



# **VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2010**

**Zborník zo seminára doktorandov venovaného  
pamiatke akademika Bod'u**

**V. ročník**

**Košice, 6-7. september 2010**



Zborník príspevkov prezentovaných na  
Seminári doktorandov venovanom pamiatke akademika Boďu  
6-7. september 2010  
v Košiciach

*Usporiadali:*  
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie  
Ústav fyziológie hospodárskych zvierat Slovenskej akadémie vied  
Slovenská spoločnosť pre biochémiu a molekulárnu biológiu, Východoslovenská pobočka

**SIGMA-ALDRICH®**

Zostavil: MVDr. Dušan Fabian, PhD.  
Recenzoval: MVDr. Imrich Zeleňák, DrSc.  
Neprešlo jazykovou úpravou.

**ISBN 978-80-968618-5-9**

## OBSAH

1, IZOFORMY ADIPONEKTÍNU A ICH ÚLOHA V ORGANIZME Burkuš J. <i>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice</i>	8
2, DETEKCIA REZISTENCIE PARAZITOV OVIEC REZISTENTNÝCH NA IVERMEKTÍNY Dolinská M. <i>Parazitologický ústav, SAV, Košice</i>	12
3, VÝSKYT VIRULENTNÝCH FAKTOROV U RÔZNYCH FYLOGENETICKÝCH SKUPÍN HYDINOVÝCH <i>ESCHERICHIA COLI</i> Drugdová Z. <i>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice</i>	16
4, COLV PLAZMIDOM KÓDOVANÁ REZISTENCIA NA ORTUŤ V <i>ESCHERICHIA COLI</i> POPULÁCI POCHÁDZAJÚCEJ Z FAECES PRASIAŤ Fecskeová L. <i>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice</i>	20
5, ÚLOHA ESTROGÉNOVÝCH RECEPTOROV V HOJENÍ RÁN Gál P. <sup>1,2,5</sup> , Vasilenko T. <sup>2,3</sup> , Novotný M. <sup>4</sup> , Szabo P. <sup>5,7</sup> , Lenhardt L. <sup>2</sup> , Sabol F. <sup>6</sup> , Smetana K Jr. <sup>6,7</sup> <sup>1</sup> Úsek pre biomedicínsky výskum VÚSCH, a.s., Košice, SR, <sup>2</sup> Ústav patologickej anatómie, UVLF, Košice, SR, <sup>3</sup> III. chirurgická klinika, SZU, Nemocnica Košice-Šaca, SR, <sup>4</sup> Ústav patologickej fyziológie, UPJŠ – LF, <sup>5</sup> Anatomický ústav, UK – 1.LF, Praha, ČR, <sup>6</sup> Klinika srdcovej chirurgie, VÚSCH, a.s., Košice, SR, <sup>7</sup> Centrum buněčné terapie a tkáňových náhrad, UK – 2.LF, Praha, ČR	24
6, SEZÓNNE ROZDIELY V KONCENTRÁCI VZDUŠNÝCH MIKROORGANIZMOV A VÝSKYT ANTIBIOTIKO - REZISTENTNÝCH BAKTÉRIÍ V PROSTREDÍ ČISTIARNE ODPADOVÝCH VÔD Gregová G. <sup>1</sup> , Venglovský J. <sup>1</sup> , Kmet' V. <sup>2</sup> , Sasáková N. <sup>1</sup> , Laktičová K. <sup>1</sup> <sup>1</sup> Katedra životného prostredia, veterinárnej legislatívy a ekonomiky UVLF, Košice, <sup>2</sup> Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice	28
7, RÁDIOGRAFICKÉ URČENIE VEĽKOSTI SRDCA PLANIMETRICKOU METÓDOU VYUŽÍVAJÚCOU VNÚTORNÉ POMERY HRUDNÍKA Grünermelová E., Ševčík A. <i>Klinika malých zvierat, UVLF, Košice</i>	32
8, NIČENIE HRABOŠA POĽNÉHO A JEHO DOPAD NA VEREJNÉ ZDRAVIE Harkabus J., Hromada R., Ondrášovič M., Ondrášovičová O., Sasáková N. <i>Katedra životného prostredia, veterinárskej legislatívy a ekonomiky, UVLF, Košice</i>	37
9, TESTOVANIE FUNGICÍDNEJ ÚČINNOSTI VYBRANÝCH CHEMICKÝCH AGENSOV Kaduková J., Laciaková A., Máté D. <i>Katedra hygieny a technológie potravín, UVLF, Košice</i>	40
10, SURVEILLANCE LYSSAVÍRUSOVEJ INFEKČIE V SYNANTROPNEJ POPULÁCI VYBRANÝCH DRUHOV NETOPIEROV V SLOVENSKEJ REPUBLIKE Korytár E. <sup>1</sup> , Ondrejka R. <sup>1</sup> , Ondřejková A. <sup>1</sup> , Pokeš M. <sup>1</sup> , Slepcká E. <sup>1</sup> , Beníšek Z. <sup>1</sup> , Ceľuch M. <sup>2</sup> , Fulín M. <sup>3</sup> <sup>1</sup> Ústav epizootológie a preventívnej veterinárskej medicíny, UVLF, Košice, <sup>2</sup> Spoločnosť pre ochranu netopierov na Slovensku, Bardejov, <sup>3</sup> Východoslovenské múzeum v Košiciach, Košice	43
11, KERATITIS SUPERFICIALIS PIGMENTOSA CHRONICA U PLEMENA NEMECKÝ OVČIAK, POROVNANIE TERAPIE. Kováčová Z., Trbolová A. <i>Klinika malých zvierat, UVLF, Košice</i>	47

