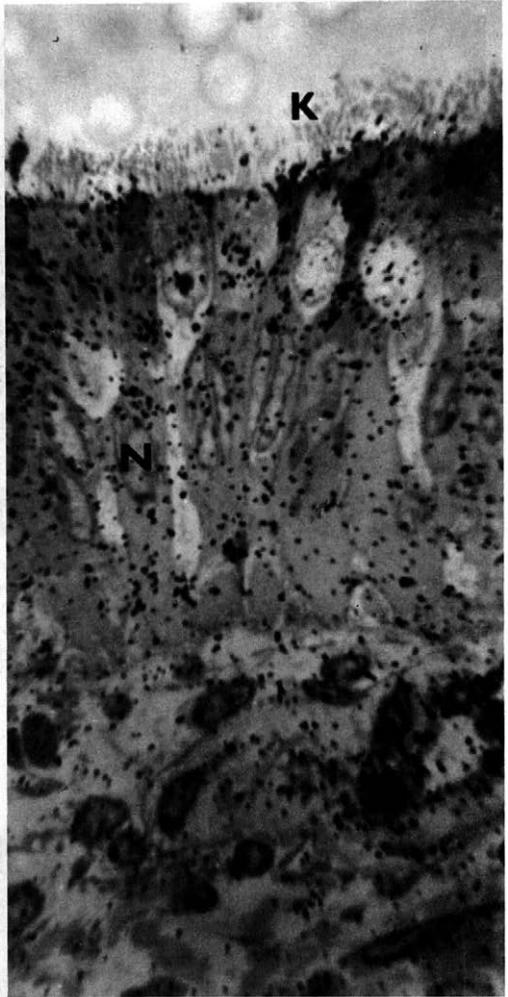
1. Autorádiografická detekcia intenzity transkripcie (syntézy RNA) v epiteli vajcovodu jalovic; vajcovod jalovice na 9. deň pohlavného cyklu, kultivovaný 20 min v prítomnosti [^3H] uridínu; intenzívne značené jadrá (označené šipkami) ciliárnych a sekrečných buniek (zv. 5 000x) – Autoradiographic detection of the transcriptional intensity (RNA synthesis) in the epithelium of the oviduct in heifers; the oviduct of a heifer on the 9th day of the cycle, cultured for 20 min in presence of [^3H] uridine; intensively labelled nuclei (marked by arrows) of ciliated and secretory cells (5 000x)



2. Autorádiografická detekcia produkcie glykoproteínového sekrétu v epiteli vajcovodu jalovic; vajcovod jalovice na 3. deň pohlavného cyklu, kultivovaný 60 min v médiu obohatenom [^3H] fukózou; značená supranukleárna oblasť (biela šípka), intenzívna sekrečia (prázdne šípky) sekrečných buniek epiteliu (zv. 5 000x) – Autoradiographic detection of a glycoproteinaceous secret production in the oviductal epithelium in heifers; the oviduct of a heifer on the 3rd day of the cycle, cultured for 60 min in a medium enriched with L- [^3H] fucose; note labelled supranuclear region (white arrow); intensive secretory product (empty arrows) of the secretory cells (5 000x)



3. Autorádiografická detekcia produkcie glykoproteínového sekrétu v epiteli vajcovodu jalovíc; vajcovod jalovice na 9. deň pohlavného cyklu, kultivovaný 60 min v médiu obohatenom [^3H] fukózou; značená supranukleárna oblasť (biela šípka) v zóne Golgiho aparátu; K – kinocílie, N – jadrá buniek (zv. 5 000x) – Autoradiographic detection of a glycoproteinaceous secret production in the oviductal epithelium in heifers; the oviduct of a heifer on the 9th day of the cycle, cultured for 60 min in a medium enriched with L- [^3H] fucose; labelling is seen in the supranuclear region (white arrow) occupied by the Golgi apparatus; K – kinocilia, N – cell nuclei (5 000x)

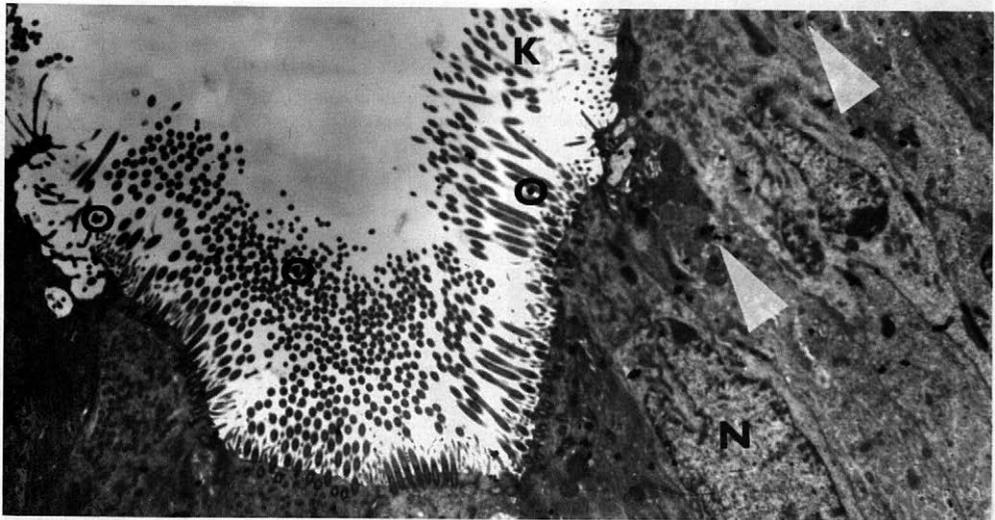


4. Autorádiografická detekcia produkcie glykoproteínového sekrétu v epiteli vajcovodu jalovíc; vajcovod jalovice na 6. deň pohlavného cyklu, kultivovaný 240 min v médiu obohatenom [^3H] fukózou; pri supranukleárnom značení intenzívne značená najmä apikálna cytoplazma sekrétných a ciliárnych buniek, ich sekrét a kinocílie (zv. 5 000x) – Autoradiographic detection of a glycoproteinaceous secret production in the oviductal epithelium in heifers; the oviduct of a heifer on the 6th day of the cycle, cultured for 240 min in a medium enriched with L- [^3H] fucose; in addition to a supranuclear labelling note an intensive labelling in the apical part of the cytoplasm of the secretory and ciliated cells, in their secretory product and in kinocilia (5 000x)

Syntézu glykoproteínov v epiteliálnych bunkách vajcovodu stimulujú estrogény prostredníctvom aktivácie genómu, t.j. syntézy RNA. Väčšina kvantitatívnych zmien transkripčnej aktivity v bunkách maternice, ktoré sú stimulované k proliferácii, sa vzťahuje na syntézu jadrovej RNA, ktorá predstavuje prevažne ribozomálnu RNA (Gorski a i., 1965).

Teória účinku steroidných hormónov predpokladá zvýšenie syntézy RNA a následne tiež proteosyntézy, ktorá ovplyvňuje a mení funkciu cieľových buniek.

Proces sa uskutočňuje tak, že steroid vstupuje do bunky, kde vytvára komplex s proteínovým receptorom steroidu. Tento komplex sa aktivuje a translokuje do jadra. V jadre sa aktivovaný komplex viaže na akceptorové molekuly chromatinu. Tento nový komplex vytvára podmienky pre syntézu prekurzorov rozdielnych typov RNA. Prekurzory mRNA, tRNA a rRNA sú potom transportované do cytoplazmy, kde sa príslušná steroid-sPECIFIC RNA viaže na polyribozómy a dochádza k syntéze pro-



5. Autorádiografická detekcia produkcie glykoproteínového sekrétu v epiteli vajcovodu jalovíc; elektrónogram epitelu vajcovodu jalovice na 9. deň pohlavného cyklu, kultivovaný 240 min v médiu obohatenom $[^3\text{H}]$ fukózou; intenzívne značená apikálna časť cytoplazmy a kinocílie (bielymi šípkami označené čierne zrníčka striebra, krúžkami obkolesené zrníčka medzi kinocíliami); K – kinocílie, N – jadrá buniek (zv. 7 600x) – Autoradiographic detection of a glycoproteinaceous secret production in the oviductal epithelium in heifers; the autoradiogram of the epithelium (9th day of the cycle, 240 min tritiated fucose); note intensively labelled apical cytoplasm and kinocilia (white arrows indicate black grains of silver), note also similar silver grains among kinocilia (in circles); K – kinocilia, N – cells nuclei (7 600x)

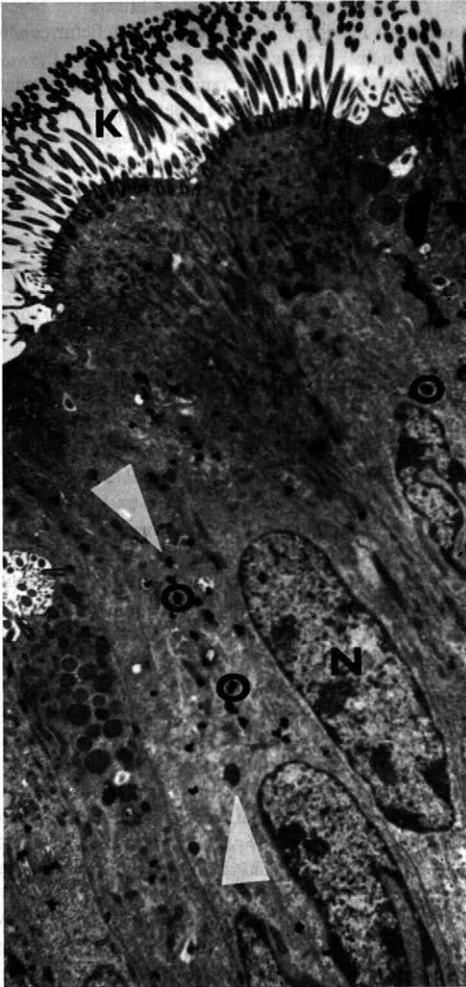


6. Autorádiografická detekcia produkcie glykoproteínového sekrétu v epiteli vajcovodu jalovíc; elektrónogram epitelu vajcovodu jalovice na 9. deň pohlavného cyklu kultivovaný 240 min v médiu obohatenom $[^3\text{H}]$ fukózou; intenzívne značená apikálna časť cytoplazmy sekréčných a ciliárnych buniek s kinocíliami; C – ciliárne bunky, S – sekréčne bunky, N – jadrá buniek (zv. 7 600x) – Autoradiographic detection of a glycoproteinaceous secret production in the oviductal epithelium in heifers; similar situation as in Fig. 5; intensively labelled apical cytoplasm and kinocilia; C – ciliary cells, S – secretory cells, N – cells nuclei (7 600x)

teínov špecifických pre príslušný hormón, napríklad pre hormón matrice (Jänne, 1981).

