

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

16. červce 1999

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

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

7

VOLUME 44
PRAHA
JULY 1999
ISSN 0375-8427

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

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

Editorial Board – Redakční rada

Chairman – Předseda

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

Members – Členové

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Jilové u Prahy, Czech Republic

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

Editor-in-Chief – Vedoucí redaktorka

Ing. Zdeňka Radošová

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

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

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

THE EFFECT OF CHLORTETRACYCLINE HYDROCHLORIDE ON SOME MORPHOMETRIC PARAMETERS OF THE THYROID GLAND IN LAMBS

VPLYV PODÁVANIA CHLÓRTETRACYKLÍN HYDROCHLORIDU NA NIEKTORÉ MORFOMETRICKÉ PARAMETRE ŠTÍTNEJ ŽLAZY U JAHNIAT

M. Kóňová¹, E. Békeová², M. Levkut¹

¹University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

²Research Institute of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: The height of follicular epithelial cells, the diameter of thyroid gland follicles, the frequency of epithelial cell height categories and the frequency of follicular diameter categories were measured in the thyroid glands of lambs. The samples of the glands were processed using a standard histological procedure for light microscopy and morphometric measurements were made with a calibrated screw micrometer. This assessment of the glands was made after a daily intake of chlortetracycline hydrochloride (CTCC) mixed in feed either for four weeks or for three months in 26 Slovak Merino lambs (aged 2 months at the beginning of the treatment). Each CTCC group of animals was sacrificed at the same time as the corresponding control group of animals. In one group, the 28 mg CTCC per kg of body weight per day (low dose group) were administered for four weeks (CTCC group $n = 3$; control group $n = 3$) and in the other group for three months (CTCC group $n = 3$; control group $n = 3$). In one group, the 168 mg CTCC per kg of body weight per day (high dose group) were administered for four weeks (CTCC group $n = 3$; control group $n = 3$) and in the other group for three months (CTCC group $n = 4$; control group $n = 4$). A significant ($P < 0.01$) increase in the mean value of follicular epithelial cell height (Fig. 1) was observed in every chlortetracycline hydrochloride (CTCC) group after low and high intakes of CTCC for four weeks and for three months when compared to the corresponding control groups. Moreover, a significant ($P < 0.01$) frequency distribution shift of follicular epithelial cell height to the higher height categories of 3.1–4 and 4.1–5 μm (Figs. 2, 3) was observed in every CTCC group after low and high doses intake of CTCC for four weeks and for three months when compared to the corresponding control category. The diameter of thyroid gland follicles significantly decreased after low doses intake of CTCC for four weeks ($P < 0.01$) and for three months ($P < 0.05$) and after high doses intake of CTCC for three months ($P < 0.01$) when compared with the corresponding control group. The decrease of follicular diameter after the intake of high doses for four weeks was statistically insignificant (Fig. 4). A significant ($P < 0.01$) frequency distribution shift of follicular diameter to the lower diameter category (from 40.1 to 80 μm) after low intakes of CTCC for four weeks (Fig. 5) and to the lower diameter category ((from 40.1 to 80 μm) after high intakes of CTCC for three months (Fig. 6) was recorded. Our morphometric results suggest the interference of chlortetracycline or its compound(s) formed in the body on the basis of the interaction between chlortetracycline with the thyroid metabolism in lambs but without macroscopically detectable thyroid changes.

follicular epithelial cells; thyroid follicles; antithyroid effect

ABSTRAKT: U jahniat sme morfometricky sledovali výšku epitelových buniek folikulov a priemer folikulov štítnej žľazy ako aj frekvenciu kategórií výšky epitelových buniek a frekvenciu kategórií priemerov folikulov po štvortýždňovom a trojmesačnom dennom príjme chlortetracyklín hydrochloridu (CTCC) v krmive. Príjem 28 mg CTCC na kg ž. hm. a deň (skupiny nízkych dávok) bol v jednej skupine počas štyroch týždňov (CTCC skupina $n = 3$, kontrolná skupina $n = 3$), v inej skupine počas troch mesiacov (CTCC skupina $n = 3$, kontrolná skupina $n = 3$). Príjem 168 mg CTCC na kg ž. hm. a deň (skupiny vysokých dávok) bol v jednej skupine počas štyroch týždňov (CTCC skupina $n = 3$, kontrolná skupina $n = 3$) a v inej skupine počas troch mesiacov (CTCC skupina $n = 4$, kontrolná skupina $n = 4$). Každá CTCC skupina bola porážaná v rovnakom čase ako príslušná kontrolná skupina. Zistilo sa štatisticky významné ($P < 0,01$) zvýšenie výšky epitelových buniek folikulov (obr. 1) a významný ($P < 0,01$) posun frekvencie kategórií výšky epitelových buniek do vyšších veľkostných skupín (obr. 2, 3). Priemer folikulov sa štatisticky významne ($P < 0,01$, resp. $P < 0,05$) znížil (okrem podávania vysokých dávok po štvortýždňovom príjme) (obr. 4). Distribúcia frekvencie priemerov folikulov sa štatisticky významne ($P < 0,01$) presunula do nižšej kategórie priemeru po štvortýždňovom podávaní nízkych dávok (obr. 5) a po trojmesačnom podávaní vysokých dávok CTCC (obr. 6). Naše morfometrické výsledky poukazujú na interferenciu chlortetracyklínu alebo v tele vytváraných látok na jeho báze s metabolizmom štítnej žľazy jahniat, ale makroskopicky bez detekovateľných zmien štítnej žľazy.

epitelové bunky folikulu; folikuly štítnej žľazy; antityreoidálny účinok

ÚVOD

Mnoho chemikálií a liečiv je antityreoidálnych či strumigénnych, pretože prerušujú jeden alebo viacej metabolických krokov biosyntézy a sekrecie hormónov štítnej žľazy, čo vedie k zníženiu hladiny tyroxínu (T_4) a trijódtyronínu (T_3), spojenú s kompenzačne zvýšenou sekreáciou tyreotropínu (TSH) – Capen a i. (1991). Zvýšená sekrecia TSH stimuluje proliferáciu a diferenciáciu epitelových buniek štítnej žľazy a tým jej rast (Dumont, 1993). Zoznamy viacerých farmakologických látok, ktoré pôsobia antityreoidálne alebo vyvolávajú strumu sú vymenované v skorších (Marchant a i., 1979; Vagenakis a Braverman, 1979) i v neskorších (Capen a i., 1991; Langer, 1993) prácach. Účinok chlórtracyklínu na štítnu žľazu nie je uvádzaný v týchto a ani v prácach najnovšieho obdobia. U mláďat hospodárskych zvierat sa podáva ako hromadná liečebno-ochranná aplikácia vo forme premixu Aureovit a môže sa podávať pomerne dlhú dobu. U niektorých farmák, ktoré za normálnych podmienok nevyvolávajú hypothyreoidizmus alebo majú len mierny antityreoidálny účinok, môže byť tento potencionálny miernymi odchyškami činnosti štítnej žľazy, ako je trvalý marginálny prívod jódu alebo dlhodobý príjem nízkych dávok prirodzených či antropogénnych strumigénov. Vo formule chlórtracyklínu sa nachádza chlór, ktorý sa ukázal znižovať koncentráciu tyroxínu séra u potkanov (Bercz a Garner, 1991) i holubov (Revis a i., 1986) a zvyšovať výšku epitelových buniek folikulov štítnej žľazy u jahniat (Kóňová a i., 1998). Preto sme sledovali počas štyroch týždňov a troch mesiacov vplyv príjmu nízkej liečebno-ochrannej dávky chlórtracyklínu (28 mg na kg ž. hm. a deň) a jeho vysokej dávky (168 mg na kg ž. hm. a deň) na výšku epitelových buniek a priemer folikulov štítnej žľazy u jahniat.

MATERIÁL A METÓDA

Zvieratá a diéta

V pokusoch sa použilo 26 jahniat plemena slovenské merino, na začiatku pokusu vo veku dvoch mesiacov. Zvieratá sa kŕmili štandardnou kŕmnom zmesou ČOJ 2 (25 až 30 dkg/deň/jahňa, obsahujúcich 80 a 96 μ g jódu) a lúčnym senom (35 dkg/deň/jahňa). Krmivo zvierat pochádzalo z neendemickej strumigénnej oblasti. Zvieratá prijímali čistú pramenistú vodu v množstve 0,8 až 1,6 l na zviera za 24 h podľa veku zvierata, ktorá sa denne vymieňala. Chlórtracyklín hydrochlorid ($C_{22}H_{23}ClN_7O_8 \cdot HCl$) sa použil vo forme Aureovitu 12 C 80 (Biotika, Slovenská Lupča), medikovaného premixu pre perorálne použitie, obsahujúceho 8 % 7-chlórtracyklín hydrochloridu, ktorý sa zamiešaval do krmiva.

Schéma pokusu

Pokusné zvieratá prijímali denne chlórtracyklín hydrochlorid (CTCC) zamiešaný do krmiva. Zvieratá kon-

trolných skupín prijímali rovnaké krmivo v rovnakých množstvách bez pridávania CTCC. Zvieratá sa rozdelili do štyroch pokusných skupín, ku každej z nich bola kontrolná skupina zvierat. V skupinách s nízkymi dávkami CTCC zvieratá prijímali 28 mg CTCC na kg ž. hm. a deň počas štyroch týždňov (CTCC skupina $n = 3$, kontrolná skupina $n = 3$) a počas troch mesiacov (CTCC skupina $n = 3$, kontrolná skupina $n = 3$). V skupinách s vysokými dávkami CTCC zvieratá prijímali 168 mg CTCC na kg ž. hm. a deň počas štyroch týždňov (CTCC skupina $n = 3$, kontrolná skupina $n = 3$) a počas troch mesiacov (CTCC skupina $n = 4$, kontrolná skupina $n = 4$). Každá CTCC skupina zvierat bola porádzaná v rovnakom čase ako príslušná kontrolná skupina zvierat, kedy sa odoberal materiál na vyšetrenie.

Spôsob hodnotenia

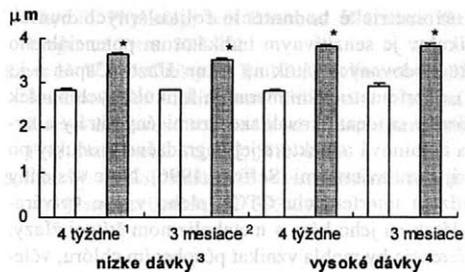
Vzorky štítnej žľazy z oboch lalokov od všetkých pokusných a kontrolných zvierat sa odobrali bezprostredne po zabíí. Vzorky sa fixovali v 10% pufovanom (fosfátovom) formalíne, rezali v hrúbke 5 μ m a farbili hematoxyln-eozínom. Morfometrické merania sa robili kalibrovaným okulárovým mikrometrom. Kvantitatívne parametre sa zaznamenávali pre každý lalok a zviera. V každej spracovanej vzorke sa merala výška epitelových buniek folikulov a priemer folikulov v náhodne vybraných folikuloch pri zväčšení 400x.

Štatistické hodnotenie

Výsledky sa uvádzajú ako priemerné hodnoty \pm SEM alebo frekvencia kategórií (intervalov) v percentách. Údaje pre každý parameter sa vyhodnotili štatisticky. Pre priemerné hodnoty sa najprv analýzou variácie porovnávali dve skupiny pri použití predbežného *F*-testu na zistenie významnosti rozdielu priemerov. Potom sa použil dvojkoncový *z*-test rozdielu priemerov a pre frekvenciu kategórií dvojkoncový *z*-test rozdielu vzájomných pomerov $\alpha = 0,05$, významnosť sa prepočítala z tabuľky *z*-distribúcie (Triola, 1989). Významnosť sa uvádza ak hodnota pravdepodobnosti (*P*) bola menšia než 0,01 a než hraničná 0,05.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

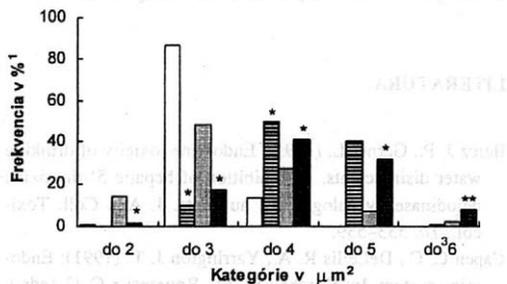
Výška epitelových buniek folikulov štítnej žľazy jahniat po štvortýždňovom a trojmesačnom príjme nízkych a vysokých dávok CTCC krmivom je štatisticky významne vyššia ($P < 0,01$) než u kontrol (obr. 1). Percentuálna distribúcia výšky epitelových buniek po štvortýždňovom i po trojmesačnom príjme nízkych (obr. 2) i vysokých (obr. 3) dávok CTCC sa štatisticky významne ($P < 0,01$) presunula do vyšších veľkostných kategórií (od 3,1 do 4 a od 4,1 do 5 μ m) a po trojmesačnom príjme vysokých dávok až do kategórie 5,1 až 6 μ m ($P < 0,05$) v porovnaní s príslušnými kategóriami



1. Výška epitelových buniek folikulov štítnej žľazy po štvortýždňovom a trojmesačnom príjme nízkych a vysokých dávok chlortetracyklínu v krmive (prázdne stĺpce – kontrola, plné stĺpce – chlortetracyklín) – The height of follicular epithelial cells of the thyroid gland after four-week and three-month intake of low and high doses of chlortetracycline in feed (open columns – control, solid columns – chlortetracycline)

* $P < 0,01$ ku kontrolnej skupine, priemer \pm SEM – * $P < 0,01$ in relation to control group, mean \pm SEM

¹4 weeks, ²3 months, ³low doses, ⁴high doses



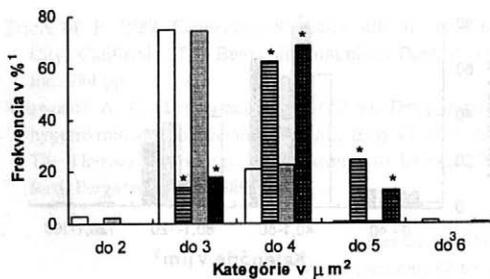
3. Distribúcia výšky epitelových buniek v percentách po štvortýždňovom (kontrola – prázdne stĺpce, chlortetracyklín – vodorovne šrafované stĺpce) a po trojmesačnom (kontrola – plné stĺpce, chlortetracyklín – zvisle šrafované stĺpce) príjme jahňatami nízkych dávok chlortetracyklínu v krmive – Distribution of the height of epithelial cells in percent after four-week (control – open columns, chlortetracycline – horizontally hatched columns) and after three-month (control – solid columns, chlortetracycline – vertically hatched columns) intake of high doses of chlortetracycline in feed by lambs

* $P < 0,01$, ** $P < 0,05$ ku kontrolnej skupine, priemer \pm SEM – * $P < 0,01$, ** $P < 0,05$ to the control of the respective category

¹frequency in %, ²category in μm, ³less than

kontrol. Toto poukazuje na priamy či nepriamy antityreoidálny účinok CTCC, kedy sa zrejme zvyšuje sekrécia TSH, ktorý stimuluje proliferáciu epitelových buniek (Dumont, 1993). To je kompenzačnou odozvou buď na narušenú syntézu hormónov štítnej žľazy, ich sekrécii, alebo ich periférny metabolizmus (Capen a i., 1991).