- 12, KOŽNÝ FLAP AKO MOŽNOSŤ TERAPIE PRI POŠKODENÍ KOŽE U VOĽNE ŽIJÚCICH ZVIERAT  
 Kožár M.<sup>1</sup>, Molnár L.<sup>2</sup>, Trbolová A.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Klinika malých zvierat, <sup>2</sup>Klinika exotických a voľne žijúcich zvierat, UVLF, Košice 50
- 13, VÝSLEDKY DVOJROČNÉHO SURVEILLANCE BLUE TONGUE NA FARMĚ DOJNÍC  
 Lacková Z.<sup>1</sup>, Bireš J.<sup>1</sup>, Kočišová A.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Klinika prežúvavcov, UVLF Košice, <sup>2</sup>Ústav parazitológie, UVLF, Košice 54
- 14, VPLYV JAČMEŇA A RAŽNÝCH OTRÚB OBOHATENÝCH  $\gamma$ -LINOLÉNOVOU KYSELINOU NA LIPIDOVÝ METABOLIZMUS V UMELOM BACHORE (RUSITEC)  
 Laho T.  
 Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice 59
- 15, POLYMORFIZMUS DGAT-1 V CHOVE DOJNÍC SLOVENSKEHO STRAKATÉHO DOBYTKA  
 Lešková L.<sup>1</sup>, Bauer M.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Klinika prežúvavcov, UVLF, Košice, <sup>2</sup>Ústav genetiky a reprodukcie HZ, Centrum výskumu živočíšnej výroby, Nitra 62
- 16, IDENTIFIKÁCIA A GENETICKÁ CHARAKTERIZÁCIA PRVÉHO PESTIVÍRUSU Z OVIEC NA SLOVENSKU  
 Lešková V., Vlasáková M., Jacková A., Vilček Š.  
 Ústav epizootológie a preventívnej veterinárskej medicíny, UVLF, Košice 65
- 17, VPLYV TRANSPORTNÉHO STRESU NA PRIEBEH ZRENIA SVALOVINY KRÁLIKOV DIVÝCH (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*)  
 Mačanga J., Koréneková B.  
 Katedra hygieny a technológie potravín, Ústav hygieny a technológie mäsa, UVLF, Košice 69
- 18, INVERZNÁ PCR VS. VECTORETTE PCR V „GENOME WALKING“ EXPERIMENTE ŠTUDUJÚCOM ENTEROLYZÍNOVÝ OPERÓN U *E. FAECALIS*.  
 Maliničová L., Nigutová K.  
 Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice 73
- 19, ANTIFUNGÁLNA ÚČINNOSŤ VYBRANÝCH ESENCIÁLNYCH OLEJOV NA KVASINKY RODU CANDIDA  
 Marciová A., Čonková E., Vantrubová J.  
 Ústav farmácie a farmakológie, UVLF, Košice 77
- 20, ENDOHELMINTY HRÚZOVCA SIEŤOVANÉHO (*PSEUDORASBORA PARVA*)  
 Mihok T.<sup>1</sup>, Košuth P.<sup>1</sup>, Kočišová A.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Katedra výživy, dietiky a chovu zvierat, Ústav pre chov a choroby zveri a rýb, UVLF, Košice, <sup>2</sup>Katedra epizootológie a parazitológie, Ústav parazitológie, UVLF, Košice 80
- 21, KONFORMAČNÉ PRECHODY CYTOCHRÓMU C V IÓNOVÝCH KVAPALINÁCH  
 Parnica J.<sup>1</sup>, Kandráč L.<sup>1</sup>, Antalík M.<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Ústav chemických vied, Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Košice, <sup>2</sup>Ústav experimentálnej fyziky, SAV, Košice 83
- 22, ŠTÚDIUM NOVÝCH DIGUANIDÍNOVÝCH DERIVÁTOV AKRIDÍNU: DNA VÄZBOVÉ VLASTNOSTI A BIOLOGICKÁ AKTIVITA  
 Plšíková J.<sup>1</sup>, Koval' J.<sup>2</sup>, Mikeš J.<sup>2</sup>, Janovec L.<sup>3</sup>, Ungvarský J.<sup>3</sup>, Fedoročko P.<sup>2</sup>, Kožurková M.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Katedra biochémie, ÚCHV, PF UPJŠ, Košice, <sup>2</sup>Katedra bunkovej biológie, ÚBEV, PF UPJŠ, Košice, <sup>3</sup>Katedra organickej chémie, ÚCHV, PF UPJŠ, Košice 87
- 23, DRUHOVÁ IDENTIFIKÁCIA STAFYLOKOKOVÝCH IZOLÁTOV IZOLOVANÝCH Z MÄSA ATLANTICKEJ MAKRELY (*SCOMBER SCOMBRUS*) A STANOVENIE ICH REZISTENCIE VOČI VYBRANÝM ANTIBIOTIKÁM.  
 Regecová I., Jevinová P., Pipová M., Marušková K., Popelka P.  
 Katedra hygieny potravín, Ústav hygieny a technológie mäsa, UVLF, Košice 91