Na to, že mnohé proteíny sekrétov vajcovodu, najmä kyslé glykoproteíny, sú produktmi sekréčných buniek,

poukázali už Hadek (1955) a Brower a Anderson (1969). Oliphant a i. (1984) detegovali sulfátový kyslý glykoproteín molekulevej hmotnosti 71 000, ktorý dokázali imunocytochemicky aj v sekréčných granulách. Pri štú-



7. Autorádiografická detekcia produkcie glykoproteínového sekrétu v epiteli vajcovodu jalovic; elektronogram sekrétnych a riasinkových buniek vajcovodu jalovice na 9. deň pohlavného cyklu, kultivovaný 240 min v médiu obohatenom $[^3\text{H}]$ fukózou; intenzívne značená Golgiho zóna (medzi bielymi šípками označené čierne zrníčka striebra a niektoré z nich obkolesené krúžkom); K – kinocilie, N – jadrá buniek (zv. 7 600x) – Autoradiographic detection of a glycoproteinaceous secret production in the oviductal epithelium in heifers; another example of the same situation; intensively labelled Golgi zone; K – kinocilia, N – cells nuclei (7 600x)



8. Autorádiografická detekcia produkcie glykoproteínového sekrétu v epiteli vajcovodu jalovic; zväčšený výsek Golgiho zóny predchádzajúceho elektronogramu (obr. 7) s intenzívnym značením (čierne zrníčka) nad Golgiho aparátom (oblasť ohraničená medzi bielymi šípками); G – kanáliky a vâčky Golgiho komplexu (zv. 40 000x) – Autoradiographic detection of a glycoproteinaceous secret production in the oviductal epithelium in heifers; the Golgi zone from Fig. 7 at a higher magnification; note the Golgi apparatus (between white arrows) and its intensive labelling by black silver grains. G – structural components of the Golgi apparatus (4 000x)

diu epitelu vajcovodov myši s použitím elektrónomikroskopických a autorádiografických metód Teixeira a Haddad (1988) s $[^3\text{H}]$ fukózou dokázali, že zložky sekrétnych granúl sa tvoria v Golgiho vâčkoch a migrujú do sekrétnych granúl. Niektoré sú transportované priamo na perifériu bunky vo vâčkoch, ktoré splyývajú s cytoplazmatickou membránou za súčasného vylúčenia obsahu. Pivko a i. (1998) zistili podobný obraz pri ARG štúdiu epitelových buniek endometria jalovic. Syntetickú aktivitu jednotlivých buniek tvoriacich sek-

rečný epitel je možné rovnako korelovať s úrovní RNA syntézy, ktorú môžeme opäť stanoviť autorádiograficky (Kaňka a Kopečný, 1977).

MATERIÁL A METÓDA

K štúdiu syntetickej aktivity ciliárnych a sekrétnych epitelových buniek sliznice vajcovodu sme použili 9 jalovic čiernostrakatého HF plemena, ktoré sme syn-

chronizovali aplikáciou prostaglandínu PGF₂alfa (Oestrophan Spofa, Praha, ČR) dávkou 2 ml *i.m.* v rozpätí 11 dní. Po 65 až 72 hodinách bola u nich zaznamenaná intenzívna ruja. Jalovice boli postupne zabíjané na 3., 6. a 9. deň pohlavného cyklu (prvý deň ruje = 0) a excízie vajcovodov (ampulárna časť) boli odoberané ihneď po zabíjaní a ďalej spracovávané pre autorádiografické (ARG) analýzy.

Získané tkanivá boli inkubované 20 min na vzduchu v 0,25 ml média Dulbecco PBS pri teplote 38 °C prídavkom 100 µCi/ml [5-³H] uridínu so špecifickou aktivitou 740 GBq/mM (UVVVR Praha) pre sledovanie RNA syntézy. Detaily autorádiografickej detekcie RNA syntézy uvádzame v práci Motlíka a i. (1984). Ďalej sme tkanivá inkubovali 60 min a 240 min na vzduchu v 0,25 ml média Dulbecco PBS pri teplote 38 °C s prídavkom 100 µCi/ml L-[6-³H] fukózy so špecifickou aktivitou 0,55–1,1 TBq/mM (Amersham Int., Anglicko). Detaily autorádiografickej detekcie glykoproteínovej syntézy uvádzame v práci autorov Pivko a i. (1982). Hodnotenie autorádiogramov bolo urobené svetelným a elektrónovým mikroskopom JEM 100 CXII pri urýchľovacom napätí 80 kV.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pri ciliárnych a sekrečných epitelových bunkách ampulárnej časti vajcovodov sme hodnotili syntézu RNA a glykoproteínov. Zistili sme pri dvadsaťminútovej inkubácii vajcovodu v [5-³H] uridíne výraznú syntetickú aktivitu v jadrách ciliárnych a sekrečných buniek (v autorádiogramoch v podobe čiernych zrníčok striebra) vo všetkých sledovaných dňoch cyklu (obr. 1). Naproti tomu pri inkubácii vajcovodu v [6-³H] fukóze boli zistené rozdiely medzi 3., 6. a 9. dňom cyklu.

Pri 60-minútovej inkubácii v [6-³H] fukóze sa objavuje slabšia aktivita cytoplazmy v Golgiho zóne (supranukleárna oblasť s Golgiho aparátom). Pri 240-minútovej inkubácii pozorujeme intenzívne značenie nielen v Golgiho zóne, ale aj v apikálnej cytoplazme. Migrácia značených molekúl má jednoznačný charakter Golgiho zóny – apikálna cytoplazma, ktorá je typická pre sekretorickú bunku. Tento priebeh, veľmi charakteristický na 3. deň, je zreteľný aj na 6. a 9. deň cyklu, avšak jeho intenzita je nižšia (obr. 2, 3, 4).

Výsledky pozorované v svetelnom mikroskope potvrdili aj obrázky získané elektrónovým mikroskopom. Intenzívne značenie sa pozorovalo v cisternách i váčikoch Golgiho aparátu, ale aj v apikálnych oblastiach cytoplazmy, pri bazálnych telieskach v ciliárnych bunkách a v lúmene vajcovodu bezprostredne pri povrchu sekrečných buniek (obr. 5, 6, 7, 8).

Celkový obraz získaný ARG analýzou potvrdzuje, že kým syntetická aktivita RNA v jadrách epitelových buniek vajcovodu je viac alebo rovnako intenzívna na 3., 6. a 9. deň cyklu, syntéza glykoproteínov je intenzívna iba na 3. deň, 6. a 9. deň sa znižuje.

Sekrečné bunky vytvárajú produkty, ktoré sú významnou súčasťou prostredia vajcovodu. Ide o granuly,

ktoré vznikajú v priebehu celého cyklu, ale ich objem kulminuje v metestre. Vylučujú sa v priebehu celého cyklu, ale najmä v estre a metestre.

V popredí záujmu sú mechanizmy, ktorými sa uplatňuje vplyv prostredia na oocyty, spermie, resp. na rané embryo. Pozitívny vplyv na prítomnosť buniek vajcovodu na fertilizačnú schopnosť spermii potvrdili Ashizawa a Nishiyama (1983). Zistili, že na nadobudnutie fertilizačnej schopnosti sa nemusia bezprostredne dotknúť spermie s bunkami vajcovodu. Usudzuje sa a existujú aj dôkazy, že proteíny vajcovodovej tekutiny ovplyvňujú vývoj embrya. Dokazujú to práce, pri ktorých Gandolfi a Moor (1987) a Rexroad a Powell (1988) kultivovali rané embryá oviec a Eyestone a i. (1987) rané embryá kráv v prítomnosti buniek vajcovodu. Shapiro a i. (1974), Fox a Shivers (1975) už skôr upozornili, že sa tubálne proteíny viažu na zónu pellucida. Tieto predstavy dokázali Kapur a Johnson (1985), keď opísali glykoproteín označený ako GP 215, ktorý sa selektívne viaže na periviteliný priestor medzi zónou pellucida a plazmatickou membránou, kde zostáva až dovtedy, kým sa zóna neuvoľní. Tento proteín sa však tvorí len v ampulárnej časti vajcovodu. Väzbu antigénov vajcovodovej tekutiny na zónu pellucida chrčka dokázali Leveille a i. (1987). Oliphant a i. (1984) upozorňujú na inhibíciu imunitnej funkcie sprostredkovanej väzbou protilátka – komplement.

Výsledky prác, ktoré sme uviedli, okrem charakteristiky sekretov potvrdzujú aj to, že špecifické makromolekulárne látky produkované sekrečnými bunkami vajcovodu sa syntetizujú predovšetkým účinkom estrogénov. Dokazujú to aj ďalšie práce s králikom (Feigelson a Kay 1972), opicou (Mastroianni a i., 1970), na človeku (Lippes a i., 1981). Konštatujú, že proteíny v tekutine vajcovodov korelujú s množstvom estrogénov práve v čase ich dominancie, keď sa tvoria a vylučujú aj sekrečné granuly, ktoré sa vplyvom progesterónu prestávajú tvoriť. Pri experimentoch *in vitro* však Erickson-Lawrence a i. (1989) zistili, že produkciu sulfátových glykoproteínov stimuluje estrogén a progesterón v kultivačnom médiu. Estrogény samé sa výraznejšie neuplatnia.

Elektrónovomikroskopické štúdium inkorporácie [5-³H]uridínu potvrdilo intenzívnu transkripciu (syntézu RNA) v jadrách ciliárnych a sekrečných epitelových buniek vajcovodu, rovnako ako intenzívnu tvorbu sekretu glykoproteínovej povahy zviditeľnenej značením [6-³H] fukózou.

Môžeme konštatovať, že zatiaľ čo syntetická aktivita RNA sa nemení, sekrečná aktivita glykoproteínov je na 3. deň luteálnej fázy najintenzívnejšia a na 9. deň klesá, najmä v sekrečných bunkách. Uvedené výsledky budú slúžiť ako podklad pre ďalšiu charakteristiku funkčných prejavov epitelu vajcovodu vzhľadom na vývoj embrya.