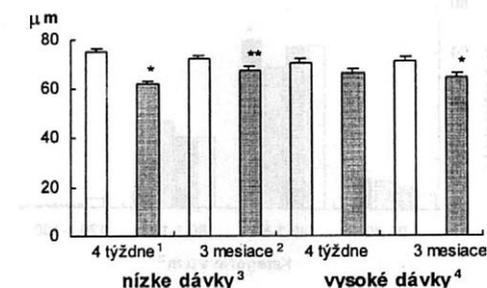
Priemer folikulov štítnej žľazy je štatisticky významne nižší po štvortýždňovom ($P < 0,01$) a po trojmesačnom ($P < 0,01$) príjme nízkych dávok CTCC ako aj po trojmesačnom ($P < 0,01$) príjme vysokých dávok CTCC než u kontrol; po štvortýždňovom príjme vysokých dávok



2. Distribúcia výšky epitelových buniek v percentách po štvortýždňovom (kontrola – prázdne stĺpce, chlortetracyklín – vodorovne šrafované stĺpce) a po trojmesačnom (kontrola – plné stĺpce, chlortetracyklín – zvisle šrafované stĺpce) príjme jahňatami nízkych dávok chlortetracyklínu v krmive – Distribution of the height of epithelial cells in percent after four-week (control – open columns, chlortetracycline – horizontally hatched columns) and after three-month (control – solid columns, chlortetracycline – vertically hatched columns) intake of low doses of chlortetracycline in feed by lambs

* $P < 0,01$ ku kontrolnej skupine, priemer \pm SEM – * $P < 0,01$ in relation to the control of the respective category

¹frequency in %, ²category in μm, ³less than

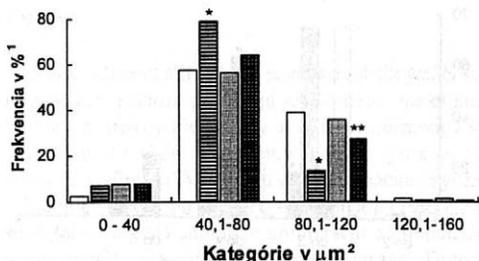


4. Priemer folikulov štítnej žľazy po štvortýždňovom a po trojmesačnom príjme jahňatami nízkych a vysokých dávok chlortetracyklínu v krmive (prázdne stĺpce – kontrola, plné stĺpce – chlortetracyklín) – The diameter of thyroid gland follicles after four-week and after three-month intake of low and high doses of chlortetracycline in feed by lambs (open columns – control, solid columns – chlortetracycline)

* $P < 0,01$, ** $P < 0,05$ ku kontrolnej skupine, priemer \pm SEM – * $P < 0,01$, ** $P < 0,05$ in relation to the control group, mean \pm SEM

¹4 weeks, ²3 months, ³low doses, ⁴high doses

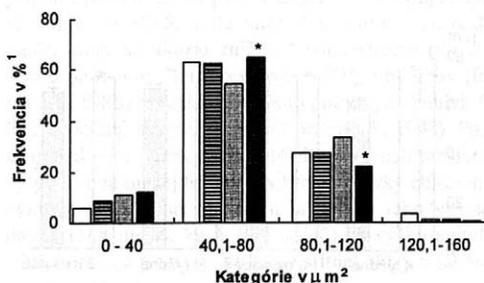
vok CTCC je nižší priemer folikulov v porovnaní s kontrolnou skupinou, ale rozdiel nie je štatisticky významný (obr. 4). Distribúcia priemerov folikulov po štvortýždňovom podávaní nízkych dávok CTCC sa štatisticky významne ($P < 0,01$) presunula z kategórie priemeru 80,1 až 120 μm do nižšej kategórie 40,1 až 80 μm, zatiaľ čo takýto presun do nižšej kategórie po dlhodobom podávaní CTCC ale nie je významný (obr. 5). Distribúcia priemerov folikulov po štvortýždňovom podávaní vysokých dávok CTCC sa nemenila, no po jeho trojmesačnom podávaní sa zaznamenal významný ($P <$



5. Distribúcia priemerov folikulov v percentách po krátkodobom (kontrola – prázdne stĺpce, chlortetracyklín – vodorovne šrafované stĺpce) a po dlhodobom (kontrola – plné stĺpce, chlortetracyklín – zvisle šrafované stĺpce) podávaní jahňatám nízkych dávok chlortetracyklínu v krmive – Distribution of follicle diameters in percent after short-time (control – open columns, chlortetracycline – horizontally hatched columns) and after long-time (control – solid columns, chlortetracycline – vertically hatched columns) applications of low doses of chlortetracycline in feed to lambs

* $P < 0,01$, ** $P < 0,05$ ku kontrolnej príslušnej kategórii – * $P < 0,01$, ** $P < 0,05$ in relation to the control of the respective category

¹frequency in %, ²category in μm



6. Distribúcia priemerov folikulov v percentách po krátkodobom (kontrola – prázdne stĺpce, chlortetracyklín – vodorovne šrafované stĺpce) a po dlhodobom (kontrola – plné stĺpce, chlortetracyklín – zvisle šrafované stĺpce) podávaní jahňatám vysokých dávok chlortetracyklínu v krmive – Distribution of follicle diameters in percent after short-time (control – open columns, chlortetracycline – horizontally hatched columns) and after long-time (control – solid columns, chlortetracycline – vertically hatched columns) applications of high doses of chlortetracycline in feed to lambs

* $P < 0,01$ ku kontrolnej príslušnej kategórii – * $P < 0,01$ in relation to the control of the respective category

¹frequency in %, ²category in μm

0,01) presun z vyššej (80,1 až 120 μm) veľkostnej kategórie do nižšej (40,1 až 80 μm) – obr. 6. Zníženie celkového priemeru folikulov po prijímaní CTCC a v niektorých prípadoch percentuálny presun priemerov folikulov do nižšej kategórie naznačuje buď prosté zvýšenie aktivity štítnej žľazy, alebo zmnženie menších folikulov, ktoré sú viacej aktívne.

Morfometrické hodnotenie folikulárných buniek a folikulov je senzitivným indikátorom potenciálneho účinku sledovaných látok na štítnu žľazu (Capen a i., 1991). Morfometrickým meraním folikulárných buniek a folikulov sa identifikovali ako strumigény nitráty a kyselina huminová a niektoré jej degradačné produkty po ich prijímaní zvieratami (Seffner, 1996). Naše výsledky potvrdzujú interferenciu CTCC alebo v tele vytváraných látok na jeho báze s metabolizmom štítnej žľazy. Interferencia by mohla vznikáť pôsobením chlóru, včleneného do CTCC, ktorého antityreoidálny účinok sa deje imobilizáciou časti jódu diéty, potom nedostupného pre vychytávanie folikulami alebo i tvorbou jódovaných organických látok, spomaľujúcich aktívny transport jódu (Bercz a Garner, 1991). Taktiež antityreoidálny účinok s následnými morfológickými zmenami štítnej žľazy niektorých farmák sa deje vytváraním komplexov s jódom (Comby a i., 1991, 1993). Vzhľadom k našim morfometrickým nálezom bez makroskopicky detekovateľných zmien štítnej žľazy možno antityreoidálny účinok chlortetracyklínu posudzovať ako mierny, ktorý by sa mohol zväčšovať pri súčasnom marginálnom prijímaní jódu alebo malých dávok strumigénov.

LITERATÚRA

- Bercz J. P., Garner L. (1991): Endocrine toxicity of drinking water disinfectants. II. Inhibition of hepatic 5'-thyroxine deiodinase by halogenated nutrients. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 10, 533–539.
- Capen C. C., DeLellis R. A., Yarrington J. T. (1991): Endocrine system. In: Haschek W. M., Rousseaux C. C. (eds.): *Handbook of Toxicologic Pathology*. San Diego, Acad Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich, Publ., 675–760.
- Comby F., Lagorce J. F., Nicolas J. A., Raby C., Buxeraud J. (1991): Action antithyroïdienne secondaire du levamisole et du triméthoprimine chez le mouton. *Rev. Méd. Vét.*, 142, 49–55.
- Comby F., Lagorce J. F., Moulard T., Buxeraud J., Raby C. (1993): Sulfamides, antibactériens, antiparasitaires et antifongiques dérivés de l'imidazole: évaluation des effets antithyroïdiens sur le rat. *Vet. Res.*, 24, 316–326.
- Dumont J. T. (1993): Control of thyroid growth. In: Delange F., Dunn J. T., Glinoe D. (eds): *Iodine Deficiency in Europe*. New York, Plenum Press. 35–41.
- Kóňová M., Békeová E., Levkut M. (1998): Vplyv príjmu chlóru na morfometriu epitelových buniek folikulov štítnej žľazy prežúvavcov. In: *Zbor. Ref. Aktuálne zdravotné problémy hovädzieho dobytku*. Košice, Univzita veterinárskeho lekárstva. 159–161.
- Langer P. (1993): Štítna žľaza. Morfológia a patofyziológia. In: Kreze A., Langer P., Klimeš I., Lichardus B. (eds.): *Praktická endokrinológia*. Bratislava, Slovak Acad. Press. 110–126.
- Marchant B., Lees J. F. H., Alexander W. D. (1979): Anti-thyroid drugs. In: Hershman J. M., Bray G. A. (eds.): *The*

Thyroid. Physiology and Treatment of Disease. Oxford, Pergamon Press. 209–252.

Revis N. W., McCauley P., Bull R., Holdsworth G. (1986): Relationship of drinking water disinfectants to plasma cholesterol and thyroid hormone levels in experimental studies. Proc. Natl. Acad. Sci., 83, 1485–1489.

Seffner W. (1996): Natürliche Wasserinhaltsstoffe und struma. Tierärztl. Umsch., 51, 395–398.

Triola M. F. 1989: Elementary Statistics. 4th ed. Redwood City, California, The Benjamin/Cummings Publ. Comp. Inc. 784 pp.

Vagenakis A. G., Braverman L. E. (1979): Drug induced hypothyroidism. In: Hershman J. M., Bray G. A. (eds.): The Thyroid. Physiology and Treatment of Disease. Oxford, Pergamon Press. 389–399.

Received: 99–02–16

Accepted after corrections: 99–05–05

Kontaktná adresa:

MVDr. Marianna K ó ň o v á, Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika
Tel. +421 95 622 99 24, e-mail: patanat@uvm.sk

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna (ÚZLK)

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

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

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

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

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

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

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna – ÚZPI

Odd. reproslužeb

Slezská 7, 120 56 Praha 2

Poštovní schránka 39

Telefonické dotazy: 02/24 25 79 39, linka 329, 421 nebo 306

INTRAMAMMARY INFECTIONS OF MAMMARY GLANDS IN UNBRED HEIFERS: ABSOLUTE AND DIFFERENTIAL SOMATIC CELL COUNTS*

INTRAMAMÁRNÍ INFEKCE MLÉČNÝCH ŽLÁZ NEPŘIPUŠTĚNÝCH JALOVIC: ABSOLUTNÍ A DIFERENCIÁLNÍ POČET SOMATICKÝCH BUNĚK

D. Ryšánek¹, I. Šedivá¹, Z. Sládek², V. Babák¹

¹*Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic*

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

ABSTRACT: Lavages from 204 mammary glands of 52 unbred heifers, crosses of Holstein and Bohemian Red Pied breeds, were examined. Attempts to obtain lavages from 4 mammary glands (1.9%) of two animals were unsuccessful owing to occlusion of teat canals. The results of bacteriological examination were negative in 163 (78.4%) glands. Minor pathogens, mostly coagulase-negative staphylococci, were demonstrated in 34 (16.3%) glands. Five glands (2.4%) were infected by environmental pathogens. Two glands (1%) were infected by contagious agents. Absolute somatic cell counts in lavages, standardized to a volume of 20 ml, for the above 4 categories were (0.966, 2.138, 3.267, and 3.138).10⁶/ml, respectively. Macrophages predominated in differential somatic cell counts both in the noninfected (66.6%) and in the infected (62.2%) glands. The counts of polymorphonuclear leukocytes were higher in the infected than in the noninfected glands (14.2 vs. 4.5%). On the other hand, lymphocyte counts were higher in the noninfected than in the infected glands (26.5 vs. 13.2%). The juvenile mammary gland of unbred heifers is a suitable object for health tests in heifers before their incorporation into breeding. Catheterisation and lavage of mammary gland sinuses yield suitable means for sampling for both bacteriological and cytological examinations.

unbred heifers; mammary gland; catheterisation; lavage; microbes colonisation; somatic cells; absolute counts; differential counts

ABSTRAKT: Byly vyšetřeny výplachy dutinového systému 204 mléčných žláz 52 nepřipuštených jalovic, kříženek holštýnského a českého strakatého plemene. Nebyly vyšetřeny čtyři mléčné žlázy (1,9 %) dvou krav pro neprůchodnost strukového kanálku. 163 (78,4 %) mléčných žláz bylo prostých infekce, 34 (16,3 %) žláz bylo infikováno minoritními patogeny. Převážoval nález koagulóza-negativních stafylokoků. Pět (2,4 %) žláz bylo infikováno environmentálními a dvě žlázy (1 %) kontagiózním patogenem. Absolutní počet somatických buněk ve výplachu, standardizovaném na objem 20 ml, činil pro uvedené kategorie (0,966; 2,138; 3,267; 3,138).10⁶/ml. V diferenciálním počtu somatických buněk dominovaly makrofágy, a to jak u neinfikovaných (66,6 %), tak u infikovaných (62,2 %) mléčných žláz, nicméně u infikovaných žláz byl počet polymorfnukleárních leukocytů (14,2 %) vyšší oproti žlázám neinfikovaným (4,5 %). Naopak počet lymfocytů u infikovaných mléčných žláz byl nižší (13,2 %) oproti neinfikovaným (26,5 %). Juvenilní mléčná žláza nepřipuštených jalovic je použitelným objektem pro vyšetření zdravotního stavu jalovice před jejím zařazením do plemenitby. Umožňuje jak mikrobiologické, tak cytologické vyšetření. K tomuto účelu je vhodná technika katetrizace a následně laváže dutinového systému žlázy.

nepřipuštené jalovice; mléčná žláza; katetrizace; laváž; mikroflóra; somatické buňky; absolutní počet; diferenciální počet

INTRODUCTION

Somatic cell counts reflect the state of health and function of the mammary gland (Concha, 1986), in particular the impact of infection by microbial agents of different pathogenicity (Blackburn, 1955; Zeidler et al., 1968; Tolle, 1975; Shearer and Harmon, 1993; Ryšánek

et al., 1997). An important component of the somatic cell population are phagocytising cells – professional phagocytes – including polymorphonuclear leukocytes and macrophages (Paape et al., 1991).

We decided to use juvenile mammary glands of unbred heifers as an object for investigations of resistance of the mammary gland to infection. Juvenile mammary

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

glands have so far been used as a source of bovine phagocytising cells for *in vitro* studies (Wardley et al., 1976; Sanchez et al., 1988; Quiroga et al., 1993b) and in clinical experiments (Quiroga et al., 1993a, c). Bacterial colonisation and infection of juvenile glands were also investigated under natural conditions (Boddie et al., 1987; White et al., 1989; Trinidad et al., 1990a). Attention was paid to intramammary infections in heifers during the peripartum period (Oliver and Mitchell, 1983; White et al., 1989; Miller et al., 1991; Matthews et al., 1992) and to the prevalence of mastitis in heifers and methods of its control (Trinidad et al., 1990b; Jonsen et al., 1991; Shearer and Harmon, 1993; Nickerson et al., 1995).

Absolute and differential somatic cell counts in mammary gland secretions collected from nonpregnant and pregnant heifers were investigated by Boddie et al. (1987) and Trinidad et al. (1990a). Such studies were limited due to absence of secretions in the glands under study: "Because of these limitations, only 24 samples could be tested" (Boddie et al. 1987). "Only single samples were obtained due to limited volume of quarter secretions in most animals" (Trinidad et al., 1990a). Therefore, we decided to use catheterisation and lavage to investigate mammary glands of unbred heifers.

The objective of this study was describe the spectrum of mammary gland pathogens and to determine absolute and differential somatic cell counts in noninfected and infected mammary glands of unbred heifers on the basis of catheterisation and lavage of mammary glands.

MATERIAL AND METHODS

The investigations were carried in 52 unbred heifers, crosses of the Holstein and the Czech Red Pied breeds aged 16 to 18 months. A total of 208 juvenile mammary glands were examined. The attempts to catheterise four mammary glands were unsuccessful owing to occluded teat canals. The animals were treated with xylazine (Rometar inj. ad us. vet., Léciva, Prague, Czech Republic) prior to the catheterisation.

Modified urethral catheters (AC5306CH06, Porges S.A., France) were inserted into the teat canal after thorough disinfection of the teat orifice with 70% ethanol. Sterilised catheters were dipped in 70% ethanol before the insertion to prevent from forcing bacteria colonizing the canal up into the teat cistern. The lavage was done using 20 ml sterile physiological saline buffered with phosphate buffer (PBS) warmed to 37 °C. Lavages were collected back through the catheter directly to the syringe. Clinical observations were made during catheterisation of mammary glands.