- 24, VPLYV ŠALVIOVEJ SILICE A SELENIČITANU SODNÉHO PRIJATÉHO KRMIVOM NA ANTIOXIDAČNÝ STATUS KURČIAT  
Ryzner M.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* 95
- 25, VPLYV APLIKÁCIE MYKOTOXÍNOV A ADSORBENTU NA IMUNOKOMPETENTNÉ BUNKY U KURČIAT  
Slaminková Z.<sup>1</sup>, Grešáková E.<sup>2</sup>.  
<sup>1</sup>*Katedra patologickej anatómie a patologickej fyziológie, UVLF, Košice,* <sup>2</sup>*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* 99
- 26, DÔKAZ AMINOGLYKOZIDOVÝCH ANTIBIOTÍK V KRAVSKOM, OVČOM A KOZOM MLIEKU  
Sýkorová Goffová Z., Kožárová I., Máté D.  
*Katedra hygieny a technológie potravín, UVLF, Košice* 103
- 27, POROVNANIE ÚČINKU BAKTERIOCÍN PRODUKUJÚCEHO KMEŇA ENTEROCOCCUS FAECIUM CCM4231 A JEHO ENTEROCÍNU V EKOSYSTÉME KRÁLIKA.  
Szabóová R.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* 107
- 28, MODIFIKÁCIE OPTICKÝCH VLASTNOSTÍ NANOČASTÍC OXIDU ZINOČNATÉHO  
Šimšíková M.<sup>1</sup>, Antalík M.<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>*Katedra Biochémie, UPJŠ, Košice,* <sup>2</sup>*Ústav experimentálnej fyziky, SAV, Košice* 111
- 29, REDUKOVANIE AMYLOIDNEJ AGREGÁCIE INZULÍNU ÚČINKOM FYTOALEXÍNOV  
Šipošová K.<sup>1,2</sup>, Antošová, A.<sup>2</sup>, Kutschy P.<sup>3</sup>, Daxnerová Z.<sup>4</sup>, Gažová Z.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>*Katedra biochémie, UPJŠ, Košice,* <sup>2</sup>*Ústav experimentálnej fyziky, SAV, Košice,* <sup>3</sup>*Katedra organickej chémie, UPJŠ, Košice,* <sup>4</sup>*Katedra bunkovej biológie, UPJŠ, Košice* 115
- 30, VPLYV ZINKU NA ZDRAVIE A PRODUKCIU BROJLEROVÝCH KURČIAT  
Štofániková J., Šály J., Sesztáková E.  
*Klinika vtákov a exotických zvierat, UVLF, Košice* 119
- 31, ANALÝZA A POROVNANIE GENÓMOV BAKTERIOFÁGA MSF1 A VYBRANÝCH ENTEROKOKOVÝCH PROFÁGOV  
Šul'ák M.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* 123
- 32, RESTRIKČNO-MODIFIKAČNÉ SYSTÉMY U BAKTÉRIÍ RODU *ENTEROCOCCUS*  
Vandžurová A.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* 127
- 33, VÝSKYT MASTITÍD STAFYLOKOKOVEJ ETIOLÓGIE V CHOVE DOJNÍC A MOŽNOSTI ICH REDUKCIE  
Žigo F., Vasil' M., Elečko J.  
*Ústav chovu zvierat, UVLF, Košice* 131