LITERATÚRA

Ashizawa K., Nishiyama H. (1983): Effects of oviductal cells on the maintenance of motility and fertilizing capacity of

- fowl spermatozoa stored in a diffusion chamber. *Poultry Sci.*, *62*, 2276–2279.
- Brower L. K., Anderson E. (1969): Cytological events associated with the secretory process in the rabbit oviduct. *Biol. Reprod.*, *1*, 130–148.
- Erickson-Lawrence M. F., Turner T. T., Thomas T. S., Oliphant G. (1989): Effect of steroid hormones on sulphated oviductal glycoprotein secretion by oviductal explants *in vitro*. *Biol. Reprod.*, *40*, 1311–1319.
- Eyestone W. H., Vigniere J., First N. L. (1987): Coculture of early bovine embryos with oviductal epithelium (Abstr.). *Theriogenology*, *27*, 228.
- Feigelson M., Kay E. (1972): Protein patterns of oviductal fluid. *Biol. Reprod.*, *6*, 224–231.
- Fox L., Shivers C. A. (1975): Immunological evidence for addition of oviductal components to the hamster zona pellucida. *Fertil. Steril.*, *26*, 599–608.
- Hadek R. (1955): The secretory process in the sheep's oviduct. *Anat. Rec.*, *121*, 187–205.
- Gandolfi F., Moor R. M. (1987): Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fertil.*, *81*, 23–28.
- Gorski J., Neteboen W. D., Nicplette J. A. (1965): Estrogen control of the synthesis of RNA and protein in the uterus. *J. Cell Comp. Physiol., Suppl. I*, *69*, 91–108.
- Hill J. L., Wade M. G., Nancarrow C. D., Kelleher D. C., Boland M. P. (1997): Influence of ovine oviductal amino acid concentrations and an ovine proestrus associated glycoprotein on development and viability of bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, *47*, 164–169.
- Jänne O. A. (1981): Progesterone action in mammalian uterus. *Acta Obstet. Gynecol., Scand. Suppl.*, *101*, 11–16.
- Kaňka J., Kopečný V. (1977): An autoradiographic study of macromolecular synthesis in the epithelium of the ductus epididymidis in the mouse. I. DNA, RNA and Protein. *Biol. Reprod.*, *16*, 421–427.
- Kapur R. P., Johnson L. V. (1985): An oviductal fluid glycoprotein associated with ovulated mouse ova and early embryos. *Dev. Biol.*, *112*, 89–93.
- Leveille M. C., Roberts K. D., Chevalier S., Chapdelaine A., Bleau G. (1987): Uptake of an oviductal antigen by the hamster zona pellucida. *Biol. Reprod.*, *36*, 227–238.
- Lippes J., Krasner J., Alfonso L. A., Dacalos E. D., Lucero R. (1981): Human oviductal fluid proteins. *Fertil. Steril.*, *36*, 623–629.
- Mastroianni L. Jr., Urzua M., Stambaugh R. (1970): Protein patterns in monkey oviductal fluid before and after ovulation. *Fertil. Steril.*, *21*, 817–820.
- Motlík J., Kopečný V., Trávník P., Pivko J. (1984): RNA synthesis in pig follicular oocytes. Autoradiographic and cytochemical study. *Biol. Cell.*, *50*, 229–236.
- Oliphant G., Reynolds A. B., Smith P. F., Ross P. R., Marta J. S. (1984): Immunocytochemical localization and determination of hormone induced synthesis of the sulfated glycoproteins. *Biol. Reprod.*, *31*, 165–177.
- Pivko J., Motlík J., Kopečný V., Fléchon J. E. (1982): The fate and role of macromolecules synthesized during mammalian oocyte meiotic maturation. II-autoradiographic topography of (³H)-fucose incorporation in pig oocytes cultured *in vitro*. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, *22*, 93–106.
- Pivko J., Grafenau P., Uhrín V., Kopečný V. (1998): Dynamika syntetickej aktivity RNA a glykoproteínov v epiteliálnych bunkách endometria jalovic po ovulácii. *J. Farm. Anim. Sci. (Ved. Práce VÚŽV) Nitra*, *31*, v tlači.
- Rexroad C. E. Jr., Powell A. M. (1988): Co-culture of ovine eggs with oviductal cells and trophoblastic vesicles. *Theriogenology*, *29*, 387–397.
- Schultz G. A., Heyner S. (1993): Growth factors in preimplantation mammalian embryos. *Oxf. Dev. Reprod. Biol.*, *15*, 43–81.
- Shapiro S. S., Jentsch J., Yard A. S. (1974): Isolation of an acid glycoprotein rabbit oviductal fluid and its association with the egg coating. *J. Reprod. Fertil.*, *40*, 281–290.
- Teixeira Maria L. S., Haddad A. (1988): Histochemical and radioautographic study of glycoprotein secretion in the epithelium lining the uterine tubes of mice. *Cell Tissue Res.*, *254*, 209–216.

Received: 98–09–07

Accepted after corrections: 98–10–13

Kontaktná adresa:

Prof. MVDr. Juraj Pivko, DrSc., Výskumný ústav živočíšnej výroby, Ústav reprodukcie a embryológie zvierat, Hlohovská 2, 949 92 Nitra, Slovenská republika
Tel. +421 87 54 62 76, fax +421 87 54 64 80, e-mail: repro@vuzv.sk

Oznamujeme čtenářům a autorům našeho časopisu,

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

Česká zemědělská univerzita v Praze

časopis

SCIENTIA AGRICULTURAE BOHEMICA

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

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

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

Česká zemědělská univerzita v Praze

Redakce časopisu Scientia agriculturae bohemica

165 21 Praha 6-Suchdol

EFFECT OF SALINE DRINKING WATER ON ACID-BASE BALANCE AND ELECTROLYTE LEVELS IN LAYING HEN BLOOD

VLIV SLANÉ PITNÉ VODY NA ACIDOBÁZICKOU ROVNOVÁHU A HLADINU ELEKTROLYTŮ V KRVI NOSNIC

I. Karadjole, A. Tofant, M. Vučemilo, M. Hadžiosmanović

Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

ABSTRACT: The effect of saline drinking water (Na 466.3 ± 115.6 mg/l; K 3.80 ± 2.33 mg/l; Cl 612.8 ± 152.2 mg/l) on the blood parameters of acid-base balance and electrolyte levels in laying hens was assessed. Studies were conducted at two farms for housing of Isa Brown hybrid hens. Different quality of drinking water was the only parameter which may have influenced the blood profile. Significantly higher values of blood pH ($p < 0.05$), total CO_2 ($p < 0.001$) and bicarbonates ($p < 0.01$) were recorded in the experimental group of hens supplied with saline well-water. The increased concentrations of sodium, potassium and chlorides in drinking water were found to cause significantly higher levels of these electrolytes in the blood of laying hens ($p < 0.001$). The experimental group of animals was also found to have a significantly lower level of blood glucose ($p < 0.01$).

laying hens; saline drinking water; acid-base balance; blood electrolytes

ABSTRAKT: Hodnotili jsme vliv slané pitné vody (Na $466,3 \pm 115,6$ mg/l; K $3,80 \pm 2,33$ mg/l; C $612,8 \pm 152,2$ mg/l) na parametry krve nosnic vyjadřující acidobazickou rovnováhu a hladiny elektrolytů. Studie probíhaly na dvou farmách, kde jsou chovány nosnice hybridu Isa Brown. Rozdílná kvalita pitné vody byla jediným ukazatelem, který mohl ovlivňovat krevní obraz. V pokusné skupině nosnic, která dostávala slanou studniční vodu, jsme zaznamenali významně vyšší hodnoty pH ($p < 0,05$), celkového CO_2 ($p < 0,001$) a bikarbonátů ($p < 0,01$) v krvi. Zjistili jsme, že vyšší koncentrace sodíku, draslíku a chloridů v pitné vodě byly příčinou významně vyšších hladin těchto elektrolytů v krvi nosnic ($p < 0,001$). Pokusná skupina nosnic vykazovala také významně nižší hladinu glukózy v krvi ($p < 0,01$).

nosnice; slaná pitná voda; acidobazická rovnováha; elektrolyty v krvi

INTRODUCTION

From the aspects of health, water quality must be safe for drinking and watering, which means that the physicochemical and microbiological parameters should be within the allowed limits (Anonymous, 1993, 1994). A reduced quality of drinking water greatly influences the health and growth of animals, their productivity, feed and water consumption. Drinking water containing dissolved salts above 1 000 ppm is considered saline. Blood components, electrolytes, and retention and excretion of minerals, are changed by drinking saline water, and these changes increase with elevation of the salt concentration. An increase in the intake of water containing high levels of minerals leads to an increase in plasma electrolytes. However, drinking water which contains high levels of salts is toxic to all species (Fayez et al., 1994).

The impact of drinking water on the growth and productivity of poultry was described by many authors (Mitchan and Wobster, 1988; Balnave, 1993; Hadžiosmanović et al., 1997). Generally, they all reached the

same conclusions, pointing to a decline in the growth, weight and productivity indicators due to the intake of saline drinking water.

The effect of contaminated drinking water containing a high chloride concentration on blood profile in geese was described by Bombik (1997). The higher the drinking water contamination, the lower the values of hematologic indices, erythrocyte count, hematocrit and hemoglobin, as well as of the parameters of egg-laying.

This investigation was based on the same experiment which were partially published by Hadžiosmanović et al. (1997), describing the effect of saline drinking water on laying hen productivity.

The aim of the present study was to assess the effect of saline well-water on the parameters of acid-base balance and electrolyte levels in the blood of laying hens.

MATERIAL AND METHODS

During this one-year study, the effect of drinking saline well-water on laying hen productivity as well as

on acid-base balance and electrolyte levels in blood was assessed.

Laying hens were divided into control group supplied with safe town water and experimental group supplied with the water from a deep artesian well found to be saline.

Laying hens drank water *ad libitum* from drinking nipples.

Housing of birds, microclimate as well as the methodology of hygienic water quality, testing of water physicochemical and bacteriological parameters and metal content, were previously described (Hadžiosmanović et al., 1997).

After 12 months of keeping, blood was obtained on two occasions from the cutaneous ulnar vein of 15 randomly chosen birds from the experimental and control group each. Acid-base parameters of blood pH, partial oxygen pressure (pO₂), oxygen saturation, partial carbon dioxide pressure (pCO₂), total carbon dioxide content, and bicarbonates were measured by a blood gas analyzer (ABL-3, Radiometer). Blood glucose was determined by the GOD-PAP method with commercial diagnostic kits (Boehringer, Mannheim). Blood levels of sodium, potassium and chlorides were determined by a Cobas Mira Plus Roche Diagnostic System with ISE Sodium, ISE Potassium and ISE Chloride electrodes.

Statistical analysis was performed using a Statgraphics software version 6.0.