Immediately after the lavage, samples of the harvested cell suspensions were collected under sterile conditions for bacteriological examination and determination of absolute somatic cell counts. Then the suspensions were centrifuged at 4 °C and 200 g for 10 min. The supernatant was removed, the sediment was resus-

pended in 0.5 ml PBS and smears were prepared using the standard haematological technique. One smear was prepared from each mammary gland. The smears were dried and treated with Pappenheim stain. Two hundred cells were counted in each smear to determine the differential count.

Bacteriological examinations were carried out using aerobic culture in blood agar with 5% washed sheep erythrocytes. The cultures were incubated at 37 °C for 24 h and the colonies were identified using the procedures described in Clinical Veterinary Microbiology (Quinn et al., 1994). Species identification of staphylococci was done using the API Staph-Trac System (Analyt-Tab Products, Plainview, USA).

Absolute counts of somatic cells were determined using the Fossomatic 90 (A/S N. Foss Electric, Denmark) counter and the procedure recommended by the International Dairy Federation (IDF, 1995). The results were standardized to a constant volume of 20 ml. Differential somatic cell counts were determined using the light microscope Jenamed 250 CF (Carl Zeiss, Jena, Germany), the colour camera 3-CCD HV-C20 (Hitachi Denshi, Japan) and the image analysis software Lucia G (Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic) for image digitalization.

RESULTS

No apparent symptoms were noted by clinical examination of mammary glands. The numbers of the

I. Causative agents of intramammary infections

	n	%
Occluded teat canal	4	1.9
Noninfected mammary glands	163	78.4
Infection by minor pathogens	34	16.3
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	9	4.3
<i>Staphylococcus hominis</i>	4	1.9
<i>Staphylococcus lentus</i>	1	0.5
<i>Staphylococcus caseolyticus</i>	3	1.4
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3	1.4
<i>Staphylococcus auricularis</i>	1	0.5
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1	0.5
<i>Staphylococcus warneri</i>	2	1.0
<i>Staphylococcus simulans</i>	2	1.0
<i>Micrococcus</i> spp.	6	2.9
<i>Streptococcus</i> spp.	2	1.0
Infection by environmental pathogens	5	2.4
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	1.0
<i>Serratia</i> spp.	1	0.5
<i>Enterobacter</i> spp.	1	0.5
<i>Klebsiella</i> spp.	1	0.5
Infection by contagious pathogens	2	1.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	1.0

II. Intramammary infections and somatic cell counts

	n	Mean	Min	Max
Noninfected mammary glands				
Count (10 ⁶ /ml)	156	0.966	0.092	4.620
Logarithm	156	5.832	4.964	6.665
Infection by minor pathogens				
Count (10 ⁶ /ml)	33	2.138	0.185	5.148
Logarithm	33	6.173	5.267	6.712
Infection by environmental pathogens				
Count (10 ⁶ /ml)	5	3.267	0.087	14.10
Logarithm	5	5.792	4.940	7.149
Infection by contagious pathogens				
Count (10 ⁶ /ml)	2	3.138	2.453	3.822
Logarithm	2	6.486	6.390	6.582

III. Differential somatic cell counts in lavages from infected and noninfected mammary glands

Status	PMN			MAC			LYM	OC
	Non-lysed	Lysed	Total	Non-lysed	Lysed	Total		
Non-infected	4.5	1.5	6.0	43.4	23.2	66.6	26.5	0.9
Infected	14.2	6.7	20.9	40.1	22.1	62.2	16.2	0.7

PMN = polymorphonuclear leukocytes
MAC = macrophages

LYM = lymphocytes
OC = other cells

infected and the noninfected mammary glands and the results of identification of the agents causing intramammary infections are presented in Tab. I. The attempts to catheterise 4 of the 208 examined mammary glands (1.9%) were unsuccessful owing to occlusion of teat canals. Free of any infection were 163 (78.4%) mammary glands. Minor pathogens were demonstrated in 34 (16.3%), environmental pathogens in 5 (2.4%), and contagious agents in 2 (1%) mammary glands. Coagulase-negative staphylococci predominated among the pathogenic agents.

Absolute somatic cell counts in the four groups categorised in terms of the infection status were 0.966, 2.138, 3.267, and 3.138.10⁶/ml, respectively (Tab. II).

Macrophages (MAC) predominated in differential cell counts both in the noninfected (66.6%) and in the infected (62.2%) mammary glands (Tab. III). The counts of polymorphonuclear leukocytes (PMN) were higher in the infected than in the noninfected glands (14.2 vs. 4.5%). On the other hand, lymphocyte (LYM) counts were higher in the noninfected than in the infected glands (26.5 vs. 13.2%).

DISCUSSION

The percentage of infected mammary glands in our set of unbred heifers was considerably lower (19.7%) than the 86% and 92.7% reported by Boddie et al. (1987) and Trinidad et al. (1990a), respectively. This difference was due not only to the different sets of animals

under study, but particularly to incomparable sampling techniques. The approach used by the two quoted teams allowed sampling of only those glands in which secretions or an exudate were present, i.e. mostly glands altered by suckling or an intramammary infection. Our method, combining catheterisation and lavage, allows sampling of any glands provided that their teat canals are patent. In our set of unbred heifers, occluded teat canals were found in only 4 (1.9%) of the 208 examined glands. Moreover the hazard of contamination by bacteria colonising the teat canal or environmental bacteria was reduced.

Coagulase-negative staphylococci, and among them *Staphylococcus chromogenes*, predominated among the pathogens detected in the juvenile mammary glands. This finding fully corresponds to data published by Boddie et al. (1987), Trinidad et al. (1990a), and Shearer and Harmon (1993).

Our investigations have also confirmed the findings of Boddie et al. (1987) and Trinidad et al. (1990a) that juvenile mammary glands of unbred heifers can be infected by *Staphylococcus aureus*, although only two (1%) of our set of 208 glands were positive for such infection.

Attention should be paid to intramammary infections of juvenile glands by environmental pathogens. In our set, the percentage of such infections was higher than reported by Boddie et al. (1987) and Trinidad et al. (1990a). Their significance is evident also from absolute somatic cell counts that were comparable with findings in animals infected by *Staphylococcus aureus*.

No data on absolute somatic cell counts in the secretions of juvenile mammary glands infected by environmental pathogens are given in the papers published by Boddie et al. (1987) and Trinidad et al. (1990a).

Our data on absolute somatic cell counts in lavages from juvenile mammary glands can be compared with the results published by the authors who tested squirt samples only with a certain limitation, because Boddie et al. (1987) tested undiluted samples and Trinidad et al. (1990a) samples diluted 1 : 4 with sterile physiological saline. Nevertheless, our results are in agreement in that the counts found in the mammary glands infected by contagious agents were higher than those found in the glands infected by minor pathogens and the latter were higher than those found in the noninfected glands. It can therefore be concluded that absolute somatic cell counts reflect the degree of pathogenicity of microbial agents also in juvenile quiescent glands.

Like Trinidad et al. (1990a), we found that macrophages were the predominant cell type in lavages from juvenile mammary glands of unbred heifers and that this dominance was preserved in infected glands in spite of an increase in the percentage of polymorphonuclear leukocytes. Unlike the above authors, we observed a decrease in the percentage of lymphocytes in lavages from infected glands. This pattern corresponds to findings in infected adult cows at the time of mammary gland involution (Targowski and Niemialowski, 1986). Trinidad et al. (1990a) found a highly significant increase in the percentage of lymphocytes in infected mammary glands, corresponding to the pattern observed in infected lactating cows (Targowski and Niemialowski, 1986).

Our results let us to conclude that juvenile mammary glands of unbred heifers are suitable objects for carrying out health tests before their incorporation into breeding. Catheterisation and lavage of the mammary gland sinuses yield a means suitable for sampling for both microbiological and cytological examinations.

Acknowledgement

The authors wish to thank Mrs. Věra Tůmová and Mrs. Eva Audová for their skilful technical assistance in cytological and microbiological examinations.

REFERENCES

- Blackburn P. S. (1955): A comparison of the diagnostic value of the total and differential cell counts of bovine milk. *J. Dairy Res.*, 22, 37–42.
- Boddie R. L., Nickerson S. C., Owens W. E., Watts J. L. (1987): Udder microflora in nonlactating heifers. *Agri-practice*, 12, 22–25.
- Concha C. (1986): Cells types and their immunological functions in bovine mammary tissues and secretions. *Nord VetMed.*, 38, 257–272.
- IDF Standard. Enumeration of somatic cells. 148A. 1995. 8 pp.
- Jonsson P., Olsson S. O., Olofson A. S., Falth C., Holmberg O., Funke H. (1991): Bacteriological investigation of clinical mastitis in heifers in Sweden. *J. Dairy Res.*, 58, 179–85.
- Matthews K. R., Harmon R. J., Langlois B. E. (1992): Prevalence of *Staphylococcus species* during the periparturient period in primiparous and multiparous cows. *J. Dairy Sci.*, 74, 1544–1549.
- Miller R. H., Paape M. J., Fulton L. A. (1991): Variation in milk somatic cells of heifers at first calving. *J. Dairy Sci.*, 74, 3782–3790.
- Nickerson S. C., Owens W. E., Boddie R. L. (1995): Mastitis in dairy heifers: Initial studies on prevalence and control. *J. Dairy Sci.*, 78, 1607–1618.
- Oliver S. P., Mitchell B. A. (1983): Intramammary infections in primigravid heifers near parturition. *J. Dairy Sci.*, 66, 1180–1183.
- Paape M. J., Guidry A. J., Jain N. C., Miller R. H. (1991): Leukocytic defense mechanisms in the udder. *Flem. Vet. J.*, 62, 95–109.
- Quinn P. J., Carter M. E., Markey M., Carter G. R. (1994): Clinical veterinary microbiology. London, Mosby. 118–345.
- Quiroga G. H., Nickerson S. C., Adkinson R. W. (1993a): Histologic response of the heifer mammary gland to intramammary infusion of interleukin-2 or interferon-gamma. *J. Dairy Sci.*, 76, 2913–2924.
- Quiroga G. H., Owens W. E., Nickerson S. C. (1993b): Response of heifer mammary gland macrophages and neutrophils to interferon-gamma stimulation *in vitro*. *Can. J. Vet. Res.*, 52, 212–221.
- Quiroga G. H., Sordillo L. M., Adkinson R. W., Nickerson S. C. (1993c): Cytologic responses of *Staphylococcus aureus*-infected mammary glands of heifers to interferon gamma and interleukin-2 treatment. *Am. J. Vet. Res.*, 54, 1894–1900.
- Ryšánek D., Babák V., Šedivá I. (1997): Využití somatických buněk k chovatelské prevenci mastitid. In: Problematika prvovýroby mléka XX. Praha, Milcom servis, České Budějovice, INPROF. 79–88.
- Sanchez M. S., Ford C. W., Yancey Jr. R. J. (1988): Evaluation of antibiotic effectiveness against *Staphylococcus aureus* surviving with the bovine mammary gland macrophage. *J. Antimicrob. Chemoth.*, 21, 773–786.
- Shearer J. K., Harmon R. J. (1993): Mastitis in heifers. *Vet. Clin. N. Am. Food A.*, 9, 583–595.
- Targowski S. P., Niemialowski M. (1986): Inhibition of lacteal leukocyte phagocytosis by colostrum, nonlactating secretion, and mastitis milk. *Am. J. Vet. Res.*, 47, 1940–1945.
- Tolle A. (1975): Mastitis – The disease in relation to control methods. In: Dodd F. H., Griffin T. K., Kingwill R. G. (ed.): Proc. IDF Seminar on Mastitis Control. Bruxelles, IDF. 3–15.
- Trinidad P., Nickerson S. C., Alley T. K. (1990a): Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid heifers. *J. Dairy Sci.*, 73, 107–114.
- Trinidad P., Nickerson S. C., Alley T. K., Adkinson R. W. (1990b): Efficacy of intramammary treatment in unbred and primigravid dairy heifers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 197, 465–470.

Wardley R. C., Rouse B. T., Babiuk L. A. (1976): The mammary gland of the ox: a convenient source for the repeated collection of neutrophils and macrophages. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 19, 29–36.

White D. G., Harmon R. J., Matos J. E. S. (1989): Isolation and identification of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine body sites and streak canals of nulliparous heifers. *J. Dairy Sci.*, 72, 1886–1892.

Zeidler H., Tolle A., Heeschen W. (1968): Importance of cytological and bacteriological findings in mastitis diagnosis. *Milchwissenschaft*, 23, 674–681.

Received: 99–02–04

Accepted after corrections: 99–03–15

Contact Address:

MVDr. Dušan R y š á n e k, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika
Tel. +420 5 41 32 12 41, fax +420 5 41 21 12 29, e-mail: rysanek@vri.cz

Oznamujeme čtenářům a autorům našeho časopisu,

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

Česká zemědělská univerzita v Praze

časopis

SCIENTIA AGRICULTURAE BOHEMICA

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

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

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

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

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SOMATIC CELLS FROM MAMMARY GLANDS OF UNBRED HEIFERS*

MORFOLOGICKÉ CHARAKTERISTIKY SOMATICKÝCH BUNĚK MLÉČNÉ ŽLÁZY NEPŘIPUŠTĚNÝCH JALOVIC

Z. Sládek¹, D. Ryšánek²

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

²Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: Juvenile mammary glands of unbred heifers were chosen as the object for studies of resistance of the bovine mammary gland to infection. The purpose of this work was to recognise the functional state of juvenile mammary glands of unbred heifers as reflected in absolute and differential counts and morphology of somatic cells. The results of determination of absolute and differential somatic cell counts of noninfected nonsecreting and noninfected aberrantly secreting mammary glands of unbred heifers, incl. morphologic cell characteristics are presented. The whole set included 160 mammary glands of which 135 (84.4%) were noninfected and nonsecreting, 7 (4.4%) noninfected and aberrantly secreting, and 18 (11.2%) infected. Absolute counts of somatic cells in lavages standardised on a constant volume (20 ml) were $(0.985 \pm 0.882) \cdot 10^6/\text{ml}$ and $(2.713 \pm 1.514) \cdot 10^6/\text{ml}$ for the noninfected nonsecreting and the aberrantly secreting glands, respectively. The difference was significant at $P < 0.05$. Macrophages of the nonvacuolised and vacuolized types predominated in the differential counts both in the nonsecreting (72%) and in the secreting (56.4%) glands. The vacuolized type represented degenerated macrophages and macrophages filled with fat globules in the nonsecreting and the aberrantly secreting glands, respectively. In addition to the typical polymorphonuclear leukocytes, cells showing a certain degree of degeneration were observed. Functional alterations in aberrantly secreting mammary glands were reflected in a marked increase in absolute somatic cell counts, in an increase of the proportion of polymorphonuclear leukocytes in differential cell counts, and a decrease in the proportion of lysed cells. Characteristics of absolute and differential somatic cell counts will be analysed as potential markers of resistance of the mammary gland to infection.

unbred heifers; juvenile mammary glands; functional state; somatic cells; absolute counts; differential counts

ABSTRAKT: Juvenilní mléčné žlázy nepřipuštěných jalovic byly zvoleny jako objekt studia rezistence bovinní mléčné žlázy k infekci. Účelem této práce bylo poznat funkční stav juvenilních mléčných žláz nepřipuštěných jalovic a jeho odraz na absolutní a diferenciální počet somatických buněk a jejich morfológické charakteristiky. Ze 160 mléčných žláz bylo 135 (84,4 %) neinfikovaných nesecernujících, sedm (4,4 %) neinfikovaných aberantně secernujících a 18 (11,2 %) infikovaných. Absolutní počet somatických buněk v laváži, standardizovaný na konstantní objem (20 ml), u neinfikovaných nesecernujících mléčných žláz činil $(0,985 \pm 0,882) \cdot 10^6/\text{ml}$, u secernujících $(2,713 \pm 1,514) \cdot 10^6/\text{ml}$. Rozdíl byl statisticky významný ($P < 0,05$). V diferenciálním počtu somatických buněk dominovaly makrofágy, a to jak u nesecernujících (72 %), tak i u secernujících (56,4 %) mléčných žláz. Makrofágy byly zastoupeny nevakuolizovaným a vakuolizovaným typem buněk. U nesecernujících žláz byl vakuolizovaný typ představitelem degenerovaných makrofágů. U secernujících žláz představoval vakuolizovaný typ makrofágů saturovaný fagocytovanými tukovými globulemi. Kromě typických polymorfonukleárních leukocytů byly pozorovány buňky, které vykazovaly určitý stupeň degenerativních změn. Změna funkčního stavu u aberantně secernujících žláz se výrazně podílí na zvýšení absolutního počtu somatických buněk a v diferenciálním počtu zvýšeným podílem polymorfonukleárních leukocytů a snížením podílu lýzovaných buněk. Charakteristiky absolutního a diferenciálního počtu somatických buněk budou testovány jako potenciální markery rezistence mléčných žláz vůči infekci.

nepřipuštěné jalovice; juvenilní mléčná žláza; funkční stav; somatické buňky; absolutní počet; diferenciální počet

INTRODUCTION

Professional phagocytes, including polymorphonuclear leukocytes and macrophages, as an important fac-

tor of natural defence of the mammary gland (Paape et al., 1991), have become objects of studies of many authors. Most of them investigated their differential counts and characteristics during the lactation period

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

(Blackburn, 1955; Schalm et al., 1971; Jensen and Eberhart, 1975; Newbould, 1978; Lee et al., 1980; Östenson et al., 1988; Emanuelson and Wever, 1989; Miller et al., 1991) and some of them concentrated on the period of mammary gland involution (Lee et al., 1969; Desiderio and Campbell, 1980; McDonald and Anderson, 1981; Lee et al., 1980; Nickerson, 1988).