## IZOFORMY ADIPONEKTÍNU A ICH ÚLOHA V ORGANIZME

Burkuš J.

*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice*

### ABSTRAKT

Adiponektín je hormón tukového tkaniva, ktorý je produkovaný adipocytmi a vylučovaný do cirkulácie v troch oligomérnych izoformách a to ako trimér, hexamér a HMW (high molecular weight) komplex. V organizme sprostredkúva širokú škálu účinkov súvisiacich najmä s energetickým metabolizmom buniek, má priaznivý vplyv na srdcovo-cievny systém, pôsobí protizápalovo a vplýva aj na reprodukčný systém a vyvíjajúce sa embryá. Veľká heterogenita oligomérnych komplexov adiponektínu komplikuje funkčné štúdie adiponektínu. Rekombinantné adiponektíny získané z rôznych zdrojov majú odlišnú distribúciu oligomérnych komplexov. Usudzuje sa, že rozdielna distribúcia oligomérov vyvoláva odlišné biologické účinky v jednotlivých tkanivách, na ktoré adiponektín pôsobí.

### ÚVOD

Adiponektínový gén je lokalizovaný na chromozóme 3q27 a produkuje proteín o veľkosti 244 aminokyselín u človeka (MW = 26,413) (Ding a kol., 2004) a u myši proteín o veľkosti 247 aminokyselín (MW = 26,409) (Scherer a kol. 1995). Adiponektín sa nachádza v ľudskom sére vo vysokej koncentrácii okolo 10 µg/ml (Arita a kol., 1999). Izoformy adiponektínu sú prítomné aj v ľudskej a prasacej folikulárnej tekutine a to v podobnej koncentrácii ako v sére (Ledoux a kol., 2006). Hladina adiponektínu v plazme je znížená u obéznych alebo diabetických myši a ľudí (Arita a kol., 1999). Koncentrácia adiponektínu v sére vykazuje aj sexuálny dimorfizmus, u samíc je jeho hladina vyššia ako u samcov, pretože zvýšená produkcia androgénov znižuje hladinu adiponektínu v cirkulácii. V ľudskom a myšacom sére vytvára adiponektín širokú škálu multimérov, od trimérov (LMW – low-molecular weight) cez hexaméry (MMW – medium-molecular weight, 180 kDA) až po vysokomolekulové multiméry ako napríklad dodekaméry alebo oktadekaméry (HMW – high-molecular weight, >400 kDA) (Tsao a kol., 2003). Môže byť prítomný v neskrátenej forme (full-length) alebo ako malý globulárny fragment, avšak v plazme je takmer výhradne prítomný v neskrátenej forme. V plazme človeka a myši bolo objavené iba malé množstvo globulárneho fragmentu (Fruebis a kol., 2001). Waki a kol. (2003) zistili, že prítomnosť HMW multimérov (ale nie MMW a LMW multimérov) je signifikantne nižšia u samcov ako u samíc. Z toho možno predpokladať, že nielen