RESULTS

The quality of drinking water supplied to the experimental and control group of animals was tested by the

use of physicochemical, bacteriological and metal content parameters against the maximal allowed concentrations according to the Croatian guideline values (Anonymous, 1994) and WHO recommended values (Anonymous, 1993). The experimental group was found to be supplied with water of inadequate quality, as previously described. The greatest increase was recorded in the values of electric conductivity ($3.037 \pm 1.714 \mu\text{S/cm}$), chloride ($612.8 \pm 152.2 \text{ mg/l}$) and sodium ($466.3 \pm 115.6 \text{ mg/l}$).

Comparison of the parameters of acid-base balance between the experimental and control group of animals supplied with saline well-water and town water, respectively, showed the former to have a significantly increased blood pH (Tab. I), and highly significantly increased values of total carbon dioxide ($p < 0.001$) and bicarbonates ($p < 0.01$).

As shown in Tab. II, the level of blood glucose was significantly ($p < 0.01$) lower in the experimental than in the control group of hens. The experimental group of hens also had statistically significantly increased levels of all electrolytes observed, i.e. sodium, potassium and chloride.

Pearson's coefficients of linear correlation between all blood parameters observed are presented in Tab. III, separately for the experimental and control group of animals. In the control group of animals, a significant negative correlation was found for partial oxygen pressure (pO₂) with the levels of potassium ions and blood bicarbonates (-0.511 and -0.506 , respectively; $p < 0.05$), and significant positive correlation between blood oxygen saturation and blood pH (0.630 , $p < 0.01$). This group of hens also showed a significant positive correlation of total CO₂ with blood bicarbonate level

I. Acid-base balance parameters in animal blood

Parameter	Control group ($\bar{x} \pm SD$)	Experimental group ($\bar{x} \pm SD$)
pH	7.29 ± 0.05	$7.32 \pm 0.03^*$
pO ₂ (kPa)	6.49 ± 0.91	6.72 ± 0.97
O ₂ saturation	0.73 ± 0.10	0.68 ± 0.12
pCO ₂ (kPa)	7.25 ± 0.65	7.55 ± 0.88
Total CO ₂ (mmol/l)	25.75 ± 1.05	$27.45 \pm 1.24^{***}$
Bicarbonates (mmol/l)	23.64 ± 1.57	$25.45 \pm 1.26^{**}$

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

II. Levels of glucose, and of sodium (Na), potassium (K) and chloride (Cl) ions in animal blood

Parameter	Control group ($\bar{x} \pm SD$)	Experimental group ($\bar{x} \pm SD$)
Glucose (mmol/l)	10.79 ± 1.36	$9.33 \pm 1.39^{**}$
Na (mmol/l)	140.20 ± 1.65	$144.07 \pm 1.67^{***}$
K (mmol/l)	5.16 ± 0.36	$5.83 \pm 0.29^{***}$
Cl (mmol/l)	115.40 ± 2.41	$121.87 \pm 2.70^{***}$

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

III. Linear correlations between animal blood parameters (above diagonal: control group; below diagonal: experimental group)

Parameter	Control group									
	Glucose	Na	K	Cl	Bicarbonates	pH	pO ₂	Sat. O ₂	pCO ₂	Total CO ₂
Glucose		0.118	0.137	-0.016	-0.118	-0.393	0.187	0.420	-0.373	-0.439
Na	0.323		0.218	-0.272	-0.220	0.115	-0.041	-0.435	0.282	-0.011
K	-0.098	-0.180		0.053	0.148	-0.272	-0.511*	-0.129	0.283	0.338
Cl	0.018	-0.030	-0.095		0.291	-0.035	-0.029	-0.155	-0.408	-0.198
Bicarbonates	-0.163	0.259	-0.214	0.151		0.227	-0.506*	0.004	0.034	0.598*
pH	-0.502*	-0.721**	0.058	0.331	-0.236		0.254	0.129	0.175	0.090
pO ₂	0.182	0.349	-0.349	-0.043	-0.012	-0.179		0.630**	-0.270	-0.673**
O ₂ saturation	0.425	-0.060	-0.190	0.194	0.031	-0.266	-0.024		-0.140	-0.422
pCO ₂	-0.074	0.280	0.366	-0.136	-0.135	-0.274	0.032	0.055		0.425
Total CO ₂	-0.202	0.347	-0.233	0.064	0.868***	-0.259	0.014	0.049	0.147	
	Experimental group									

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

(0.598, $p < 0.05$), and negative correlation with blood oxygen saturation (-0.673, $p < 0.01$).

The experimental group of animals showed substantially different correlations between the investigated parameters. There was a significant negative correlation of blood pH with the levels of blood glucose (-0.502, $p < 0.05$) and sodium ions (-0.721, $p < 0.01$). A highly significant positive correlation was found between the blood levels of bicarbonates and carbon dioxide (0.868, $p < 0.001$). The significant or highly significant positive or negative correlations formed in the control group (Tab. III) are consistent with the known physiological inter-relationships of the investigated parameters (Bell and Freeman, 1971).

In the experimental group, however, which drank saline water, statistically significantly different values of almost all blood parameters were recorded. This group of hens was exposed to continuous metabolic stress which, in our opinion, must have reflected on the correlation between these parameters.

A more detailed physiological or pathophysiological explanation of the positive or negative correlations detected, obviously requires further studies.

DISCUSSION

No health-based guideline values are proposed for sodium and chloride in drinking water. However, chloride concentrations in excess of about 250 mg/l and sodium concentrations in excess of 200 mg/l may give rise to unacceptable or undesirable taste (Anonymous, 1993). Reports on the effect of saline drinking water on the blood electrolyte levels are conflicting. Many authors described the effect of drinking water sodium chloride on the blood electrolyte levels in sheep and goat (Fayez et al., 1994). In the literature available to us (Balnave et al., 1987, 1988), however, the same effect on poultry was tackled in a few studies only. The same

applies to the issue of acid-base balance. In our study, significantly higher values of blood pH, total CO₂ and bicarbonates were recorded in the experimental group of hens (Tab. I). These results are inconsistent with those reported by Yoselewitz et al. (1988), who found an increase in partial carbon dioxide pressure (pCO₂) but no significant changes in blood bicarbonate levels in hens supplied with drinking water with the addition of NaCl. Balnave et al. (1989) found no significant changes in blood pH, pCO₂ and bicarbonate levels in second-year laying hens supplied with drinking water with the addition of 2 000 mg/l NaCl. They conclude that the addition of salt to drinking water has no significant effect on the blood acid-base balance in hens.

In the present study, the experimental group of animals had a decreased level of blood glucose, and increased levels of sodium, potassium and chloride ions in the blood (Tab. II). The higher levels of electrolytes could be explained by the fact that the hens drank well-water containing a 29.5-fold concentration of sodium, 19.3-fold concentration of chloride, and 1.9-fold concentration of potassium, as compared to the control group of animals. It appears quite logical that the several-fold amount of electrolytes in drinking water entailed their increased levels in the animal blood. Balnave et al. (1989) also found a significant increase in blood levels of sodium and chloride, but not of potassium in hens supplied with saline water.

To the best of our knowledge, no studies of the effect of saline drinking water on the level of blood glucose have appeared in the available literature. The significant decrease in blood glucose observed in the experimental group of hens in the present study could be interpreted as a consequence of the increased transport of glucose and salt through membranes into tissue cells. The cellular metabolism of glucose produces energy (ATP), which is then mostly used to maintain the sodium and potassium gradient via sodium/potassium ATP-ase. Under physiological conditions, the cells

should actively release sodium and take potassium. With increased salt intake from drinking water, the body is exposed to a metabolic stress, resulting in increased energy requirements to maintain the sodium/potassium gradient, which accounts for the decreased concentration of blood glucose, and decreased levels of blood CO₂, bicarbonates, pH, and to a lesser extent of oxygen.

REFERENCES

- Anonymous (1993): Guidelines for drinking water quality. WHO Recommendations, Vol. 1.
- Anonymous (1994): By-law on drinking water safety. Official Gazette of the Republic of Croatia, 46, 1575-1596.
- Balnave D. (1993): Influence of saline drinking water on eggshell quality and formation. *World Poultry Sci. J.*, 49, 109-119.
- Balnave D., Yoselewitz I. (1987): The relation between sodium chloride concentration in drinking water and eggshell damage. *Brit. J. Nutr.*, 58, 503-509.
- Balnave D., Yoselewitz I. (1988): Egg shell quality is affected by salinity in water. *Poultry Int.*, 4, 16-17.
- Balnave D., Yoselewitz I., Dixon R. J. (1989): Physiological changes associated with the production of defective eggshell by hens receiving sodium chloride in the drinking water. *Brit. J. Nutr.*, 61, 35-43.
- Bell D. J., Freeman B. M. (eds.) (1971): *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*. Vol. 1. London, New York, Academic Press.
- Bombik T. (1997): The effect of groundwater pollution on the health and reproduction in geese. In: *Proc. 9th Int. Congr. Anim. Hyg.*, Helsinki, 315-318.
- Fayez, M., Marai I., Alnaimy M., Habeeb A. (1994): Effect of salinity of drinking water on farm animals. In: Ap Dewi I., Axford R. F. E., Fayez M., Marai I., Omed H. (eds): *Pollution in Livestock Production Systems*. Wallingford, CAB International, 119-135.
- Hadžiosmanović A., Vučemilo M., Venglovsky J. (1997): Effect of saline drinking water on laying hen productivity. *Vet. - Med. Czech.*, 42, 295-298.
- Mitchan S. M., Vobster G. (1988): Toxic effects on natural saline waters on mallard ducklings. *J. Wildlife Dis.*, 24, 45-50.
- Yoselewitz I., Balnave D., Dixon R. J. (1988): Factors influencing the production of defective eggshells by laying hens receiving sodium chloride in drinking water. *Nutr. Rep. Int.*, 38, 697-703.