The methods used in the above investigations included conventional smear and staining techniques (Lee et al., 1969; Schalm et al., 1971; Jensen and Eberhart, 1975; Desiderio and Campbell, 1980; McDonald and Anderson, 1981; Miller et al., 1991), scanning and transmission electron microscopy (Jensen and Eberhart, 1975; Russell et al., 1976; Paape and Wergin, 1977; Russell et al., 1977; Lee et al., 1980; Miller et al., 1991), differential counts in terms of cell volume (Newbould, 1975, 1978), and flow cytometry (Hagelton and Saad, 1986; Saad, 1987; Miller et al., 1993).

Juvenile mammary glands of unbred heifers have been chosen as a source of bovine fagocytic cells for *in vitro* studies (Wardley et al., 1976; Sanchez et al., 1988; Quiroga et al., 1993a) and effects of bacterial colonisation and infection of heifer's mammary glands were also studied (Boddie et al., 1987; Trinidad et al., 1990a,b; Quiroga et al., 1993b, c). Juvenile mammary glands of unbred heifers were chosen as the object of our investigations of resistance of the bovine mammary gland to infection (Ryšánek et al., 1996).

The purpose of this work was to recognise the function of the juvenile mammary gland of unbred heifers as reflected in absolute and differential counts and morphological characteristics of somatic cells.

MATERIAL AND METHODS

The investigations were carried out in 40 unbred heifers, crosses of Holstein and Bohemian Red Pied breeds aged 16 to 18 months. A total of 160 glands were examined. The glands were catheterized using a modified urological catheter (AC5306CH06 PORGES S.A., France) after thorough disinfection of the teat orifice and its surroundings, and washed with 20 ml 0.01M phosphate buffer solution (PBS), pH 7.4, warmed to 37 °C. Samples for bacteriological examination and determination of absolute somatic cell counts were taken from the obtained cell suspensions under sterile conditions immediately after the lavage. Then the suspensions were centrifuged at 4 °C and 200 g for 10 min. The supernatant was removed, the pellet was resuspended in 0.5 ml PBS and smears were prepared using the standard haematological technique. One smear was prepared from each mammary gland. The smears were dried and treated with Pappenheim stain (Wolf, 1953). Two hundred cells were counted in each smear to determine the differential count.

Bacteriological examinations were carried out using aerobic culture in blood agar with 5% washed sheep erythrocytes, the cultures were incubated at 37 °C for

24 h and the colonies were identified using the procedures described in Clinical Veterinary Microbiology (Quinn et al., 1994). Only samples collected from noninfected glands were selected for further investigations. Observations on infected mammary glands are the aim of another work.

Absolute counts of somatic cells were determined using the Fossomatic 90 (A/C N. Foss Electric, Denmark) instrument and the procedure recommended by the International Dairy Federation (IDF, 1995). Cell counts were according to the procedure standardised on constant sample volume of 20 ml. Differential somatic cell counts and cytometry were evaluated using a light microscope Jenamed 250 CF (Carl Zeiss, Jena, Germany), a colour camera 3-CCD HV-C20 (Hitachi Denshi, Japan) and the image analysis software Lucia G (Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic) for image digitalization.

RESULTS

Functional status

Of the initial 160 sampled mammary glands, lavages of 135 (84.4%) noninfected nonsecreting, 7 (4.4%) noninfected aberrantly secreting and 18 (11.2%) infected glands. Only noninfected nonsecreting and noninfected aberrantly secreting glands were selected for further investigation.

Absolute cell counts

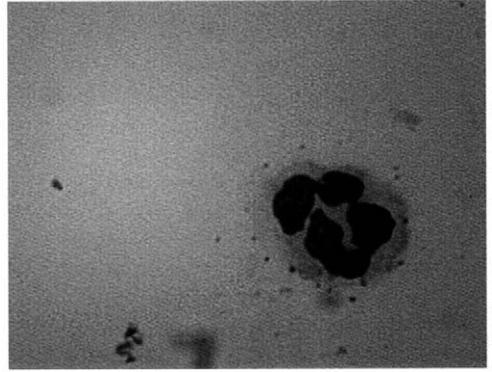
Mean absolute counts of somatic cells were $(0.985 \pm 0.882) \cdot 10^6/\text{ml}$ and $(2.713 \pm 1.514) \cdot 10^6/\text{ml}$ for the nonsecreting and the aberrantly secreting glands, respectively. The difference was significant at $P < 0.05$.

Morphologic characteristics

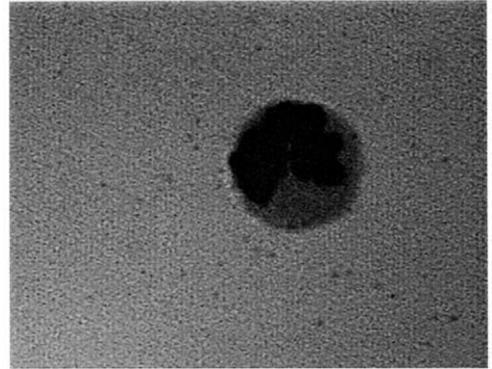
The following somatic cell categories were included in the differential counts: polymorphonuclear leukocytes (PMN), macrophages (MAC), lymphocytes (LYM) and other cells (epithelial, eosinophilic granulocytes and unidentified cells - OC).

PMN were oval, elliptic or irregular in shape and their size ranged from 7.3 to 9.5 μm . Nuclei were regularly segmented and the 3 to 5 segments were interconnected by bridges. The segments were either accumulated or arranged to form the letters S, L, or C (Fig. 1). The condensed, compact chromatin of the nuclear segments was dark violet. The cytoplasm of PMN was homogeneous, light pink to light red, sometimes indistinct, and contained a larger or a smaller amount of light pink and occasionally clear granules (Fig. 1). Cells with no granules in the cytoplasm were observed, too. Cytoplasmic membrane of PMN formed typical pseudopodia with a wider basis (Fig. 1). Besides apparently normal PMN, also abnormal forms showing vari-

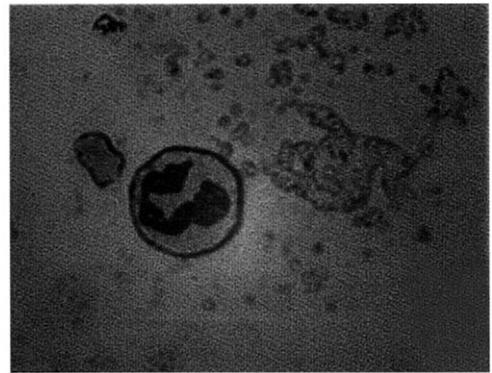
1. Polymorphonuclear leukocyte - normal cell with segmented nucleus, homogenous cytoplasm contained smaller amount of granules and with cytoplasmatic membrane formed pseudopodia (1 000x)



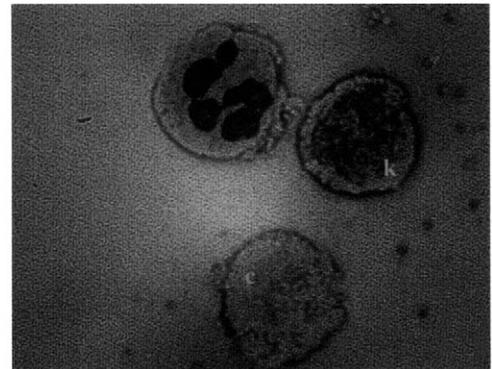
2. Polymorphonuclear leukocyte with the first sign of degeneration, including loss of pseudopodia and the ensuing reshaping into a spherical form, where followed by oedematous swelling of the nucleus, cytoplasm and the whole cell (1 000x)

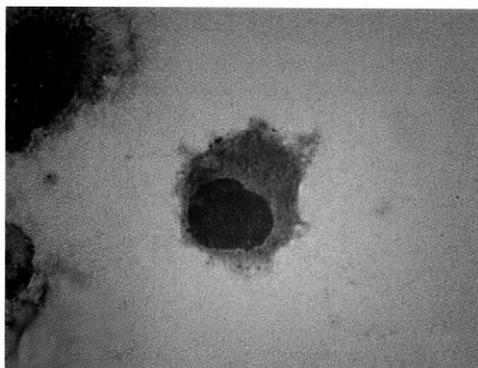


3. Polymorphonuclear leukocyte - next step of degeneration -an increase of light refraction index of cytoplasmatic membrane (1 000x)



4. Polymorphonuclear leukocytes - terminal stage of degeneration - karyolysis (k) and cytolysis (c) (1 000x)

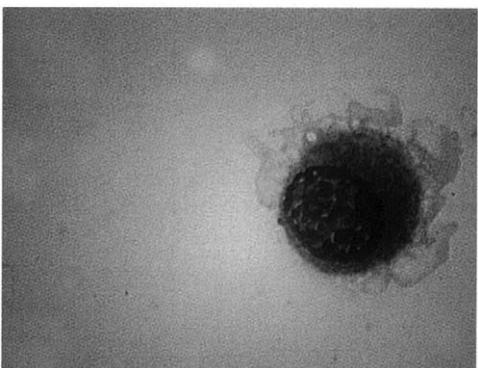




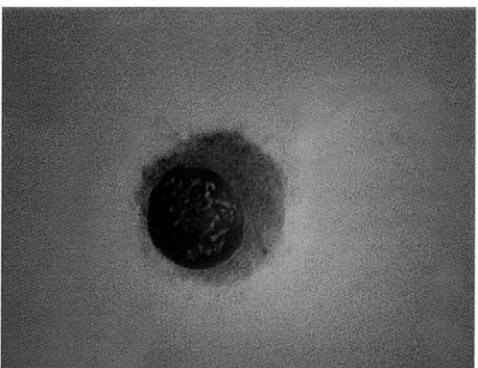
5. Nonvacuolized macrophage with oval nucleus and conical projections (1 000x)



6. Nonvacuolized macrophages with spherical shape and short projections (1 000x)

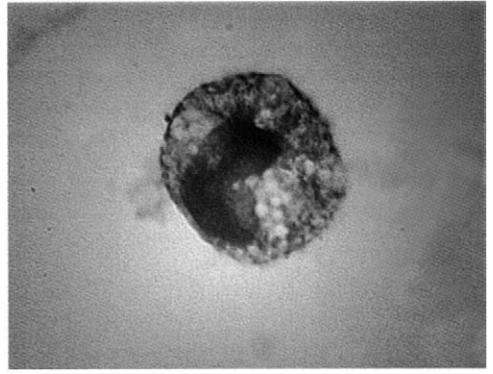


7. Nonvacuolized macrophage with the first sign of degeneration: dispersion of nuclear chromatin. Cytoplasmic membrane forms a long projections (1 000x)

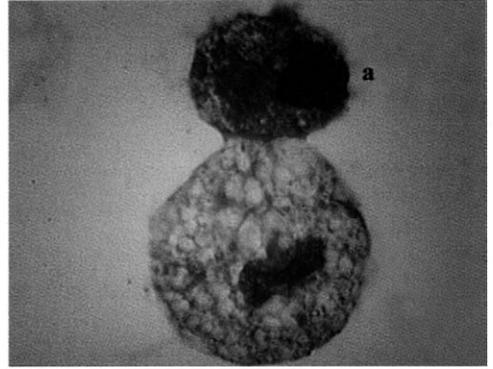


8. Nonvacuolized macrophage with the first sign of degeneration: dispersion of nuclear chromatin (1 000x)

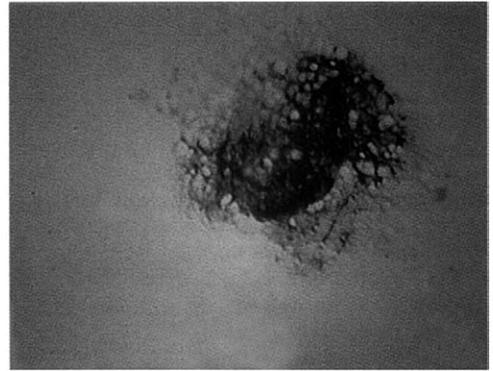
9. Vacuolized macrophage showed degeneration in the nucleus and cytoplasm (1 000x)



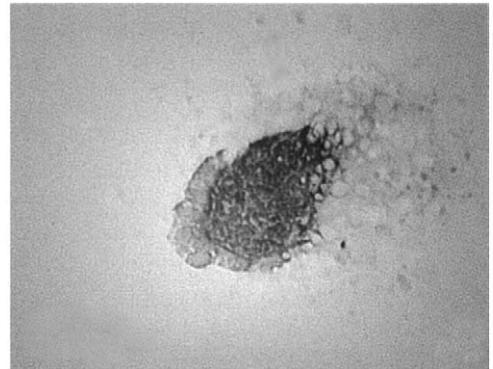
10. Vacuolized macrophages - degenerative changes of nucleus, including their reduction in size and wrinkling and coarse structure of chromatin (a) and macrophage with intensive foamy cytoplasm (1 000x)

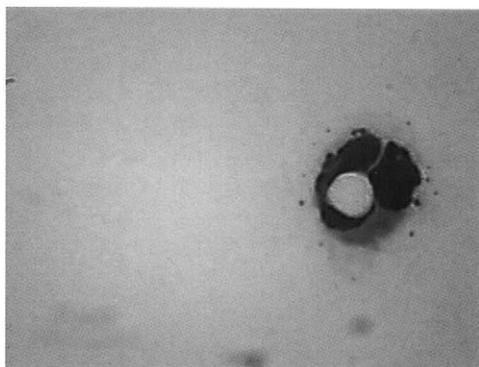


11. Vacuolized macrophages - terminal stage of macrophage degeneration characterized by karyorhexis and cytolysis (1 000x)

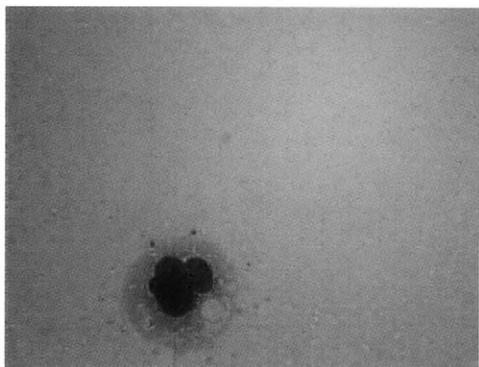


12. Vacuolized macrophages - terminal stage of macrophage degeneration characterized by karyorhexis and cytolysis (1 000x)

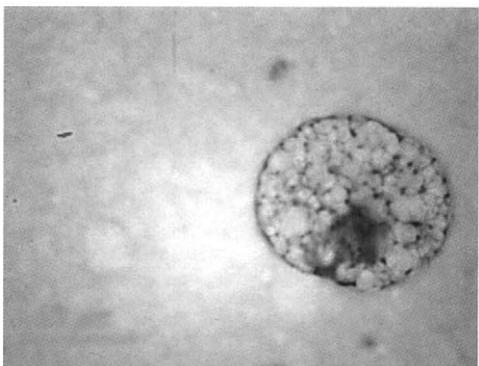




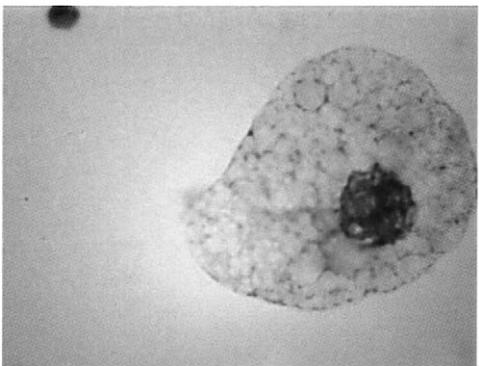
13. Polymorphonuclear leukocyte - the fat globule took the central position displacing the C-shaped nucleus to the cell periphery (1 000x)



14. Polymorphonuclear leukocyte - peripheral fat globule and centrally located accumulated nuclear segments (1 000x)



15. Macrophage - spherical shape with phagocytized fat globules and foamy appearance (1 000x)



16. Macrophage - irregular shape with phagocytized fat globules and foamy appearance (1 000x)

ous degrees of degeneration were seen. The first sign of degeneration, including loss of pseudopodia and the ensuing re-shaping into a spherical form (Fig. 2), were followed by swelling of the nucleus, cytoplasm and the whole cell. An increase of light refraction of cytoplasmic membrane (Fig. 3) was followed by karyorhexis, karyolysis and cytolysis (Fig. 4) as the terminal stage of the abnormal PMN. These signs of necrotic destruction of PMN were dominant, while apoptosis of PMN was observed only sporadically (data not shown).