celková koncentrácia adiponektínu vykazuje sexuálny dimorfizmus, ale aj distribúcia jeho multimérových foriem. AdipoR1 je receptor prevažne pre globulárny adiponektín a hojne sa vyskytuje najmä v kostrovom svale, receptor AdipoR2 viaže prevažne neskrátenej (full-length) adiponektín a je najviac zastúpený v pečeni. Tieto receptory sú integrálne membránové proteíny, obsahujú 7 transmembránových domén. Ich topológia je opačná ako u ostatných heptahelikálnych receptorov (Yamauchi a kol., 2003). Neskôr bol objavený aj tretí receptor odpovedajúci na adiponektín, T-kadherín, ktorý pravdepodobne vystupuje ako koreceptor pre doposiaľ neidentifikovaný signálny receptor, pomocou ktorého adiponektín spúšťa metabolické signály (Hug a kol., 2004).

### ÚČINKY ADIPONEKTÍNU A JEHO ÚLOHA V REPRODUKCII

Adiponektín riadi metabolizmus lipidov a energetickú rovnováhu (Arita a kol., 1999), má protizápalové a antiaterogénne účinky (Matsuda a kol., 2002), znižuje lipogézu v tukovom tkanive a hladinu glukózy v krvi a potláča inzulínovú rezistenciu (Kershaw a Flier, 2004). Adiponektín ovplyvňuje mužskú aj ženskú fertilitu na rôznych úrovniach a priamo sa zúčastňuje na regulácii plodnosti prostredníctvom osi hypotalamus-hypofýza-gonády. Adiponektín zvyšuje syntézu progesterónu a estrogénu v potkaních vaječníkoch (Chabrolle a



kol., 2007). Expresia oboch receptorov sa niekoľkonásobne zvyšuje v čase gastrulácie, čo môže poukazovať na vplyv adiponektínu počas diferenciácie embryonálneho disku počas gastrulácie (Schmidt a kol., 2008). Chappaz a kol. (2008) preukázali, že aplikácia adiponektínu urýchľuje meiotickú maturáciu oocytov *in vitro* a zvyšuje tiež množstvo partenogeneticky aktivovaných oocytov schopných dosiahnuť štádium blastocysty. Predpokladá sa, že adiponektín môže mať veľký vplyv na energetické zásobenie embrya a môže zohrávať dôležitú úlohu pri jeho implantácii, ovplyvňovaním expresie interleukínov a TNF- $\alpha$  (Takemura a kol., 2006). Myši postrádajúce adiponektín (Adipo -/-), AdipoR1, AdipoR2 alebo oba receptory sú fertílne, čo naznačuje, že táto signalizácia nie je absolútne esenciálna pre funkciu vaječníkov (Yamauchi a kol., 2007), môže však vystupovať ako prídavný komponent pre správnu funkciu ovárií. Usudzuje sa, že adiponektín má určitú komplementárnu úlohu pri ovplyvňovaní ovulačného cyklu, maturácií oocytov a implantácii embrya (Ledoux a kol., 2006).