Received: 98-04-06

Accepted after corrections: 98-10-26

Contact Address:

Prof. Ivo Karadjole, Ph.D., Department of Animal Breeding, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Heinzelova 55, 10000 Zagreb, Croatia
Tel. +385 1 2390 220, fax +385 1 2390 121, e-mail: karadjole@usa.net

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF BACTERIA AND ITS DETERMINATION IN VETERINARY MEDICINE

BAKTERIÁLNÍ REZISTENCE NA ANTIBIOTIKA A JEJÍ STANOVENÍ VE VETERINÁRNÍ MEDICÍNĚ

J. Schlegelová, D. Ryšánek

Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: The current knowledge of genetic principles of antibiotic resistance in bacterial pathogens is based above all on results of investigations of human bacterial strains. It has been demonstrated that genetic factors of resistance, including plasmids and transposons, can be transmitted within human and animal populations and between them. While the human medicine are available standard methods for the determination of antibiotic resistance in bacteria and the results of resistance tests are interpreted in terms of clearly defined criteria, no standard methods and interpretation criteria have been laid down for veterinary medicine. Therefore, studies of antibiotic resistance in veterinary medicine should concentrate on standardization of methods and formulation of interpretation criteria based on results of resistance tests in a large set of pathogenic agents. The definition of the criteria should result from the concept of resistance as a genetically based characteristic of a bacterial strain alone. The interpretation criteria should be based on the elaboration of a frequency histogram in terms of MIC values and sizes of diffusion zones without considering levels of the antimicrobial agent *in vivo*. It is suggested to emphasize the categorization of resistance in terms of concentrations of antimicrobial agents and the categorization in terms of resistance as a persistent quality. Such studies are justified not only by the urgency to cope with the problem of resistance as such, but also by the necessity to improve the protection of animal and human health.

antibiotics; resistance; bacteria; genetics; methods; interpretation

ABSTRAKT: Současné znalosti genetických základů rezistence na antibiotika bakteriálních původců onemocnění jsou založeny především na studiu kmenů izolovaných od lidí. Bylo prokázáno, že genetické vektory rezistence, plazmidy a transpozony, mohou přecházet mezi různými bakteriálními původci onemocnění jak u lidí a u zvířat, tak i mezi nimi. Zatímco v humánní medicíně jsou diagnostické metody stanovení citlivosti bakterií na antibiotika standardizovány a výsledky interpretovány podle definovaných kritérií, v oblasti veterinární medicíny nejsou metody a především interpretační kritéria jednoznačně vymezeny. Studie rezistence ve veterinární medicíně by měly být směřovány na standardizaci postupů jejího stanovení, především však na stanovení interpretačních kritérií rezistence, a to na základě vyšetření rezistence na antibiotika u velkého souboru patogenních mikroorganismů. Východiskem konstrukce interpretačních kritérií ve veterinární medicíně by mělo být chápání rezistence pouze jako geneticky podmíněné vlastnosti bakteriálního kmene. Interpretační kritéria by měla být založena na konstrukci histogramu četnosti kmenů podle hodnot MIC a velikosti difuzních zón, avšak bez přihlídnutí k hladinám antimikrobiální látky *in vivo*. Navrhujeme klást větší důraz na kategorizaci rezistence podle koncentrace antimikrobiální látky a na kategorizaci rezistence podle její perzistence. Důvodem pro tyto studie je nejen řešení problému rezistence na antibiotika jako takového, ale především ochrana zdraví zvířat a lidí.

antibiotika; rezistence; bakterie; genetika; postupy; interpretace

Seznam použitých zkratk: DNA – deoxyribonukleová kyselina, MIC – minimální inhibiční koncentrace, MRSA – methicilin-rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus*, PAE – post-antibiotický účinek.

CONTENTS

1. Introduction
2. Studies of antibiotic resistance in veterinary medicine

- 2.1. Genetic mechanisms and dissemination of resistance
- 2.2. Determination of resistance in veterinary medicine

3. Conclusion
4. References

OBSAH

1. Úvod
2. Studium rezistence na antibiotika ve veterinární medicíně
 2. 1. Genetické mechanismy a diseminace rezistence
 2. 2. Stanovení rezistence ve veterinární medicíně
3. Závěr
4. Literatura

1. ÚVOD

Antibiotické přípravky jsou ve veterinární medicíně často používány nejen k terapii, nýbrž i k prevenci bakteriálních onemocnění zvířat. Úspěšnost léčby závisí mimo jiné na citlivosti či rezistenci patogena na aplikované antibiotikum.

Podle Světové zdravotnické organizace je rezistence na antibiotika schopnost bakteriální populace přežít účinek inhibiční koncentrace antimikrobiálního přípravku (Lochmann, 1994).

Nedodržování racionálních zásad antibiotické politiky v používání antimikrobiálních přípravků (nevhodným výběrem přípravku, nedostatečnou terapeutickou dávkou, dobou podávání aj.) vede k nárůstu počtu rezistentních bakteriálních populací (Levy, 1998). Potencionální příčinou vzniku rezistentních kmenů mohou být i interakce antimikrobiálních přípravků s pesticidy (Bordas aj., 1995).

Trvalá rezistence k příslušnému antibiotiku u původně citlivého kmene může vzniknout na základě změn v genomu bakterie, a to delecí nukleotidů, insercí transpozonů a přirozenou mutací. Chromozomálně lokalizovaná rezistence obvykle způsobuje změny v existujících buněčných strukturách. Buňky se stávají impermeabilní k antibiotiku, anebo je pozměněn cílový receptor pro antibiotikum uvnitř mikroorganismu (Elwell a Falkow, 1986). Změny jsou dědičné v následných generacích, vedou i k pozměnění fenotypu rezistence. Příkladem takto vzniklé rezistence je jednostupňová rezistence na streptomycin u kmenů *Staphylococcus aureus* (Mass, 1986).

Závažnějším medicínským problémem je pak rezistence získaná. Metodami molekulární genetiky bylo zjištěno, že odpovědnost za tento typ rezistence nesou především extrachromozomální útvary R plazmidy a transpozony (Mass, 1986). Rezistence zprostředkovaná R plazmidy obecně vede k syntéze proteinů, které mohou enzymaticky destruovat terapeutický přípravek, modifikovat antibiotikum do neúčinné formy nebo vstupují do interakce s buněčnou stěnou a tvoří ji nepropustnou pro antibiotikum (Elwell a Falkow, 1986). Přenos těchto genů z jedné buňky na ostatní buňky se děje transformací – donorová DNA je volně v roztoku, transdukci – fágem zprostředkovaný přenos DNA a konjugací – přímým kontaktem mezi donorem DNA a re-

cipientní buňkou (Mass, 1986). Tento mechanismus se uplatňuje například ve vnitro- a mezidruhové diseminaci rezistence k aminoglykosidovým a jiným antibiotikům u *Staphylococcus* spp. (McDonnell aj., 1983).

Schwarz a Blobel (1990) odhalili strukturální podobnost mezi plazmidy, které kódovaly tytéž fenotypové znaky rezistence, a které pocházely z odlišných stafylokokových druhů, z odlišných hostitelských druhů a z rozdílných světových teritorií. Upozorňují na možnou, mnohem vyšší výměnu plazmidů mezi stafylokoky pocházejícími od lidí a zvířat *in vivo*, než v experimentálních studiích *in vitro*.

Bylo prokázáno, že některé bakteriální kmeny vykazují rezistenci k více než jednomu antibiotiku (Schwarz a Blobel, 1989, 1990; Buragohain a Dutta, 1990 a další). Mnohočetná rezistence na antibiotika byla častěji pozorována u koaguláza-negativních stafylokoků než u kmenů *S. aureus*, a to izolovaných od lidí (Tripodi aj., 1994) i zvířat (Owens a Watts, 1988). Z 83 kmenů koaguláza-negativních stafylokoků izolovaných z mléka ovcí bylo 48 kmenů rezistentních ke dvěma a více antimikrobiálním látkám, a to nejčastěji k trimethoprimu, sulfonamidům, tetracyklinu, streptomycinu, ke kombinaci trimethoprimu se sulphamethoxazem a k chloramfenikolu (Burriel, 1997).

Experimentálně byl dokázán konjugativní přenos genů rezistence z multirezistentního klinického kmene *S. haemolyticus* na jiné koaguláza-negativní kmeny rodu *Staphylococcus* a na jeden restriktně deficitní kmen *S. aureus* (Udo aj., 1997). Vektor vysoké rezistence na mupirocin (MIC > 1000 mg/l) plazmid pXU10 byl schopen mobilizovat nekonjugativní plazmidy vlastního kmene i kmene *S. aureus*.

Šíření mnohočetné rezistence na antibiotika může dosáhnout epidemického charakteru. V Anglii bylo u lidí podle současných nálezů zaznamenáno zvyšující se množství mnohočetně rezistentních izolátů *Salmonella typhimurium* pocházejících z potravy. Mnoho z těchto izolátů bylo rezistentních k ampicilinu, chloramfenikolu, gentamycinu, neomycinu, streptomycinu a trimethoprim-sulfadoxinu. Rezistence byla kódována geny lokalizovanými na chromozomech nebo plazmidech (Franklin a Jansson, 1996). Bylo zaznamenáno, že mnohočetně rezistentní kmen *S. typhimurium* DT 104 způsobil v letech 1990 až 1996 četná onemocnění krav a šíří se mezi dalšími hospodářskými zvířaty (Russell, 1998).

Vážným celosvětovým problémem je šíření methicilin-rezistentních kmenů *S. aureus* (MRSA) (Chambers, 1988). Většina MRSA kmenů je rezistentní k dalším déle používaným antibiotikům, jako aminoglykosidům, makrolidům, linkosamidům, tetracyklinům, ale i k fluorchinolonům (Maple aj., 1989). Mechanismus rezistence těchto kmenů, šíření a diskriminace epidemických a neepidemických MRSA kmenů jsou předmětem mnoha studií (Tripodi aj., 1994; Ryffel aj., 1994; Fréney aj., 1994; Arpin aj., 1996 a další). Ve veterinární medicíně byla diseminace methicilin-rezistentních kmenů *S. aureus*, izolovaných z mléčné žlázy krav, za-

znamenána autory Devriese a Hommez (1975) a nově mezi kmeny *S. epidermidis* (čtyři kmeny) a *S. xyloso* (tři kmeny) izolovanými z mléka ovcí (Burriel, 1997). Pro identifikaci MRSA kmenů při testování citlivosti na antibiotika je preferováno použití oxacilinu, suplementace média Mueller-Hintonova bujónu NaCl (2 g/l), inkubační teplota 35 °C a inkubace až 24 hodin (NCCLS, 1990). Je pravděpodobné, že doposud používané testy ve veterinární medicíně nerespektovaly tento fakt a cílenému odhalování těchto kmenů nebyla věnována pozornost.

2. STUDIUM REZISTENCE NA ANTIBIOTIKA VE VETERINÁRNÍ MEDICÍNĚ

2. 1. Genetické mechanismy a diseminace rezistence

Údaje o genetických studiích rezistence nejsou ve veterinární mikrobiologii četné. Důležitá je ovšem skutečnost, že existují shody mezi kmeny izolovanými od lidí a zvířat ve frekvenci rezistence k penicilinu, tetracyklinu, erytromycinu (Noble, 1996) a aminoglykosidům (Calzolari aj., 1995) a v narůstající prevalenci rezistentních kmenů s používáním těchto antibiotik.