Vacuolized and nonvacuolized types of MAC were present in juvenile mammary glands of heifers. The structure of the nonvacuolized type corresponded to that of blood monocytes. The spherical or oval nucleus was filled with dark bluish-violet homogeneous chromatin (Fig. 5 to 8). The cytoplasm was light violet or bluish-violet and its volume was larger than that of the nucleus. The cell size ranged between 10 and 15 μm . Like in PMN, the cytoplasmic membrane formed a large number of conical or irregular, shorter (Fig. 6), or longer (Fig. 5) projections. Dispersion of nuclear chromatin was observed in this cell type as the initial sign of degeneration (Fig. 7 and 8).

The vacuolized MAC showed various degrees of degeneration apparent particularly in the nucleus and cytoplasm (Fig. 9 to 12). The nuclei of most cells were kidney-, S-, or rod-shaped and filled with a heterogeneous mass of dispersed chromatin arranged in a chain-like structure. Degenerative changes of nuclei, including their reduction in size and wrinkling and coarse structure of chromatin, were also observed (Fig. 9 and 10). More or less vacuolized („foamy”) cytoplasm containing mostly small white greyish granules was typical of this type of MAC. The light refraction of the cytoplasmic membrane was high, or the membrane was inexpressive. No pseudopodia were observed and cell borders were frayed or even indistinct. The size of this cell type ranged between 18 and 38 μm . The terminal stage of macrophage degeneration was characterized by karyorhexis, karyolysis, and cytolysis (Fig. 11 and 12).

PMN containing fat globules in their cytoplasm were found in samples collected from the aberrantly secreting mammary glands. In such cases, the fat globules took the central position displacing the C-shaped nucleus to the periphery (Fig. 13). Peripheral fat globules and centrally located accumulated nuclear segments were observed, too (Fig. 14). The granules were displaced to the border of the cytoplasmic membrane in PMN containing fat globules in their cytoplasm (Fig. 13 and 14).

MAC showing a specific structure were observed in samples collected from the aberrantly secreting juvenile mammary glands of unbred heifers. Intensive vacuolisation of cytoplasm was typical of these very large cells with a diameter of up to 50 μm . The wrinkled and irregularly shaped nucleus was mostly displaced to the cell periphery. Cytoplasm was filled with a large amount of phagocytized white to greyish fat globules giving it a foamy appearance (Fig. 15 and 16).

No pseudopodia were seen and most of the cells were spherical (Fig. 15).

Lymphocytes in lavages of juvenile mammary glands of heifers were small and medium-sized with a structure corresponding fully to that of circulating LYM. Spherical nuclei of the small LYM, filling the whole or a larger part of the cell volume, contained homogeneous deep dark blue chromatin. Indents giving the nucleus irregular shape were seen occasionally. In most cells, cytoplasm was indistinct or formed a narrow smoky bluish sickle. The size of the small LYM ranged from 5.8 to 7.0 μm . The medium-sized LYM with a diameter of 10 μm had spherical nuclei showing the same staining characteristics as the small LYM. Cytoplasm surrounded the nucleus as a blue border extending over 3/4 of its circumference.

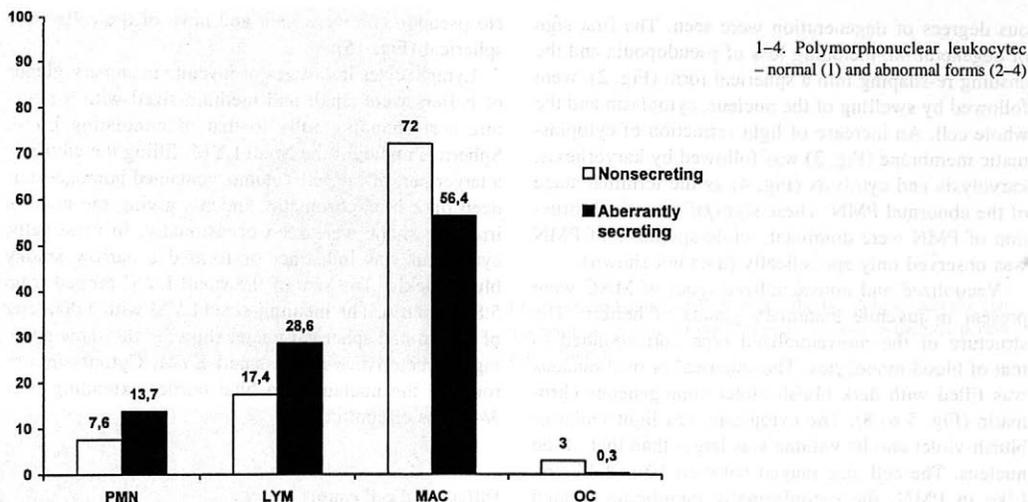
Differential cell counts

Particularities in the proportions of somatic cells in nonsecreting and aberrantly secreting mammary glands are presented in Fig. 17 and Tab. I. Typical for noninfected nonsecreting mammary glands was a low proportion of PMN, of which 34.2% were lysed, and high proportion of MAC, of which 39.6% were lysed, respectively. The PMN:MAC ratio was approx. 1 : 9. Compared with the nonsecreting glands, PMN from aberrantly secreting glands were twice as high. MAC predominated in the somatic cell population, but the PMN : MAC ratio was lower (1 : 4). Only minimal lysis of both PMN and MAC was observed. LYM counts were higher in the aberrantly secreting than in the nonsecreting noninfected mammary glands.

DISCUSSION

The change of the functional state of juvenile mammary glands considerably influenced the absolute counts of somatic cells. An increased number of cells was found in lavages from aberrantly secreting juvenile mammary glands. This finding is consistent with changes reflecting the functional state of the mammary gland of adult animals as described, among others, by Concha (1986) and Targowski and Niemialtowski (1986).

We have also found that MAC predominate among the cell types in nonsecreting and aberrantly secreting mammary glands. The proportion of MAC was higher in nonsecreting juvenile mammary glands than in lactating cows, as described by Schalm et al. (1971), Lee et al. (1980), and Nickerson (1985), or at the time of mammary gland involution as reported by Lee et al. (1980), Jensen and Eberhart (1981), McDonald and Anderson (1981) and Nickerson (1988). On the other hand, differential cell counts in aberrantly secreting juvenile mammary glands were almost identical with findings in lactating adult cows as described by Schalm et al. (1971), Lee et al. (1980), and Nickerson (1985).



1. Differential counts of phagocytes from juvenile mammary glands

Mammary gland	Nonsecreting	Aberrantly secreting
PMN (%)	7.6	13.7
PMN normal (%)	5.0	12.4
PMN lysed (%)	2.6	1.3
PMN normal/lysed	2 : 1	10 : 1
MAC (%)	72.0	56.4
MAC normal (%)	43.5	50.3
MAC lysed (%)	28.5	6.1
MAC normal/lysed	3 : 2	1 : 9
PMN : MAC	1 : 9	1 : 4

Two different types of MAC were observed in juvenile mammary glands. The structure of one of them corresponded to that of circulating monocytes and has been described as monocyte in heifers (Wardley et al., 1976), or as nonvacuolised macrophage in cows (Lee et al., 1980). Marked vacuolization was characteristic of the other type, denoted as foamy cells (Lee et al., 1969), as vacuolized mononuclear cells (Jensen and Eberhart, 1975), as vacuolized MAC in cows (Lee et al., 1980) and as MAC in heifers (Wardley et al., 1976).

Vacuolized MAC predominated in nonsecreting juvenile mammary glands. This predominance of vacuolized MAC is probably characteristic of quiescent mammary glands. The vacuolization of MAC is a sign of degenerative changes associated with aging of cells and preceding cell lysis. This opinion is consistent with data published by Wardley et al. (1976), who observed monocytes (nonvacuolised MAC) in heifers 72 h after stimulation of the mammary gland with lipopolysaccharide, while MAC (vacuolized) predominated on day 5 after the stimulation.

It is generally known that suckling of juvenile mammary glands can induce secretion of aberrant milk, but no data on its cytological pattern were found in avail-

able literature. Our investigations showed that almost all MAC seen in the aberrant milk belonged to the vacuolized type. Their cytoplasm was filled with phagocytized lipid globules and their shape was spherical due to increased turgor and loss of pseudopodia. In this case, the vacuolization of MAC resulted from active phagocytosis of fat globules as described for lactating dairy cows (Schalm et al., 1971; Lee et al., 1980; Nickerson, 1985). This statement is supported by our findings of ratios between non-lysed and lysed MAC in nonsecreting and secreting juvenile mammary glands. In the quiescent glands, the counts of lysed MAC were considerably higher than in the aberrantly secreting glands. We assume that the onset of secretion by a juvenile mammary gland induces influx of MAC. We assume that the low percentage of lysed MAC in aberrantly secreting mammary glands results from their migration to regional lymph nodes, as observed also in involuting mammary glands. This process is considered the most important mechanism of removal of milk fat from involuting mammary glands (Lee et al., 1969).

In quiescent mammary glands, the count of PMN is apparently lower than during lactation (Schalm et al., 1971; Nickerson, 1985; Targowski and Niemialowski, 1986), or involution (McDonald and Anderson, 1981; Concha, 1986; Nickerson, 1988), or after stimulation of juvenile mammary glands of heifers with lipopolysaccharide (Wardley et al., 1976). On the other hand, the PMN counts in secreting juvenile mammary glands approached the value reported for normal lactation by Concha (1986).

It can be concluded that PMN counts reflect the functional state of the mammary gland under both physiological and pathological conditions. Activation of the mammary gland always leads to an increase in the number of PMN.

Differential counting of PMN from nonsecreting juvenile mammary glands revealed degenerative changes,

such as swollen nuclear lobes, spherical shape, loss of pseudopodia, or lysis of some cells, regarded as signs of aging. Similar forms of degeneration of PMN were described by Nickerson et al. (1985), Nickerson et al. (1986), Lintner and Eberhart (1990), and Paape et al. (1990).

Several causes are involved in the degeneration of PMN. One of the initiating factors is the migration of PMN moving them away from their sources of energy (Naidu and Newbould, 1973). Another factor leading to degenerative cell destruction is the ensuing phagocytosis associated with respiratory burst (Broide, 1987). Degeneration of PMN is also initiated by phagocytosis of corpuscular elements of milk (Russell et al., 1976; Paape et al., 1977; Paape and Guidry, 1977; Paape and Wergin, 1977; Russell et al., 1977). The degeneration observed in our studies as a sign of aging on the one hand, and the consequences of cytotoxicity as described by Nickerson et al. (1985) document the variety of factors that can induce morphologically similar effects.

Further attention will be paid to characteristics of absolute and differential somatic cell counts as possible markers of resistance of the mammary gland to infection, as well as to recognition of mechanisms of events preceding cell death, i.e. degeneration and apoptosis.

REFERENCES

Blackburn P. S. (1955): A comparison of the diagnostic value of the total and differential cell counts of bovine milk. *J. Dairy Res.*, **22**, 37–42.

Boddie R. L., Nickerson S. C., Owens W. E., Watts J. L. (1987): Udder microflora in nonlactating heifers. *Agri-Practice*, **12**, 22–25.

Broide D. H. (1987): Buňky zánětu. s. 130–140. In: Stites D. P., Terr A. I. (eds.): *Základní a klinická imunologie*. Praha, Victoria Publishing, 130–140.

Concha C. (1986): Cells types and their immunological functions in bovine mammary tissues and secretions. *Nord VetMed.*, **38**, 257–272.

Desiderio J. V., Campbell S. G. (1980): Bovine mammary gland macrophages: isolation, morphologic features, and cytophilic immunoglobulins. *Am. J. Vet. Res.*, **41**, 1595–1599.

Emanuelson U., Wever P. (1989): Potential and differential somatic cell counts as indicators of mastitis in quarter milk samples from dairy cows. *Acta Vet. Scand.*, **30**, 475–481.

Hageltorn M., Saad M. A. (1986): Flow cytometric characterization of bovine blood and milk leukocytes. *Am. J. Vet. Res.*, **47**, 2012–2016.

IDF Standard. Enumeration of somatic cells. 148A. 1995. 8 pp.

Jensen D. L., Eberhart R. J. (1975): Macrophages in bovine milk. *Am. J. Vet. Res.*, **36**, 619–624.

Jensen D. L., Eberhart R. J. (1981): Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. *Am. J. Vet. Res.*, **42**, 743–747.

Lee C. S., McDowell G. H., Lascelles A. K. (1969): The importance of macrophages in the removal of fat from the involuting mammary gland. *Res. Vet. Sci.*, **10**, 34–38.

Lee C. S., Wooding F. B. P., Kemp P. (1980): Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows. *J. Dairy Res.*, **47**, 39–50.

Lintner S., Eberhart R. J. (1990): Effect of antibiotics on phagocyte recruitment, function, and morphology in the bovine mammary gland during the early nonlactating period. *Am. J. Vet. Res.*, **51**, 533–542.

McDonald J. S., Anderson A. J. (1981): Total and differential somatic cell counts in secretions from noninfected bovine mammary glands: the peripartum period. *Am. J. Vet. Res.*, **42**, 1366–1368.

Miller R. H., Paape M. J., Fulton L. A. (1991): Variation in milk somatic cells of heifers at first calving. *J. Dairy Sci.*, **74**, 3782–3790.

Miller R. H., Paape M. J., Filep R., Link S. (1993): Flow cytometric analysis of neutrophils in cow's milk. *Am. J. Vet. Res.*, **54**, 1975–1979.

Naidu T. G., Newbould F. H. S. (1973): Glykogen in leukocytes from bovine blood and milk. *Can. J. Comp. Med.*, **37**, 44–55.

Newbould F. H. S. (1975): A technique for differential somatic counts in milk. In: *Proc. IDF Seminar on Mastitis Control*. Dodd F. H., Griffin T. K., Kingwill R. G. (eds.). Bruxelles, IDF. 136–141.

Newbould F. H. S. (1978): Effect of several factors on total and differential counting of somatic cells in farm bulk tank milk. *J. Food Protect.*, **41**, 96–99.

Nickerson S. C. (1985): Immune mechanisms of the udder: An overview. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **187**, 1255–1269.

Nickerson S. C. (1988): Immunological aspect of mammary involution. In: Nickerson S. C. (ed.): *Dairy Research Report*. Homer, USA, Louisiana Agricultural Experimental Station. 231–251.