Diference mezi rezistencí k antibiotikům u stafylokoků izolovaných od lidí a zvířat není zásadní a týká se chromozomální versus plazmidem navozené rezistence a úrovně rezistence genově determinované. Rezistence u kmenů *S. intermedius*, pocházejících ze psů, jsou častěji lokalizovány chromozomálně, zatímco u kmenů *S. hyicus* (Schwarz a Blobel, 1989) a dalších druhů stafylokoků od prasat a *S. aureus* a *S. epidermidis* od lidí jsou lokalizovány hlavně na plazmidech (Noble, 1996).

Studiem plazmidových profilů 85 kmenů *S. aureus*, izolovaných v 18 stádech z mléka krav stížených chronickou mastitidou, byla zjištěna jejich heterogenita a s ní spojený fenotypový projev rezistence. Kmeny *S. aureus* rezistentní k penicilinu a streptomycinu, izolované z devíti odlišných stád, vykazovaly obdobný plazmidový profil. Na základě tohoto zjištění lze uvažovat o geografickém šíření určitých kmenů *S. aureus*. Kmeny citlivé k antibiotikům plazmidy obsahovaly zřídka (Baumgartner aj., 1984).

Vzájemnou diseminaci rezistence mezi zvířecí a lidskou populací lze považovat za pravděpodobnou. Nebezpečí přenosu vektorů rezistence mezi zvířecí a lidskou populací zaznamenal Lacey (1980). U dvou kmenů *S. aureus* izolovaných od lidí zjistil konstitutivní rezistenci na všechna makrolidová antibiotika a citlivost na spektinomycin, což je typ rezistence charakteristický pro tylosin-rezistentní kmeny izolované od zvířat. Tylosin je antimikrobiální látka používaná pouze u zvířat.

Mezi 279 kmeny *Escherichia coli*, rezistentními na trimethoprim a izolovanými od prasat ve Švédsku, bylo 11 % kmenů nositelem genu dhfr IX. Nově charakterizovaný gen byl nalezen na konjugativním plazmidu způsobujícím rezistenci k trimethoprimu na hladině

250 mg/l. Vyšetřením více než 400 „enterobakteriálních“ kmenů rezistentních na trimethoprim izolovaných od lidí, byl však v jednom případě tento gen doložen i u lidí. Vzhledem k sportovnímu charakteru genu je pravděpodobně jen otázkou času, kdy se gen rezistence rozšíří u lidí i u jiných živočišných druhů (Jansson aj., 1992).

Možnost prevalence rezistentních kmenů *S. aureus* interspecifickým přenosem z koaguláza-negativních rezistentních stafylokoků bovinní mléčné žlázy a mezi různými koaguláza-negativními stafylokoky studovali Muhammad aj. (1993). Přenos rezistence k penicilinu, tetracyklinu a erytromycinu nebyl prokázán, z 51 pokusů přenosu rezistence ke streptomycinu bylo úspěšných devět. Zaznamenaný byl jeden přenos na kmen *S. aureus*. I když práce nepotvrdila jednoznačně přenos rezistence mezi stafylokoky, pocházejícími z mléčné žlázy skotu, autoři úlohu koaguláza-negativních stafylokoků v diseminaci antibiotické rezistence nevyklučují.

Z hlediska ohrožení lidského zdraví je závažné používání antibiotik jako krmných aditiv. Ačkoliv není zcela objasněno jakým způsobem je růst zvířat antibiotikem stimulován, je na druhé straně evidentní, že dlouhodobé podávání nízkých dávek antibiotik v krmivu selektivně zvyšuje počet rezistentních bakterií (Levy, 1998).

Bylo zjištěno, že u enterokoků byla rezistence k aditivu, ke glykopeptidovému antibiotiku avoparcinu, zprostředkována genem vanA, který kóduje rovněž rezistenci k vankomycinu a teikoplaninu (Björnerot aj., 1996). Vankomycin je v humánní medicíně antibiotikem poslední volby u vážných stafylokokových a enterokokových infekcí (Lochmann, 1994). Přenos genů vanA z enterokoků na mnohočetně rezistentní kmeny *S. aureus* je kdykoliv možný a je pravděpodobné, že v nemocnicích tato diseminace rezistence již probíhá.

2. 2. Stanovení rezistence ve veterinární medicíně

Výběr terapeutických přípravků pro léčbu infekčních onemocnění způsobovaných bakteriemi, se děje na základě zjištění baktericidní, resp. bakteriostatické účinnosti uvažované látky. Ve skutečnosti se jedná o zjištění, do jaké míry je bakteriální organismus vybaven mechanismy rezistence vůči terapeutickému přípravku. Daného faktu a z něho odvozených závěrů využívají jak bakteriologické testy pro zjišťování reziduí inhibičních látek (Charm a Chi, 1988; Kogan aj., 1995), tak v prvé řadě navrhovatelé terapeutické dávky.

Pro stanovení citlivosti, resp. rezistence na antimikrobiální látky jsou používány tři principiálně odlišné metody stanovení, a to diluční v agaru (Ericsson a Sherris, 1971), diluční v bujónu (Gavan a Barry, 1980) a disková difuzní metoda (Bauer aj., 1966). V posledních letech je ke stanovení citlivosti používán i Epsilon test, u kterého je stanovení založeno na difuzi antimikrobiální látky z testovacího proužku s odstupňovanou koncentrací látky (Baker aj., 1991).

Výsledkem Epsilon testu a dilučních testů pro stanovení rezistence na antimikrobiální látky je kvantitativní údaj MIC. Hodnota udává takovou koncentraci antibiotika ve dvojnásobné řadě ředění, při které není zaznamenán žádný růst mikroorganismu. Výsledkem diskového difuzního testu je kvalitativní údaj o citlivosti vydaný na základě velikosti zóny, ve které je růst mikroorganismu inhibován antimikrobiální látkou difundující z disku.

Výsledek testů je značně ovlivňován volbou média, suplementací média, velikostí inokula, teplotou aj. (Sheris, 1977). Testy jsou používány obecně v humánní i veterinární diagnostice bakteriální rezistence na antibiotika.

Pokud přijmeme z humánní medicíny filozofii kategorizace citlivých, resp. rezistentních bakteriálních kmenů, potom rozhodnutí o rezistenci či citlivosti u kmenů izolovaných ze zvířat bude ztíženo nesnadnou definicí „breakpointů“ pro jednotlivé antimikrobiální látky. Prostředky pro jeho konstrukci používané v humánní medicíně, a to stanovení MIC, farmakokinetika přípravku v místě působení terapeutického přípravku u hostitelského druhu a klinická účinnost terapie, nebyly doposud pro veterinární oblast validovány. Diference ve farmakokinetice antimikrobiálních přípravků u různých živočišných druhů vede k vývoji odlišných, ale i shodných interpretačních kritérií rezistence patogenů izolovaných od různých zvířat (Watts a Yancey, 1994).

Pro studia rezistence bakteriálních kmenů, pocházejících od zvířat, byla doposud používána interpretační kritéria převzatá z humánní diagnostiky vnímavosti bakteriálních původců onemocnění k antibiotikům (Owens a Watts, 1988; Matthews aj., 1992). Pro veterinární diagnostiku byla tato kritéria upřesňována stanovením jednoduchých „breakpointů“ použitím dilučních testů a difuzních testů a jejich konfrontací (Owens aj., 1990; Thornsberry aj., 1993; Owens aj., 1997; Thornsberry aj., 1997).

Kromě uvádění charakteristik MIC, MIC 50 a MIC 90, modální MIC a rozpětí MIC (Papp a Muckle, 1991; Matthews aj., 1992; Šedivá aj., 1994; Wegener aj., 1994; Watts aj., 1995; Salmon aj., 1995; Watts a Salmon, 1997, aj.) byla data pro stanovení interpretačních kritérií rezistence na antibiotika ve veterinární medicíně sledována a zveřejňována ojedinelé (Burrows, 1985; Soback, 1987; Burton aj., 1996; Owens aj., 1997).

Charakteristiky MIC byly dilučními metodami obvykle zjišťovány při hodnocení účinnosti antibiotických terapeutických přípravků proti bakteriálním původcům onemocnění zvířat. Hodnoty MIC umožňují kvantifikovat terapeutickou dávku, ale současně tyto charakteristiky MIC obsahují informace o rezistenci mikroorganismů na antibiotika. Narůstající diference v rozpětí MIC, dále posun charakteristiky MIC 90 do vyšších hodnot, u původně citlivých kmenů jednoho bakteriálního druhu, je signálem narůstající rezistence vůči antimikrobiální látce. Z tohoto pohledu je sjednocení používaných metod pro stanovení rezistence na antibiotika závažné.

Laboratoře humánní medicíny mohou využívat pro stanovení citlivosti na antibiotika komerčně připravené testy a systémy se softwarovou podporou, např. Sceptor System (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Towson, USA) nebo ATB Expression System (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) aj. I když byla komparativně se standardními metodami posuzována vhodnost testů pro vyšetřování klinických izolátů získaných od zvířat (Papp a Muckle, 1991; Myllys aj., 1992), případně byly tyto testy pro veterinární diagnostiku modifikovány (Sensititre Veterinary Research Plate, Seward Laboratories, London, UK), rigorózní validace těchto systémů ve veterinární medicíně chybí.

Při stanovení MIC antibiotik jakoukoliv *in vitro* metodou, jsou podmínky, ve kterých je bakteriální kmen sledován zcela odlišné podmínkám *in vivo*. Příkladem je diferentní působení antibiotik při stanovení MIC na mikrotitrační destičce v Mueller-Hintonově bujónu a ve fluidním prostředí mléka mléčné žlázy. Odlišně se v těchto podmínkách chová především závažný patogen mléčné žlázy krav *S. aureus*. V mléce tvoří na povrchu polysacharidovou vrstvu, která chrání bakterii proti navázání či pronikání antibiotik (Opdebeek aj., 1988).

Pro farmakokinetická šetření antibiotických preparátů je nejnáze přístupná mléčná žláza skotu. Farmakokinetikou antibiotických přípravků pro terapii mastitid se zabýval Soback (1987). K demonstraci procesů formuloval farmakokinetické rovnice, ve kterých zohlednil dobu účinnosti antibiotik a způsob aplikace antibiotických přípravků.

K růstové inhibici příslušných mikroorganismů v mléce je nutná několikrát vyšší koncentrace antibiotik v porovnání s bujónovou kulturou (Sandholm a Louhi, 1991). Suprese antibiotik v mléce byla zaznamenána u makrolidů, aminoglykosidů, vankomycinu a kombinace trimethoprimu se sulfadoxinem. Nižší antimikrobiální aktivity antibiotik v mléce může být vysvětlena vazbou antibiotik na tukové kapénky a kazein mléka, případně vazbou vápenatých iontů mléka. Naopak nižší hodnoty inhibičních koncentrací u β -laktamových antibiotik hovoří o synergismu mezi endogenními inhibitory bakteriálního růstu a touto skupinou antibiotik.

Po aplikaci kombinovaného antibiotického přípravku s penicilínem (100 000 I.U. Penicillinu G) a novobiocinem (150 mg Novobiocinu) do mléčné žlázy, byla hladina těchto antibiotik v mléce rozhodujícím parametrem ke konstrukci MIC „breakpointu“ β -laktamových antibiotik pro kategorizaci patogenů mléčné žlázy (Thornsberry aj., 1997). Interpretační kritérium diskové difuzní metody bylo pak určeno na základě kombinace regresní analýzy a „error-rate bounding“.

Vztahem mezi citlivostí patogenů mléčné žlázy, stanovené *in vitro* testy, a úspěšností terapie se zabývali Owens aj. (1997). Šetřením po 28 dnech od terapeutického zákroku zjistili, že terapie kombinovaným antibiotickým přípravkem byla úspěšná ze 70 až 90 % u všech diagnostikovaných patogenů. Výjimku tvořila

chronická, více než čtyři týdny trvající onemocnění mléčné žlázy způsobovaná *S. aureus*. Úspěšnost terapie v těchto případech byla nižší (35 %), přestože všechny kmeny byly citlivé na penicilin i novobiocin.

Hodnocení MIC a hodnocení klinické účinnosti terapie mohou být v rozporu. Při stanovování MIC antibiotických přípravků u kmenů některých rodů bakterií (*Staphylococcus*, *Pneumococcus*) je nutno brát na zřetel existenci tzv. tolerantních kmenů (Tomasz aj., 1970). Tyto kmeny způsobují klinické problémy. Vykazují hodnotu MIC citlivých kmenů, ale bakterie těchto kmenů nejsou zabíjeny a přežívají za vyšších koncentrací antibiotik. U klinických izolátů *S. aureus* s nízkou hodnotou MIC, bylo zjištěno až 44 % kmenů tolerantních k penicilinu (Sabath aj., 1977). U těchto kmenů je pak indikováno stanovení minimální baktericidní koncentrace, které odhalí tento typ rezistence (Mass, 1986).

Klinická účinnost terapie zánětu mléčné žlázy způsobovaných *S. aureus* může být zkrácena vznikem L forem tohoto patogena vlivem antibiotik. V tomto stádiu může patogen perzistovat v mléčné žláze s remanifestací symptomů onemocnění po skončené terapii (Sears aj., 1987; Owens, 1988).

Speciálním případem účinku antibiotik je post-antibiotický účinek (PAE). OWENS et al. (1993) sledovali PAE vybraných antibiotik proti *S. aureus* kmen Newbould 305. Zjistili rozdíly v PAE u tohoto kmene z kultury *in vivo* oproti kultuře *in vitro*. Dále byl zaznamenán odlišný PAE u některých antibiotik. Minimální efekt na PAE byl zaznamenán u novobiocinu. PAE antibiotik je nutno brát v úvahu při určování intervalu terapeutického zásahu, určování koncentrace aplikovaného antibiotika, ale i při posuzování klinické účinnosti terapie.

Z uvedeného přehledu vyplývá, že prostředí, humorální a celulární obranné mechanismy biologického jedince, značně ovlivňují farmakokinetická a terapeutická sledování pro stanovení „breakpointu“ ve veterinární medicíně. Přizpůsobení se podmínkám *in vivo* v testech pro stanovení citlivosti, resp. rezistence je velmi komplikovaným a nepostížitelným faktorem. Domníváme se proto, že primárním kritériem pro hodnocení citlivosti a rezistence je pouze geneticky podmíněná vlastnost bakteriálního kmene projevovaná hodnotou MIC a velikostí difuzní zóny, stanovená standardními metodami. Navrhujeme izolované kmeny kategorizovat na citlivé až vysoce rezistentní na základě kritérií získaných z předcházejícího statistického šetření velkého souboru kmenů bakteriálního druhu. Zařazení do skupiny s nejvyššími hodnotami MIC a nejmenší zónou inhibice je pak fenotypovým atributem projevu vysoké rezistence bakteriálního kmene. Tato filozofie kategorizace je zčásti podložena našimi poznatky (dosud nepublikováno) a zčásti výsledky stanovení interpretčních kritérií pro ceftiofur u respiračních onemocnění prasat (Burton aj., 1996).

3. ZÁVĚR

Jak ukázal historický vývoj rezistence u mikroorganismů, lze očekávat, že široké používání antibiotik přinese s sebou rychlejší vývoj rezistentních bakteriálních kmenů. Vzhledem k prokázané cirkulaci bakteriálních kmenů mezi zvířecí a lidskou populací je řešení otázek rezistence na antibiotika problémem prvofadým. Do důsledku nekontrolované používání antibiotik, spolu s možností přenosu rezistence mezi mikroorganismy, tvoří z bakteriální rezistence na antibiotika problém, kterému musí být věnována ve veterinární medicíně soustavná pozornost.

Z přehledu vyplývá nutnost studia rezistence mikroorganismů na antibiotika ve veterinární medicíně ve třech směrech:

V prvé řadě je to standardizace postupů stanovování rezistence na antibiotika ve veterinární medicíně.

Na základě široce porovnatelných výsledků sledovat trendy vývoje rezistence.

Třetí, ale ne v závažnosti poslední směr, je detailní prostudování genetických vektorů rezistence a specifických mechanismů rezistence. Studium těchto mechanismů by poskytlo nové prostředky k potlačování rezistence.

4. LITERATURA

- Arpin C., Lagrange I., Gachie J. P., Bebear C., Quentin C. (1996): Epidemiological study of an outbreak of infection with *Staphylococcus aureus* resistant to lincosamides and streptogramin A in French hospital. *J. Med. Microbiol.*, 44, 303–310.
- Baker C. N., Stocker S. A., Culver D. H., Thornsberry C. (1991): Comparison of the E test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 533–538.
- Bauer A. W., Kirby M. M., Sherris J. C., Tenckhoff M. (1966): Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 45, 493–496.
- Baumgartner A., Nicolet J., Eggmann M. (1984): Plasmid profiles of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis. *J. Appl. Bacteriol.*, 56, 159–163.
- Björnerot L., Franklin A., Tysen E. (1996): Usage of antibacterial and antiparasitic drugs in animals in Sweden between 1988 and 1993. *Vet. Rec.*, 139, 282–286.
- Bordas A. C., Brady M. S., Siewierski M., Katz S. E. (1995): Additive effects of residue levels of antibiotics and pesticides on the development of antibiotic resistance. In: Proc. 3rd IDF International Mastitis Seminar, Tel-Aviv, Israel. Session 3, 15–20.
- Buragohain J., Dutta G. N. (1990): A new type of macrolide resistance in staphylococci from bovine subclinical mastitis. *Res. Vet. Sci.*, 49, 248–249.
- Burriel A. R. (1997): Resistance of coagulase-negative staphylococci isolated from sheep to various antimicrobial agents. *Res. Vet. Sci.*, 63, 189–190.

- Burrows G. E. (1985): Effects of experimentally induced *Pasteurella haemolytica* pneumonia on the pharmacokinetics of erythromycin in the calf. *Am. J. Vet. Res.*, **46**, 798–803.
- Burton P. J., Thornsberry C., Cheung Yee Y., Watts J. L., Yancey R. J. Jr. (1996): Interpretative criteria for antimicrobial susceptibility testing of ceftiofur against bacteria associated with swine respiratory disease. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 464–468.
- Calzolari A., Bettera S., Frigerio C., Ramponi H., Giraudo J. (1995): Taxonomic classification and antibiotic resistance of *Staphylococcus* isolated from bovine milk. In: Proc. 3rd IDF International Mastitis Seminar, Tel-Aviv, Israel. Session 2, 78–79.
- Chambers H. F. (1988): Methicillin-resistant *Staphylococci*. *Clin. Microbiol. Rev.*, **1**, 173–186.
- Charm S. E., Chi R. (1988): Microbial receptor assay for rapid detection and identification of seven families of antimicrobial drugs in milk: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 304–316.
- Devriese L. A., Hommez J. (1975): Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. *Res. Vet. Sci.*, **19**, 23–27.
- Elwell L. P., Falkow S. (1986): The characterization of R plasmids and the detection of plasmid-specified genes. In: Lorian V. (ed.): *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 2nd ed. New York, Williams and Wilkins, 683–694.
- Ericsson H. M., Sherris J. C. (1971): Antibiotic sensitivity testing. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B*, **217**, 20.
- Franklin A., Jansson C. (1996): Antibiotic resistance in animal husbandry. In: *Research and Development for Animal Health*. Uppsala, Sweden, National Veterinary Institute, 100.
- Frénay H. M. E., Theelen J. P. G., Schouls L. M., Vanderbroucke-Grauls C. M. J. E., Verhoef J., Van Leeuwen W. J., Mooi F. R. (1994): Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 846–847.
- Gavan T. L., Barry A. L. (1980): Microdilution test procedures. In: Lennette E. H., Balows A., Hausler W. J. Jr., Truant J. P. (eds.): *Manual of Clinical Microbiology*. 3th ed. Washington, Amer. Soc. Microbiol., 459–462.
- Jansson C., Franklin A., Sköld O. (1992): Spread of newly found trimethoprim resistance gene, *dhfr IX*, among porcine isolates and human pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **36**, 2704–2708.
- Kogan L., Cohen R., Samuelov N. S. (1995): Kits for detection of drug residues in milk. In: Proc. 3rd IDF International Mastitis Seminar, Tel-Aviv, Israel. Session 3, 45–46.
- Lacey R. W. (1980): Rarity of gene transfer between animal and human isolates of *Staphylococcus aureus in vitro*. *J. Gen. Microbiol.*, **119**, 437–442.
- Levy S. B. (1998): The challenge of antibiotic resistance. *Centaur Newsletter flash NFO 8-980226*, Info 261, 14–16.
- Lochmann O. (1994): *Základy antimikrobiální terapie*. Praha, Triton, 175 s.
- Maple P. A. C., Hamilton-Miller J. M. T., Brumfitt W. (1989): World-wide antibiotics resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **1**, 537–540.
- Mass W. K. (1986): Mutations to antibiotics resistance, p. 669–680. In: Lorian V. (ed.): *Antibiotics in laboratory medicine*. 2nd ed. New York, Williams and Wilkins, 1163 pp.
- Matthews K. R., Oliver S. P., Jayarao B. M. (1992): Susceptibility of *Staphylococci* and *Streptococci* isolated from bovine milk to antibiotics. *Agri-Practice*, **13**, 18–24.
- McDonnell R. W., Sweeney H. M., Cohen S. (1983): Conjugational transfer of gentamicin resistance plasmids intra and interspecifically in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **23**, 151–160.
- Muhammad G., Hoblet K. H., Jackwood D. J., Bech-Nielsen S., Smith K. L. (1993): Interspecific conjugate transfer of antibiotic resistance among *Staphylococci* isolated from the bovine mammary gland. *Amer. J. Vet. Res.*, **54**, 1432–1440.
- Myllys V., Louhi M., Ali-Vehmas T. (1992): Comparison of penicillin-G susceptibility testing methods of *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. *J. Vet. Med.*, **39**, 723–731.
- NCCLS (1990): National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*, 2nd ed. Approved Standard M7-A2. Villanova, USA, NCCLS, 32 pp.
- Noble W. C. (1996): Antibiotic resistance in *Staphylococci* from animals. In: *Abstr., 8th Int. Symp. on Staphylococci and Staphylococcal Infections*. Aix-Les-Bains, France, 79.
- Opdebeek J. R., O'Boyle D. A., Frost A. J. (1988): Encapsulated *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Austr. Vet. J.*, **65**, 194–195.
- Owens W. E. (1988): Evaluation of various antibiotics for induction of L forms from *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 2187–2190.
- Owens W. E., Ray C. H., Watts J. L., Yancey R. J. (1997): Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. *J. Dairy Sci.*, **80**, 313–317.
- Owens W. E., Washburn P. J., Ray C. H. (1993): The postantibiotic effect of selected antibiotics on *Staphylococcus aureus* Newbould 305 from bovine intramammary infection. *J. Vet. Med. B*, **40**, 603–608.
- Owens W. E., Watts J. L. (1988): Antimicrobial susceptibility and beta-lactamase testing of staphylococci isolated from dairy herds. *J. Dairy Sci.*, **71**, 1934–1939.
- Owens W. E., Watts J. L., Greene B. B., Ray C. H. (1990): Minimum inhibitory concentrations and disk diffusion zone diameter for selected antibiotics against *Streptococci* isolated from bovine intramammary infections. *J. Dairy Sci.*, **73**, 1225–1231.
- Papp J. R., Muckle C. A. (1991): Antimicrobial susceptibility testing of veterinary clinical isolates with the Sceptor System. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 1249–1251.
- Russell P. (1998): Controlling antibiotics in milk. *Milk Industry Int.*, **100**, 27–33.
- Ryffel C., Strässle A., Kayser F. H., Berger-Bächi B. (1994): Mechanismus of heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 724–728.