Nickerson S. C., Paape M. J., Dulin A. M. (1985): Effect of antibiotics and vehicles on bovine mammary polymorphonuclear leukocyte morphologic features, viability, and phagocytic activity *in vitro*. *Am. J. Vet. Res.*, **46**, 2259–2265.

Nickerson S. C., Paape M. J., Harmon R. J., Ziv G. (1986): Mammary leukocyte response to drug therapy. *J. Dairy Sci.*, **69**, 1733–1742.

Östenson K., Hageltorn M., Astrom G. (1988): Differential cell counting in fraction-collected milk from dairy cows. *Acta Vet. Scand.*, **29**, 493–500.

Paape M. J., Guidry A. J. (1977): Effect of fat and casein on intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by milk leukocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **155**, 588–593.

Paape M. J., Wergin W. P. (1977): The leukocyte as a defence mechanism. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **170**, 1214–1223.

Paape M. J., Pearson R. E., Wergin W. P., Guidry A. J. (1977): Enhancement of chemotactic response of polymorphonuclear leukocytes into the mammary gland and isolation from milk. *J. Dairy Sci.*, **60**, 53–62.

Paape M. J., Nickerson S. C., Ziv G. (1990): *In vivo* effect of chloramphenicol, tetracycline, and gentamycin on bovine neutrophil function and morphologic features. *Am. J. Vet. Res.*, **51**, 1055–1061.

- Paape M. J., Guidry A. J., Jain N. C., Miller R. H. (1991): Leukocytic defence mechanisms in the udder. *Flem. Vet. J.*, 62, 95 – 109.
- Quiroga G. H., Owens W. E., Nickerson S. C. (1993a): Response of heifer mammary gland macrophages and neutrophils to interferon-gamma stimulation *in vitro*. *Can. J. Vet. Res.*, 52, 212–221.
- Quiroga G. H., Sordillo L. M., Atkinson R. W., Nickerson S. C. (1993b): Cytologic responses of *Staphylococcus aureus*-infected mammary glands of heifers to interferon gamma and interleukin-2 treatment. *Am. J. Vet. Res.*, 54, 1894–1900.
- Quiroga G. H., Nickerson S. C., Atkinson R. W. (1993c): Histologic response of the heifer mammary gland to intramammary infusion of interleukin-2 or interferon-gamma. *J. Dairy Sci.*, 76, 2913–2924.
- Quinn P. J., Carter M. E., Markey M., Carter G. R. (1994): Clinical veterinary microbiology. London, Mosby. 118–345.
- Russell M. W., Brooker B. E., Reiter B. (1976): Inhibition of the bactericidal activity of bovine polymorphonuclear leukocytes and related systems by casein. *Res. Vet. Sci.*, 20, 30–35.
- Russell M. W., Brooker B. E., Reiter B. (1977): Electron microscopic observations of the interaction of casein micelles and milk fat globules with bovine polymorphonuclear leukocytes during the phagocytosis of staphylococci in milk. *J. Comp. Path.*, 87, 43–52.
- Ryšánek D., Babák V., Sládek Z., Toman M. (1996): Znaky rezistence mléčné žlázy skotu vůči infekci. Project NAZV ČR No. EP 9600027162-09.
- Saad, A. M. (1987): Flow cytometric measurement of bovine milk neutrophil phagocytosis. *Acta Vet. Scand.*, 28: 333–342.
- Sanchez M. S., Ford C. W., Yancey R. J. (1988): Evaluation of antibiotic effectiveness against *Staphylococcus aureus* surviving within the bovine mammary gland macrophage. *J. Antimicrob. Chemoth.*, 21, 773–786.
- Schalm O. W., Carrol E. J., Jain N. C. (1971): Number and types of somatic cells in normal and mastitis milk. In: Schalm O. W., Carrol E. J., Jain N. C. (eds.): *Bovine mastitis*. Philadelphia. 94–123.
- Targowski S. P., Niemialtowski M. (1986): Inhibition of lacteal leukocyte phagocytosis by colostrum, nonlacting secretion, and mastitis milk. *Am. J. Vet. Res.*, 47, 1940–1945.
- Trinidad P., Nickerson S. C., Adkinson R. W. (1990a): Histopathology of staphylococcal mastitis in unbred dairy heifers. *J. Dairy Sci.*, 73, 639–648.
- Trinidad P., Nickerson S. C., Alley T. K. (1990b): Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid heifers. *J. Dairy Sci.*, 73, 107–114.
- Wardley R. C., Rouse B. T., Babiuk L. A. (1976): The mammary gland of the ox: a convenient source for the repeated collection of neutrophils and macrophages. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 19, 29–36
- Wolf J. (1953): *Mikroskopická technika*. Praha, SZN. 651 s.

Received: 99-01-12

Accepted after corrections: 99-03-23

Contact Address:

MVDr. Dušan Ryšánek, 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: rysanek@vri.cz

PRESENCE OF ANTIBODIES TO SOME ZOONOSES IN MOUFLONS (*OVIS MUSIMON PALL.*) AND FALLOW DEER (*DAMA DAMA L.*) IN EASTERN SLOVAKIA

VÝSKYT PROTILÁTKOVI PROTI VYBRANÝM ZOONÓZAM U MUFLÓNOV (*OVIS MUSIMON PALL.*) A DANIELOV ŠKVRNITÝCH (*DAMA DAMA L.*) NA VÝCHODNOM SLOVENSKU

M. Trávníček¹, D. Guryčová², M. Halanová¹, O. Kožuch³, D. Nadzamová⁴, J. Miško¹

¹ University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

² Institute of Epidemiology, Faculty of Medicine, P. J. Šafárik University, Košice, Slovak Republic

³ Institute of Virology, Slovak Academy of Science, Bratislava, Slovak Republic

⁴ Institute of Parasitology, Slovak Academy of Science, Bratislava, Slovak Republic

ABSTRACT: Results of serological examinations are presented that were carried out in a group of 37 mouflons (*Ovis musimon* Pall.) and in a group of 24 head of fallow deer (*Dama dama* L.) coming from the game preserve of Rozhanovce experimental facility affiliated to the University of Veterinary Medicine at Košice. Usual methods were used to examine blood sera for these zoonoses: chlamydiosis, tularemia, leptospiroses, Lyme borreliosis, encephalitozoonosis and tick-borne encephalitis. High positivity to chlamydiosis was detected – 43.2% in mouflons and 87.5% in fallow deer. As for the other zoonoses, antibodies were detected to *Francisella tularensis* in 18.9% of mouflons and 29.2% of fallow deer, respectively, to *Borrelia burgdorferi* in 10.7% and 45.8%, to *Encephalitozoon cuniculi* in 13.5% and 8.3%. Virus-neutralizing antibodies to tick-borne encephalitis were detected in 54.4% and 45.8%, respectively. Examinations for leptospiroses confirmed antibodies in the group of mouflons only – 10.7%, and only to the serovar of *Leptospira grippityphosa*. The results confirm the presence of all zoonoses under observation, except leptospirosis in fallow deer, and demonstrate the need to extend and to enhance the study of these and other zoonoses in wild game and in game in general, in reservoir animals and hematophagous arthropods.

zoonoses; antibodies; *Ovis musimon* Pall.; *Dama dama* L.

ABSTRAKT: V práci autori prezentujú výsledky sérologických vyšetrení skupiny 37 ks muflónov (*Ovis musimon* Pall.) a skupiny 24 danielov škvrnitých (*Dama dama* L.) pochádzajúcich zo zvernice účelového zariadenia Rozhanovce, patriaceho Univerzite veterinárskeho lekárstva v Košiciach. Krvné séra boli vyšetrené príslušnými metódami na nasledujúce vybrané zoonózy: chlamydióza, tularémia, leptospirózy, lymfická borelióza, encefalitozoonóza a kliešťová encefalitída. Vysoká pozitivita bola zistená na chlamydiózu – u muflónov 43,2 %, u danielov 87,5 %. U ďalších zoonóz boli protilátky detekované proti *Francisella tularensis* v 18,9 % resp. v 29,2 %, proti *Borrelia burgdorferi* v 10,7 % resp. v 45,8 %, proti *Encephalitozoon cuniculi* v 13,5 % resp. v 8,3 %. Vírus neutralizačné protilátky proti kliešťovej encefalitíde boli zistené v 54,4 % resp. 45,8 %. Vyšetrenie na leptospirózy potvrdilo protilátky len v skupine muflónov – 10,7 % a len voči sérovaru *Leptospira grippityphosa*. Prezentované výsledky potvrdzujú prítomnosť všetkých sledovaných zoonóz, s výnimkou leptospirózy u danielov, a súčasne potvrdzujú potrebu rozšíriť a prehĺbiť štúdium týchto a ďalších zoonóz u voľne žijúcej a poľovnej zveri, rezervoárových zvierat a krv cicajúcich arthropodov.

zoonózy; protilátky; muflón *Ovis musimon* Pall.; *Dama dama* L.

ÚVOD

Voľne žijúca a lovná zver prichádza do priameho kontaktu s rezervoárovými zvieratami, resp. krv cicajúcim hmyzom, ktoré sú, resp. môžu byť prameňom zoonóz a ktoré súčasne predstavujú zástupcov prírodného ohniska nákazy v danom biotope. Voľne žijúca zver

a hospodárske zvieratá často zdieľajú tie isté pastviny, čím vzniká možnosť nepriameho kontaktu a možnosť prenosu nákazy. Frekvencia kontaktov človeka najmä s lovnou zverou sa stále zvyšuje, tým vzniká potenciálna možnosť prenosu zoonóz najmä na profesionálne exponované osoby. Pri niektorých zoonózach sa uplatňujú ako rezervoáre viaceré druhy zvierat, z ktorých

obvyčajne jeden býva dominantný. Ekologické podmienky sa líšia podľa jednotlivých geografických oblastí, čo ovplyvňuje aj existenciu rezervoárových zvierat a hmyzu.

Informácií o výskyte zoonóz u voľne žijúcich zvierat je pomerne málo. Práce publikované v našej a svetovej literatúre prinášajú však zaujímavé a dôležité informácie o výskyte protilátok voči niektorým zoonózam. Protílátky voči *Chlamydia psittaci* potvrdili v Čechách u jeleňov Věžník a i. (1996), v Taliansku Capelli a i. (1996), v Nemecku Dedek a i. (1991), ktorí zistili séropozitivitu voči chlamýdiám aj u srncov a danielov. Giacometti a i. (1995) informujú o séropozitivite voči chlamýdiám u kozy alpskej (*Capra i. ibex*). Sledovaním chlamydiózy u drobných cicavcov sa venovali Čisláková a i. (1993, 1999).

Tularémia postihuje široký okruh hostiteľov. Z voľne žijúcich, resp. lovných druhov zvierat sa traduje predovšetkým zajac (*Lepus europeus*) ako najvýznamnejší hostiteľ a prameň nákazy pre ľudí. Rezervoárom nákazy pre voľne žijúce zvieratá a tiež pre človeka sú drobné zemné cicavce, ktorých premnoženie znamená aj väčší výskyt ochorení voľne žijúcich zvierat.

Leptospirózy predstavujú zoonózu, ktorá bola sledovaná v našich podmienkach už od začiatku 60. rokov (Mittermayer a i., 1961). Výsledky sérologických vyšetrení na leptospirózu u lovných zvierat v poslednom období publikujú Tremel a Nešňalová (1993). O výskyte protilátok proti leptospírám u drobných hlodavcov na východnom Slovensku referujú Stanko a i. (1996). Pozitívne nálezy u jeleňov publikujú v Taliansku Capelli a i. (1996) a v Panónskej nížine Orlič a i. (1991).

O výsledkoch vyšetrenia na lysmskú boreliózu u zajacov, diviakov a bažantov referujú Juřicová a i. (1996). Pôvodcom ochorenia v Európe okrem *Borrelia burgdorferi* sú aj *B. garini* a *B. afzelii*.

Problematike mikrosporidióz sa začala venovať pozornosť na Slovensku od roku 1995, kedy boli podané prvé dôkazy ich výskytu u zvierat (Bálet a i., 1995; Hipíková a i., 1995; Levkut a i., 1996; Štefkovič a i., 1998; Halanová a i., 1998). Encefalitozoonóza bola dokázaná aj u ľudí (Čisláková a i., 1997a, b, 1998).

Oblasť východného Slovenska je známa výskytom vírusu kliešťovej encefalitídy od roku 1953. O pozitívnych sérologických nálezoach u lovných zvierat (srnec, daniel, jeleň, muflón a ďalšie) v oblasti Záhoria referujú Kožuch a i. (1976). Gerth a i. (1995) publikujú pozitívne výsledky u srncov ulovených v južnom Nemecku.

Cieľom práce bolo zistiť výskyt protilátok proti pôvodcom šiestich významných zoonóz a posúdiť potrebu ich ďalšieho štúdia.

MATERIÁL A METÓDA

Ako materiál boli použité krvné séra od 37 muflónov (*Ovis musimon* L.) a 24 danielov škrvničných (*Dama dama* L.), ktoré pochádzajú zo zvernice účelového zariadenia Rozhanovce patriaceho Univerzite veterinárskemu lekárstvu v Košiciach. Krv bola odobratá z *vena*

jugularis po odchyte a fixácii zvierat. Zvernica Rozhanovce má rozlohu 500 ha, rozkladá sa v členitom teréne v nadmorskej výške asi 500 m n. m., kde asi 1/4 plochy predstavujú lúky a pastviny a 3/4 predstavuje zmiešaný listnato-ihličnatý les s prevahou listnatých stromov. Zvernica je určená na chov muflónov (asi 200 ks) a danielov (asi 100 ks). Chovaná zver má priamy a plný kontakt s protredím s výnimkou predátorov.

Na detekciu protilátok voči *Chlamydia psittaci* bola použitá mikrometóda komplement viažúcej reakcie za použitia rodovo špecifického antigénu *C. psittaci* pre KVR firmy Bioveta, Ivanovice na Hané. Za pozitívne sa považovali protílátky od titra 1 : 16.

Pre potvrdenie protilátok voči *Franciscella tularensis* bola použitá metóda skúmavkovej aglutinácie a metóda nepriamej hemaglutinačnej reakcie. Ako pozitívne boli hodnotené séra od riedenia 1 : 20.

Pre diagnostiku leptospiróz bola použitá mikroaglutinolýzová reakcia za použitia 12 sérovarov leptospír (*L. icterohaemorrhagiae*, *L. copenhageni*, *L. grippityphosa*, *L. sejroe*, *L. saxkoebing*, *L. pomona*, *L. canicola*, *L. bratislava*, *L. tarassovi*, *L. bataviae*).

Pre detekciu protilátok proti *Borrelia burgdorferi* bol použitý nepriamy hemaglutinačný test.

Mikrosporídie *Encephalitozoon cuniculi* boli dokazované nepriamou imunofluorescenčnou metódou, ako antigén boli použité purifikované spóry *E. cuniculi*.

Protílátky proti vírusu kliešťovej encefalitídy boli dokazované hemaglutinačno-inhibičným testom.

Žiadne z vyšetrených zvierat nejavilo klinické príznaky ochorenia.

VÝSLEDKY

Súhrnné výsledky vyšetrení sú uvedené v tab. I. V skupine 37 muflónov sme zistili protílátky proti chlamýdiám (43,2 %), *Franciscella tularensis* (18,9 %), leptospírám (10,7 %), *Borrelia burgdorferi* (10,7 %) a proti *Encephalitozoon cuniculi* (13,5 %). Na kliešťovú encefalitídu bolo pre nedostatok krvného séra vyšetrených len 11 vzoriek s pozitivitou 54,4 %. V skupine 24 danielov sme potvrdili protílátky proti chlamýdiám (87,5 %), *Franciscella tularensis* (29,2 %), *Borrelia burgdorferi* (45,8 %), *Encephalitozoon cuniculi* (8,3 %) a kliešťovej encefalitídy (45,8 %). Protílátky proti leptospírám u danielov neboli dokázané.