- Sabath L. D., Laverdiere M., Wheeler N., Blazevic D., Wilkinson J. (1977): A new type of penicillin resistance of *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, *1*, 443–448.
- Salmon S. A., Watts J. L., Case C. A., Hoffman L. J., Wegener H. C., Yancey R. J. Jr. (1995): Comparison of MICs of ceftiofur and other antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from the United States, Canada and Denmark. *J. Clin. Microbiol.*, *33*, 2435–2444.
- Sandholm M., Louhi M. (1991): Bovine mastitis. Why does antibiotic therapy fail? In: Espinasse J. (ed.): *Mammmites des Vaches Laitieres*, Paris, 88–106.
- Sears P. M., Fettingner M., Marsh-Salin J. (1987): Isolation of L-form variants after antibiotic treatment in *Staphylococcus aureus* bovine mastitis. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, *191*, 681–684.
- Sherris J. C. (1977): The antibiotic sensitivity test. Variability. Interpretation. Rapid versus overnight. Agar versus broth. In: Lorian V. (ed.): *Significance of Medical Microbiology in the Care of Patients*. Baltimore, Williams and Wilkins, 170–185.
- Schwarz S., Blobel H. (1989): Plasmids and resistance to antimicrobial agents and heavy metals in *Staphylococcus hyicus* pigs and cattle. *J. Vet. Med. B*, *36*, 669–673.
- Schwarz S., Blobel H. (1990): A new streptomycin-resistance plasmid from *Staphylococcus hyicus* and its structural relationship to other staphylococcal resistance plasmids. *J. Med. Microbiol.*, *32*, 201–205.
- Soback S. (1987): Principles of antimicrobial therapy on organisms in mammary glands. In: *Proc. Int. Mast. Symp.*, Canada, 176–185.
- Šedivá I., Olejník P., Ryšánek D. (1994): Minimal inhibition concentrations of selected antibiotics for strains of *Staphylococcus aureus*. *Vet. Med. – Czech*, *39*, 159–165.
- Thornsberry C., Burton P. J., Yee Y. C., Watts J. L., Yancey R. J. Jr. (1997): The activity of a combination of penicillin and novobiocin against bovine mastitis pathogens: development of a disk diffusion test. *J. Dairy Sci.*, *80*, 413–421.
- Thornsberry C., Marler J. K., Watts J. L., Yancey R. J. (1993): Activity of pirlimycin against pathogens from cows with mastitis and recommendations for disk diffusion tests. *Antimicrob. Agents Chemother.*, *37*, 1122.
- Tomasz A., Albino A., Zanati E. (1970): Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. *Nature*, *227*, 138–140.
- Tripodi M. F., Attanasio V., Adonolfi L. E., Florio A., Cione P., Cuccurullo S., Utili R., Ruggiero G. (1994): Prevalence of antibiotic resistance among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococci*. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, *13*, 148–152.
- Udo E. E., Jacob L. E., Mokadas E. M. (1997): Conjugative transfer of high-level mupirocin resistance from *Staphylococcus haemolyticus* to other *Staphylococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, *41*, 693–695.
- Watts J. L., Salmon S. A. (1997): Activity of selected antimicrobial agents against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections that produce β -lactamase. *J. Dairy Sci.*, *80*, 788–791.
- Watts J. L., Salmon S. A., Yancey R. J. (1995): Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mammary glands of dairy heifers. *J. Dairy Sci.*, *78*, 1637–1648.
- Watts J. L., Yancey R. J. (1994): Identification of veterinary pathogens by use of commercial identification systems and new trends in antimicrobial susceptibility testing of veterinary pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.*, *7*, 346–356.
- Wegener H. C., Watts J. L., Salmon S. A., Yancey R. J. Jr. (1994): Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus hyicus* isolated from exudative epidermitis in pigs. *J. Clin. Microbiol.*, *32*, 793–795.

Received: 97–12–16

Accepted after corrections: 98–27–10

Kontakní adresa:

RNDr. Jarmila Schlegelová, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika
Tel. +420 5 41 32 12 41, fax +420 5 41 21 12 29, e-mail: schlegelova@vri.cz

**EUROPEAN SOCIETY FOR DOMESTIC ANIMAL REPRODUCTION
(ESDAR)****EVROPSKÁ SPOLEČNOST PRO REPRODUKCI DOMÁCÍCH ZVÍŘAT
(ESDAR)**

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

První, velmi úspěšná konference, která přinesla intenzivní výměnu zkušeností mezi praktickými veterinárními lékaři a pracovníky v reprodukčním výzkumu, se konala v roce 1997 v Mariensee v Německu. Druhá konference se konala od 26. do 28. listopadu 1998 v Keszthely v Maďarsku. Informace o této konferenci je možné získat a e-mailové adrese: biszkup@sunserv.katki.hu. Třetí výroční konference se bude konat v Angers ve Francii od 25. do 27. listopadu 1999 a jejím organizátorem bude Dr. Marc Driancourt. Konečně čtvrtá výroční konference v roce 2000 se bude konat v Praze a její organizací je pověřen doc. Jan Motlík.

Zvané přednášky na výročních konferencích jsou publikovány v plném rozsahu v časopise *Reproduction in Domestic Animals*.

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

Hilary Dobson
Faculty of Veterinary Sciences, Liverpool

*(Volný překlad: Doc. MVDr. Jan Motlík, DrSc.
zástupce ČR v ESDAR)*

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 imprimované 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 úhůzů na řádku, mezi řádky dvojitě mezery). K rukopisu je vhodné přiložit disketu s textem práce, popř. s grafickou dokumentací pořízenou na PC s uvedením použitého programu. Tabulky, grafy a fotografie se dodávají zvlášť, nepodlepují se. Na všechny přílohy musí být odkazy v textu.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Na zvláštním listě uvádí autor plné jméno (i spoluautorů), akademické, vědecké a pedagogické tituly a podrobnou adresu pracoviště s PŠČ, 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/Pokyny.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 keywords and comprise base numerical data including statistical data.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

VETERINARY MEDICINE – CZECH

Volume 44, No. 2, February 1999

CONTENTS

Mudroň P., Rehage J., Meier C., Scholz H., Kováč G.: Alpha-tocopherol and hepatic parameters in dairy cows with liver failure (in English)	29
Herzig I., Písaříková B., Kursá J., Říha J.: Defined iodine intake and changes of its concentration in urine and milk of dairy cows (in English)	35
Pivko J., Grafenau P., Uhrín V., Kopečný V.: Autoradiographic detection of RNA and glyco-protein synthesis in epithelial cells of the oviduct in ovulated heifers	41
Karadjole I., Tofant A., Vučemilo M., Hadžiosmanović M.: Effect of saline drinking water on acid-base balance and electrolyte levels in laying hen blood (in English)	49
REVIEW ARTICLE	
Schlegelová J., Ryšánek D.: Antibiotic resistance of bacteria and its determination in veterinary medicine	53
INFORMATION	
Dobson H.: European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR)	60

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 44, č. 2, Únor 1999

OBSAH

Mudroň P., Rehage J., Meier C., Scholz H., Kováč G.: Alfa-tokoferol a hepatálne ukazovatele u dojníc s hepatálnou insuficienciou	29
Herzig I., Písaříková B., Kursá J., Říha J.: Definovaný příjem jodu a změny jeho koncentrace v moči a mléce dojníc	35
Pivko J., Grafenau P., Uhrín V., Kopečný V.: Autorádiografická detekcia syntézy RNA a glykoproteínov v epitelových bunkách vajcovodu jalovic po ovulácii	41
Karadjole I., Tofant A., Vučemilo M., Hadžiosmanović M.: Vliv slané pitné vody na acidobazickou rovnováhu a hladinu elektrolytů v krvi nosnic	49
PŘEHLED	
Schlegelová J., Ryšánek D.: Bakteriální rezistence na antibiotika a její stanovení ve veterinární medicíně	53
INFORMACE	
Dobson H.: Evropská společnost pro reprodukci domácích zvířat (ESDAR)	60

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA ● Vydává Ústav zemědělských a potravinářských informací ● Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38 ● Sazba: Studio DOMINO – ing. Jakub Černý, Bří. Nejedlých 245, 266 01 Beroun, tel.: 0311/229 59 ● Tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1999

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