DISKUSIA

Séropozitivita proti chlamýdiám zistená u muflónov (43,2 %) a najmä danielov (87,5 %) je vysoká a svedčí o latentnej infikovanej vyšetrených zvierat. Klinické prejavy, napríklad aborty neboli pozorované. Pravdepodobnou príčinou séropozitivity môže byť stimulácia makroorganizmu chlamýdiami prežívajúcimi v črevnom trakte a infikovanie mláďat v priebehu tzv. orálno-fekálneho cyklu. Prameňom nákazy môžu byť aj voľne

Zoonóza ¹	Muflón ⁸ (<i>Ovis musimon</i> L.)			Daniel škvrnitý ⁹ (<i>Dama dama</i> L.)		
	Počet vyšetrených vzoriek ¹⁰	Pozitívne ¹¹		Počet vyšetrených vzoriek	Pozitívne	
		n	%		n	%
Chlamydióza ²	37	16	43,2	24	21	87,5
Tularémia ³	37	7	18,9	24	7	29,2
Leptospiroza ⁴	37	4	10,7	24	0	0
Lymfická borelióza ⁵	37	4	10,7	24	11	45,8
Encefalitozoonóza ⁶	37	5	13,5	24	2	8,3
Kliešťová encefalitída ⁷	11	6	54,4	24	11	45,8

¹zoonosis, ²chlamydiosis, ³tularemia, ⁴leptospirosis, ⁵Lyme borreliosis, ⁶encephalitozoonosis, ⁷tick-born encephalitis, ⁸mouflon, ⁹fallow deer, ¹⁰number of examined samples, ¹¹positive

žijúce vtáky a mikromamálie kontaminujúce svojimi exkrementami krmivo a pastviny. Číslková a i. (1993, 1999) potvrdili 18,6% séropozitivitu proti chlamýdiám u drobných cicavcov. Nízku séropozitivitu u danielov (11/1), srncov (368/18) a jeleňov (56/2) popisujú Dedek a i. (1991), Věžník a i. (1996) pri vyšetrení 164 jeleňov zistili pozitivitu u 1,22 % zvierat. Giacometti a i. (1995) vyšetrením 89 ks kozy alpskej (*Capra i. ibex*) zistili séropozitivitu u 31 % vyšetrených zvierat. Na základe zistených titrov (1/128) usudzujú, že sa jedná o aktívnu chlamýdióvu infekciu, ktorá by mala byť následne potvrdená aj izoláciou chlamýdií. Capelli a i. (1996) pri vlastnom vyšetrení 162 jeleňov nezistili žiadnu séropozitivitu voči chlamýdiám, uvádzajú však výsledky iných autorov, ktorí potvrdili séropozitivitu voči chlamýdiám u jeleňov: Lanfranchi a i. (1985) v 56 %, Fico a i. (1996) v 33 %, Gennero a i. (1996) v 30 % a Maglione a i. (1996) v 16 %.

Dedek a i. (1991) vyšetřili v roku 1984 až 1989 v okrese Rostock súbor 524 sér od jeleňov, srncov, danielov a muflónov na protilátky voči *Franciscella tularensis* s negatívnym výsledkom. Naše pozitívne nálezy u muflónov (18,9 %) a danielov (29,2 %) signalizujú rozšírenie tejto nákazy v sledovanej oblasti. Ďalšie vyšetrenia, včítane vyšetrení drobných mikromamálií, budú nevyhnutné na objasnenie ohniska tularémie v danom regióne.

Protilátky voči leptospírám sme zistili u muflónov v 10,7 %, vyšetrenie u danielov bolo negatívne. Vyšetrené séra reagovali len so sérovarom *L. grippothyphosa*. Stanko a i. (1996) publikujú výsledky vyšetrení súboru 2 493 drobných hlodavcov za obdobie rokov 1991 až 1995 v oblasti východného Slovenska, včítane Košickej kotliny, pričom najčastejšie zisťovali protilátky proti leptospírám sérovaru *L. grippothyphosa* (62 % prípadov). V ČR Tremel a Nesňalová (1993) uvádzajú výsledky vyšetrení za obdobie rokov 1987 až 1989, pričom vyšetrením 40 muflónov zistili séropozitivitu u jedného zvierata (2,5 %) voči sérovaru *L. grippothyphosa*, vyšetrenie 10 danielov škvrnitých bolo negatívne. V Panónskej nížine Orlič a i. (1991) publikujú výsledky sérologických vyšetrení 32 jeleňov (*Cervus elaphus*), pričom zistili séropozitivitu u jedného zvierata voči sérovaru

L. grippothyphosa. Z uvedených výsledkov možno usudzovať, že v podmienkach strednej Európy sérovar *L. grippothyphosa* bude najfekventovanejším u vysokej zveri, pričom prameňom a rezervoárom nákazy pre zver sú drobné mikromamálie znečisťujúce vonkajšie prostredie svojimi exkrementami. Capelli a i. (1996) sérologicky vyšetřili 59 jeleňov z celkového stavu 162 jeleňov chovaných na farme v provincii Bologna. U 18 jeleňov zistili séropozitivitu voči sérovaru *L. riccio* dvoch jeleňov voči sérovaru *L. hardjo*. U dvoch zvierat súčasne zistili protilátky voči obidvom vyššie uvedeným sérovarom. Séra boli vyšetřované súborom trinástich sérovarov leptospír, z ktorých len *L. hardjo* sa používa pri diagnostike v našich podmienkach. Prenos, pre našu oblasť zriedkavých sérovarov leptospír importovanými zvieratami, preto vystupuje ako potencionálna možnosť šírenia nákazy. Leptospíry sú primárnymi parazitmi predovšetkým voľne žijúcich hlodavcov, ktoré sa podieľajú na vzniku a pretrvávajú prírodných ohnisk. Tento fakt potvrdzuje dôležitosť a nutnosť pristupovať k štúdiu problematiky epidemiológie a epizootológie leptospír komplexne, t.j. venovať pozornosť súčasne ako mikromamáliam, tak aj viacerým druhom voľne žijúcej zveri.

Naše výsledky vyšetření na protilátky voči *Borrelia burgdorferi* poukazujú na existenciu tejto zoonózy aj u muflónov (10,7% pozitivita) a danielov škvrnitých (45,8% pozitivita) a signalizujú potrebu ďalšieho komplexného štúdia tejto nákazy v danej oblasti. Juřicová a i. (1996) potvrdili séropozitivitu u nasledujúcich voľne žijúcich zvierat: zajaca poľného (19,2 %), diviakov (5,1 %) a bažantov (24,3 %). Capelli a i. (1996) vyšetřením 59 jeleňov nezistili žiadne protilátky voči *B. burgdorferi* rovnako ako Giacometti a i. (1995), ktorí potvrdili negativitu pri vyšetření 89 krvných sér od kozy alpskej (*Capra i. ibex*). Rozdielne výsledky pravdepodobne súvisia s existenciou prírodného ohniska nákazy a prítomnosťou najdôležitejšieho vektora, ktorým je v Európe *Ixodius ricinus*.

Problematike encefalitozoonózy, tak ako to uvádzame v úvode, sa začala na Slovensku venovať pozornosť od roku 1995. Naše vyšetřenia potvrdzujú výskyt *Encephalitozoon cuniculi* aj u muflónov a danielov škvrnitých. Keďže sa jedná o prvé vyšetřenia u lovnej zve-

ri, nebolo možné naše výsledky porovnať s výsledkami iných autorov.

Vzhľadom na skutočnosť, že východné Slovensko je od roku 1953 oblasťou s potvrdeným výskytom kliešťovej encefalitídy považovali sme za vhodné urobiť vyšetrovania aj v tomto smere. Vysoká pozitivita u muflónov (54,4 %) a danielov škvŕnitých (45,8 %) potvrdzuje nutnosť sledovať aj túto zoonózu komplexne a dlhodobo. Kožuch a i. (1976) zistili v oblasti Záhoria v období rokov 1969 až 1972 vírusneutralizačné protilátky proti vírusu kliešťovej encefalitídy u danielov škvŕnitých (9 pozitívnych/24 vyšetrených), muflónov (2/2), jeleňov (37/164) a srncov (21/65) ako aj u ďalších druhov lovných zvier. Gerth a i. (1995) potvrdili vírusneutralizačným testom pozitívny výsledok u 26,0 % z 235 krvných sér od srncov v oblasti južného Nemecka.

ZÁVER

Výsledky potvrdili prítomnosť všetkých testovaných zoonóz v danej lokalite u muflónov a s výnimkou leptospirózy aj u danielov škvŕnitých. Táto sérologická sonda v populácii dvoch lovných druhov zvier potvrdzuje potrebu rozšírenia a prehľadnia štúdia nami zisťovaných, ale tiež ďalších, zoonóz na rezervoárové zvieratá, voľne žijúcu zver a krv cicajúce artropódy ako rezervoár a súčasne vektor nákazy.

Podakovanie

Autori ďakujú Doc. MVDr. Lýdii Čisláčkovej a Doc. RNDr. H. Prokopčákovej za spoluprácu pri vyšetrovaniach na chlamydiózy a leptospirózy.

LITERATÚRA

Báľent P., Kolodziejski L., Hipíková V. (1995): Encefalitozoonóza – aktuálne ochorenie kráľíkov aj na Slovensku. *Slov. Vet. Čas.*, XX, 81–83.

Capelli G., Poglajen G., Casati D., Coan B. (1996): Indagini sierologiche in cervi allevati in provincia di Bologna. *Suppl. Ric. Biol. Selvaggina*, XXIV, 341–345.

Čisláková L., Pospíšil R., Peterková J., Prokopčáková H. (1993): Sérologický prieskum drobných cicavcov chlamydiovým antigénom a jeho epizootologický význam. *Veterinářství*, 43, 300–301.

Čisláková L., Prokopčáková H., Štefkovič M., Halanová M. (1997a): *Encephalitozoon cuniculi* – klinický a epidemiologický význam. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.*, 46, 30–33.

Čisláková L., Prokopčáková H., Halanová M., Štefkovič M. (1997b): Ochorenia ľudí vyvolané mikrosporídiami. *Slov. Lekár*, 7 (21), 20–21.

Čisláková L., Schréter I., Jarčuška P. (1998a): Mikrosporídiová infekcia u pacienta s AIDS. *Klin. Mikrobiol. Infek. Lék.*, 4, 84–85.

Čisláková L., Stanko M., Peterková J., Prokopčáková H., Petko B. (1999): Výskyt protilátok proti chlamýdiám u drobných cicavcov na východnom Slovensku. *Slov. Vet. Čas.*, XXIV, 20–22.

Dedek J., Witt W., Loepelmann H., Nattermann H., Knopke C. (1991): Ergebnisse serologischer Untersuchungen beim Rot-, Reh-, Dam- und Maffelwild auf ausgewählte Infektionen. *Mh. Vet.-Med.*, 46, 101–104.

Fico R., Capua L., Weiss G., Barberio A., Tittarelli M. (1996): Accertamenti sierologici su cervi destinati a operazioni di reintroduzione. *Atti. S.I.S. Vet.*, L, 511–516.

Gennero M. S., Meneguz P. G., Mandola L., Masoero L., De Meneghi D., Rossi L. (1996): Indagini sierologiche su ruminanti selvatici in Piemonte. *Atti. S.I.S. Vet.*, L, 709–712.

Gerth H.J., Grimshandl D., Stage B., Doller G., Kunz C. (1995): Roe deer as sentinels for endemicity of tichborne encephalitis virus. *Epidemiol. Infect.*, 115, 355–365.

Giacometti M., Tolari F., Manelli A., Lafranchi P. (1995): Indagini sieroepidemiologiche su stambecchi (*Capra ibex*) del Piz Albris nel Cantone dei Grigioni (Svizzera). *Schweiz. Arch. Tierheill.*, 137, 537–542.

Halanová M., Báľent P., Macák V., Levkutová M., Štefkovič M., Jurčina A. (1998): Sérologický dôkaz prítomnosti protilátok proti *Encephalitozoon cuniculi* u hovädzieho dobytku na Slovensku. In: Zbor. Ref. Slovenské a české parazitologické dni. 9.–11. júna, Tále, 11.

Hipíková V., Báľent P., Levkut M. (1995): Evaluation of an indirect immunofluorescent test for detection of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* rabbits. In: Abstr. 7th Int. Helminth. Symp., Helminths – Helminthoses – Environment. September, Košice. 19–22.

Juríková Z., Halouzka J., Forejtek P., Hubálek Z. (1996): Detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in hares, wild boars and pheasants in the Czech Republic. *Biológia (Bratislava)*, 51, 331–333.

Kožuch O., Nosek J., Grešíková M., Erner E. (1976): Surveillance on mosquito-borne natural focus in Záhorská Lowland. In: 2. Internationales Arbeitskolloquium über Naturherde von Infektionskrankheiten in Zentral-Europa. 25.–28. 2. 1976, Graz. 115–118.

Lanfranchi P., Tolari R., Forletta R., Meneguz P. G., Rossi L. (1985): The red deer as a reservoir of parasitic and infectious pathogens for cattle. *Ann. Fac. Med. Vet. Torino*, 30, 3–17.

Levkut M., Hipíková V., Levkutová M., Kolodziejski L., Báľent P., Bajová V. (1996): Demonstration of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* of rabbits in some Slovak farms. *Helmintológia*, 33, 25–26.

Magliane P., Nebbia P., Robino P. (1996): Diffusione di infezioni batteriche nel parco „La Mandria“. Raporti epidemiologici fra ruminanti domestici e selvatici che condidono lo stesso habitat. *Atti S.I.S. Vet.*, L, 687–691.

Mittermayer T., Rojkovič D., Kmety E. (1961): Leptospirózy na východnom Slovensku. Sbor. krajovej patológie východného Slovenska, Košice, 131–163.

Orlič D., Vidič B., Jovanovič V., Lazič S., Manojlovič L. (1991): Rasprostranjenost virusnih i bakterijskih infekcija u populaciji jelena (*Cervus elaphus*) Panonske nižije. *Vet. Glasnik*, 45, 141–143.

Stanko M., Prokopčáková H., Fričová J., Petko B. (1996): Výskyt protilátok proti leptospíram u drobných cicavcov na východnom Slovensku. *Vet. Med. – Czech.*, 41, 373–377.

- Štefkovič M., Bálent P., Horváth M., Halanová M. (1998): Imunohistochemická vizualizácia antigénov mikrosporídií *Encephalitozoon cuniculi*. In: Zbor. Ref. Slovenské a české parazitologické dni. 9.–11. júna, Tále. 34.
- Tremel F., Nesňalová E. (1993): Výskyt protilátok proti leptospírám v krevných sérech lovné zvěře. Vet. Med. – Czech, 38, 123–127.
- Věžník Z., Pospíšil L., Diblíková I., Švecová D., Pejčoch M. (1996): Frekvence protilátok proti chlamýdiám v sérech nahodilých souborů zvířat v ČR. Veterinářství, 8, 335–338.

Received: 99–03–01

Accepted: 99–03–23

Kontaktná adresa:

Doc. MVDr. Milan Trávníček, CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

Tel. +421 95 633 21 11–15, fax +421 95 632 36 66, e-mail: travnicek@uvm.sk

**Nejčerstvější informace o časopiseckých článcích
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 žádank 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 – 1,50 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).

OCCURRENCE OF INTESTINAL PARASITES IN A BREEDING OF OSTRICH (*STRUTIO CAMELUS*)

VÝSKYT STŘEVNÍCH PARAZITŮ V CHOVU PŠTROSA DVOUPRSTÉHO (*STRUTIO CAMELUS*)

M. Pakandl¹, G. Kořenková²

¹Institute of Parasitology, Czech Academy of Sciences, České Budějovice, Czech Republic

²University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

ABSTRACT: A total of 359 faecal samples were collected from ostriches of various age groups (2 weeks, less than 1 month, 2–3 months, 3–7 months, 7–12 months, adult individuals) in a farm breeding in Multip Moravia, Studénka. The samples were examined by four different methods: flotation using Sheather's sugar solution, staining with Heidenhain's iron haematoxylin using the method of Noller-Westphal-Gönnert, cultivation in egg-slant medium (LES) and Diamond's TYM medium. High prevalence of *Blastocystis* sp. was observed in all the age groups (Tab. I), but the intensity of infection was mostly inappreciable. A very small number of oocysts of a coccidium of the genus *Isoospora* was found in two birds younger than one month. No other parasites were found and therefore we believe that the intestinal parasites do not represent any important obstacle to a farm breeding of African ostrich.

ostrich; farm breeding; intestinal parasites; *Blastocystis* sp., *Isoospora* sp.

ABSTRAKT: Celkem 359 vzorků trusu pštrosů různého věku na farmě Multip Moravia Studénka bylo vyšetřeno čtyřmi různými metodami: flotací s použitím cukerného roztoku, barvením vlhkých rozěrů metodou Nollera-Westphala-Gönnerta, kultivací v pūdách LES a TYM. U všech věkových kategorií byla zjištěna vysoká prevalence *Blastocystis* sp., počet buněk parazita v jednotlivých vzorcích byl však zpravidla nepatrný. U dvou mláďat ve věku do jednoho měsíce byl nalezen nepatrný počet oocyst kokcidie rodu *Isoospora*. Jiní paraziti nebyli zjištěni, a proto se domníváme, že střevní paraziti nepředstavují překážku pro komerční využití pštrosa dvoupřstého.

pštros dvoupřstý; faremní chov; střevní paraziti; *Blastocystis* sp., *Isoospora* sp.

ÚVOD

V České republice byl komerční chov pštrosa zaveden teprve v posledních letech. Dnes se nachází na území naší republiky několik malých pštrosích farem. Pštros dvoupřstý může být v našich podmínkách perspektivním hospodářským zvířetem. Tento pták však dosud není dokonale domestikován a ve středoevropských podmínkách se mohou v jeho chovu objevit četné problémy. Poznatky o parazitózách pštrosů ve faremních chovech jsou zatím značně neúplné. Během naší práce jsme zjišťovali prevalenci střevních parazitů u pštrosů a posuzovali jsme i jejich množství v jednotlivých vzorcích na farmě Multip Moravia Studénka.

Mláďata se líhnou v umělých líhních téměř po celý rok. V době sledování bylo na farmě 25 jedinců ve věku jednoho roku a pohyblivé množství mláďat ve věku tři až sedm měsíců. Chovných jedinců bylo okolo 30.

Zvířata jsou chována v hejnech rozdílného věku: do dvou týdnů, dva týdny až jeden měsíc, jeden až tři měsíce, tři až sedm měsíců, sedm měsíců až asi jeden rok, pohlavně dospělí jedinci.

Po celou dobu chovu jsou pštrosi pravidelně veterinárně vyšetřováni. Zvířata jsou krmena krmnou směsí a zeleným krmem, které je v zimních měsících nahrazeno kvalitním senem. V době našeho výzkumu zvířatům nebyla podávána žádná antiparazitární léčiva.

Sběr materiálů

Byly vyšetřovány pštrosí exkrementy v týdenních až dvoutýdenních intervalech v době od ledna do listopadu 1997, s výjimkou července, kdy pro nepřízeň počasí nemohly být vzorky získány. Šlo o náhodný sběr v prostorách chovu. Vzorky byly čerstvé nebo maxi-

MATERIÁL A METODY

Podmínky chovu

Farma, na které byl získáván materiál, patří k největším v České republice. Byla založena v roce 1991.

málně jeden den staré. U jednotlivých věkových kategorií byly vzorky odebrány tak, aby byla vyšetřena alespoň jedna třetina jedinců v daných věkových kategoriích. Z důvodu přísných zoohygienických opatření ze strany chovatelů nebylo možné odebírat vzorky u ptáků mladších 14 dnů.

Metody vyšetřování

Flotační metoda

Vzorky trusu byly vyšetřovány běžnou koprologickou technikou s použitím Sheatherova cukerného roztoku. Metoda slouží především pro zjišťování přítomnosti oocyst kokciidií a vajíček parazitických červů.

Metoda dle Nollera-Westphala-Gönnerta (Jírovec, 1977)

Při této metodě byly vlhké nátěry fixovány dle Bouina-Hollanda a barveny Heidenhenovým železitým hematoxylinem. V tomto případě nedochází ke koncentraci parazitů, lze tedy posuzovat množství jejich stadií ve vzorku a také studovat morfologii parazitických prvoků obarvených tímto klasickým cytologickým barvivem.

Kultivace na vaječné půdě LES (Boeck a Drbohlav, 1925)

Byla použita modifikace podle Zierdta (1988). Kultivace probíhala při teplotě 40 °C a sloužila jako diagnostická metoda (u prvoků schopných v těchto podmínkách růst) citlivější než přímé mikroskopické pozorování.

Kultivace na půdě TYM (Diamond, 1957)

Jde o půdu nejčastěji používanou pro kultivaci trichomonád, zejména pro axenizaci a axenickou kultivaci.

VÝSLEDKY

Celkem bylo paralelně čtyřmi různými metodami, koprologicky i kultivačně, vyšetřeno 359 vzorků.

Výsledky vyšetřování flotační metodou

Z 359 vyšetřených vzorků byly pouze u dvou mláďat ve věku do jednoho měsíce zjištěny oocysty kokciodie rodu *Isoospora*. Jejich množství bylo však velmi malé (dvě, resp. čtyři oocysty v celém vzorku) i přesto, že se jedná o koncentrační metodu. Není proto možné přesněji popsat jejich morfologii, zejména pak uvést jejich rozměry. Není zcela jisté, zda se jedná o druh *I. struthionis* (viz diskuse). Touto technikou nebyly v koprologických vzorcích zjištěny žádné další střevní paraziti.

Výsledky vyšetřování vlhkých roztěrů (metoda dle Nollera-Westphala-Gönnerta)

Pouze u malé části vzorků jsme zjistili *Blastocystis* sp. Počet nalazených parazitů se prakticky ve všech případech jevil jako velmi nízký (na roztěrech byly nalazeny jen ojedinělé buňky), přestože prevalence *Blastocystis*

sp. zjištěná na základě kultivace byla poměrně vysoká. Jiní střevní prvoci nebyli nalezeni.

Výsledky kultivace na půdě LES

Na této půdě se jsme zjistili pouze růst *Blastocystis* sp.; prevalence *Blastocystis* sp. zjištěnou na základě kultivace v půdě LES v jednotlivých kategoriích zvířat ukazuje tab. I. Intenzita nárůstu v kulturách byla proměnlivá. Jak vyplývá z tab. I, je prevalence vysoká u všech skupin, s výjimkou 14denních zvířat. Mladší jedinci nebyli z výše uvedených důvodů vyšetřováni. Přibližně od věku jednoho měsíce je u všech kategorií prevalence vysoká a téměř shodná; rozdíly mohou být způsobeny nahodilou odchylkou. Kromě *Blastocystis* sp. nebyl zaznamenán růst jiných prvoků.

I. Prevalence *Blastocystis* sp. zjištěná kultivací na půdě LES – Prevalence of *Blastocystis* sp. determined by cultivation in LES medium

Věk ¹	Počet vyšetřených vzorků ²	Počet pozitivních vzorků ³	Procento ⁴
2 týdny ⁵	42	9	21
do 1 měsíce ⁶	60	34	57
1 až 3 měsíce ⁷	85	51	60
3 až 7 měsíců ⁸	30	24	80
7 až 12 měsíců ⁹	71	54	76
Dospělí jedinci ¹⁰	71	57	80

¹age, ²number of examined samples, ³number of positive samples, ⁴per cent, ⁵2 weeks, ⁶below 1 month, ⁷1–3 months, ⁸3–7 months, ⁹7–12 months, ¹⁰adult individuals

Kultivace na půdě TYM

Nebyl pozorován růst trichomonád ani jiných prvoků v této půdě.

DISKUSE

Je obtížné srovnat výsledky vyšetřování s literárními údaji, protože podrobnější parazitologická studie v chovech pštrosů zřejmě nebyla dosud publikována.

První nalezli *Blastocystis* sp. u pštrosů Yamada aj. (1987). Popsali jeho morfologii na úrovni optické mikroskopie, přičemž zdůraznili podobnost s kmeny z lidí, opic a kuřat. Ještě před 10 lety byly téměř výhradně známy nálezy *B. hominis* z lidí; teprve později se velmi rozšířilo spektrum známých hostitelů (Boreham a Stenzel, 1993). Stenzel aj. (1994) popsali *Blastocystis* sp. z několika druhů domestikovaných ptáků, včetně pštrosa dvouprstého.

Protože otázka druhového spektra a hostitelské specifčnosti není u rodu *Blastocystis* dosud vyřešena, nelze vyloučit infekci pštrosů na farmě *Blastocystis* sp. z ji-

ných hostitelů. V laboratorních podmínkách byla prokázána možnost přenosu různých kmenů rodu *Blastocystis* na nespecifické hostitele (Phillips a Zierdt, 1976; Pakandl, 1992; Pakandl aj., 1993; Suresh aj., 1993).

Jelikož růst kultur závisí na podmínkách kultivace, především složení doprovodné bakteriální flóry, a mohou existovat i rozdíly mezi různými kmeny ve schopnosti růst v umělých médiích, byla vyhodnocována pouze úspěšnost či neúspěšnost kultivace na půdě LES. Počet buněk vztažený na objem média není uváděn, protože zjevně nemá vztah k množství buněk *Blastocystis* sp. v odebraných vzorcích.

U žádného z celkové počtu 359 vyšetřených vzorků nebylo zjištěno takové množství střevních parazitů, které by mohlo ovlivnit jejich zdravotní stav. Vysoká prevalence byla zjištěna pouze u *Blastocystis* sp., a to vždy při nízké intenzitě parazitace. Kromě toho byly zcela ojediněle (dvě zvířata) a v nepatrném množství zjištěny kokcidie rodu *Isoospora*. U pštrosa dvouprstého byl popsán druh *Isoospora struthionis* Yakimoff, 1940. V našem případě však vzhledem k nepatrné prevalenci i počtu oocyst v pozitivních vzorcích, dokonce nemožujícímu přesnější morfologické charakterizaci, nelze vyloučit ani pouhou pasáž oocyst jiných druhů tohoto rodu, pocházejících například z pěvců, střevním traktem hostitele.

Vzhledem k určité neobvyklosti hostitele a vysoké koncentraci zvířat ve faremním chovu jsme na počátku práce počítali i s možností vysoké parazitace a výskytem různých specifických parazitů. Skutečně nálezy však byly opačné. Zjištěná situace u pštrosů chovaných na farmě kontrastuje se skutečností známou u jiných hospodářských zvířat. Například Pakandl (1994) při vyšetřování domácích prasat stejnými metodami zjistil vysokou prevalenci i intenzitu parazitace několika druhů střevních prvoků. Vysvětlení lze hledat ve dvou skutečnostech:

1. Pštrosi jsou u nás chováni v pro ně extrémních klimatických podmínkách, což nepříznivě ovlivňuje vývoj parazitů ve vnějším prostředí. Pokud je u některých parazitů nutný další hostitel, tento v našich podmínkách pravděpodobně chybí.
2. Pokud jsou zvířata chována v dobrých zoohygienických podmínkách a prakticky prostá parazitů, což je i případ sledované farmy, chybí zde volně žijící zvířata sloužící jako rezervoár pro případnou infekci chovaných zvířat.

Výsledky byly dosaženy systematickým sledováním zvířat na jedné farmě. Při určitém zobecnění lze konstatovat, že parazitózy v našich podmínkách zřejmě nepředstavují překážku pro komerční využití pštrosa dvouprstého.

LITERATURA

- Boeck W. C., Drbohlav J. (1925): The cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Hyg.*, 5, 371–407.
- Boreham P. F. L., Stenzel D. J. (1993): *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. *Adv. Parasitol.*, 32, 1–70.
- Diamond L. S. (1957): The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.*, 43, 488–490.
- Jírovec O. (1977): *Parasitologie pro lékaře*. Praha, Avicenum.
- Pakandl M. (1992): An experimental transmission of porcine strains of *Blastocystis* sp. in mice and gerbils. *Folia Parasitol.*, 39, 383–386.
- Pakandl M. (1994): The prevalence of intestinal protozoa in wild and domestic pigs. *Vet. Med. – Czech*, 39, 377–380.
- Pakandl M., Koudela B., Vítovec J. (1993): An experimental infection of conventional and gnotobiotic piglets with human and porcine strains of *Blastocystis*. *Folia Parasitol.*, 40, 319–320.
- Philips B. P., Zierdt C. H. (1976): *Blastocystis hominis*: Pathogenic potential in human patients and in gnotobiotics. *Exp. Parasitol.*, 39, 358–364.
- Stenzel D. J., Cassidy M. F., Boreham P. F. L. (1994): Morphology of *Blastocystis* sp. from domestic birds. *Parasitol. Res.*, 80, 131–137.
- Suresh K., Ramachandran N. P., Ho L. C., Yap E. H., Singh M. (1993): *In vitro* encystment and experimental infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitol. Res.*, 79, 456–460.
- Yamada M., Yoshikawa H., Tegoshi T., Matsumoto Y., Yoshikawa T., Shiota T., Yoshida Y. (1987): Light microscopical study of *Blastocystis* spp. in monkeys and fowls. *Parasitol. Res.*, 73, 527–531.

Received: 99–01–22

Accepted after corrections: 99–03–09

Kontaktní adresa:

RNDr. Michal Pakandl, CSc., Parazitologický ústav AV ČR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Česká republika
Tel. +420 38 777 54 26, fax +420 38 477 43, e-mail: pakandl@paru.cas.cz

INSTITUTE OF AGRICULTURAL AND FOOD INFORMATION

Slezská 7, 120 56 Praha 2, Czech Republic

Fax: (00422) 24 25 39 38

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

Subscription to these journals should be sent to the above-mentioned address.

Periodical	Number of issues per year
Rostlinná výroba (Plant Production)	12
Czech Journal of Animal Science (Živočišná výroba)	12
Veterinární medicína (Veterinary Medicine – Czech)	12
Zemědělská ekonomika (Agricultural Economics)	12
Journal of Forest Science	12
Zemědělská technika (Agricultural Engineering)	4
Plant Protection Science (Ochrana rostlin)	4
Czech Journal of Genetics and Plant Breeding (Genetika a šlechtění)	4
Zahradnictví (Horticultural Science)	4
Czech Journal of Food Sciences (Potravinářské vědy)	6

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 kurzivy, 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 zřetel k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu a kvalitě práce. Redakce přijímá práci imprimaturou 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 informace, proč byla práce provedena.

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

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

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

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

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

Na zvláštním listě uvádí autor plné jméno (i spoluautorů), akademické, vědecké a pedagogické tituly a podrobnou adresu pracoviště s PŠC, 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. 7, July 1999

CONTENTS

Kóňová M., Békeová E., Levkut M.: The effect of chlortetracycline hydrochloride on some morphometric parameters of the thyroid gland in lambs	193
Ryšánek D., Šedivá I., Sládek Z., Babák V.: Intramammary infections of mammary glands in unbred heifers: absolute and differential somatic cell counts (in English).....	199
Sládek Z., Ryšánek D.: Morphological characteristics of somatic cells from mammary glands of unbred heifers (in English).....	205
Trávniček M., Guryčová D., Halanová M., Kožuch O., Nadzamová D., Miško J.: Presence of antibodies to some zoonoses in mouflons (<i>Ovis Musimon</i> Pall.) and fallow deer (<i>Dama dama</i> L.) in Eastern Slovakia.....	215
Pakandl M., Kořenková G.: Occurrence of intestinal parasites in a breeding of ostrich (<i>Strutio camelus</i>)	221

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 44, č. 7, Červenec 1999

OBSAH

Kóňová M., Békeová E., Levkut M.: Vplyv podávania chlortetracyklín hydrochloridu na niektoré morfológické parametre štítnej žľazy u jahniat	193
Ryšánek D., Šedivá I., Sládek Z., Babák V.: Intramamárny infekce mléčných žláz nepřipuštěných jalovic: absolutní a diferenciální počet somatických buněk.....	199
Sládek Z., Ryšánek D.: Morfológické charakteristiky somatických buněk mléčné žlázy nepřipuštěných jalovic	205
Trávniček M., Guryčová D., Halanová M., Kožuch O., Nadzamová D., Miško J.: Výskyt protilátok proti vybraným zoonózám u muflónov (<i>Ovis musimon</i> Pall.) a danielov škvŕnitých (<i>Dama dama</i> L.) na Východnom Slovensku	215
Pakandl M., Kořenková G.: Výskyt střevních parazitů v chovu pštrosa dvoupřstého (<i>Strutio camelus</i>)	221

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, e-mail: edit@uzpi.cz ● Sazba: Studio DOMINO – ing. Jakub Černý, Bfí. 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