### IZOFORMY ADIPONEKTÍNU A ICH ODLIŠNÉ BILOGICKÉ FUNKCIE

Súčasnú *in vitro* a takisto *in vivo* štúdie potvrdzujú, že HMW (high molecular weight) oligomér je hlavnou aktívnou formou, ktorá sprostredkúva početné metabolické účinky v pečeni. Túto úlohu potvrdzuje aj selektívne zvýšenie HMW adiponektínu po liečbe TZD (thiazolidinedione), ktorými sa lieči cukrovka typu II (Pajvani a kol., 2004). Znižuje napríklad hyperglykémiu u diabetických myši inhibíciou produkcie glukózy, pričom neskrátený rekombinantný adiponektín produkovaný baktériami, ktorý nemá schopnosť tvoriť HMW oligomér, nemá takmer žiadny účinok na zníženie hyperglykémie (Berg a kol., 2001). Intravenózne podanie HMW adiponektínu myši postrádajúcej adiponektín viedlo k zníženiu hladiny glukózy v sére, hexamér adiponektínu však tento účinok nesprostredkoval (Pajvani a kol., 2004). Takisto u diabetických myši akútne podanie rekombinantného adiponektínu obohateného o HMW oligoméry značne zvýšilo aktivitu AMPK (proteínová kináza aktivovaná adenosín monofosfátom) v pečeni a dlhodobé podávanie viedlo k zmierneniu hyperglykémie a inzulínovej rezistencie. Oveľa miernejšie účinky boli pozorované po podaní rekombinantného adiponektínu so zníženým obsahom HMW oligoméru a žiadne účinky sa neprejavili u adiponektínu bez obsahu HMW oligomérov (Wang a kol., 2006).

Odlíšne formy adiponektínu takisto aktivujú rôzne signálne dráhy vo svaloch. HMW a hexamérne izoformy adiponektínu aktivujú NF- $\kappa$ B (jadrový faktor B), na rozdiel od triméru, ktorý vyvoláva fosforyláciu AMPK $\alpha$  podjednotky (Tsao a kol., 2003).

U obéznych myši sú hladiny triméru a hexaméru v mozgomiechovom moku zvýšené v porovnaní s chudými myšami. Intracerebroventrikulárne podanie hexamérneho adiponektínu navyše spúšťa AMPK signálnu dráhu v hypotalame, v dôsledku čoho sa zvyšuje príjem potravy u myši a znižuje sa výdaj energie (Kubota a kol., 2007). HMW adiponektín v mozgomiechovom moku nie je prítomný, pretože jeho veľkosť mu neumožňuje prejsť cez hematoencefalickú bariéru.

V cievach bol potvrdený priaznivý vplyv triméru, hexaméru aj HMW formy adiponektínu na produkciu oxidu dusnatého, potlačenie oxidatívneho stresu a tvorby zápalu spôsobenými hyperglykémiou (Ouedraogo a kol., 2006). Apoptózu endotelových buniek potláča iba HMW izoforma (Kobayashi a kol., 2004). Trimér inhibuje uvoľňovanie IL-6 (interleukín) a stimuluje sekréciu IL-10 z monocytov, naopak HMW podporuje uvoľňovanie IL-6 z monocytov (Neumeier a kol., 2006). Tri izoformy adiponektínu viažu s rozličnou afinitou aj rastové faktory podieľajúce sa na vzniku aterosklerózy a tým prispievajú k jej zníženiu (Wang a kol., 2005).

Bub a kol. (2006) zistili, že zastavenie bunkového rastu v nádore prostaty je sprostredkované výhradne HMW formou adiponektínu. Naopak obohatenie adiponektínu o rôzne izoformy

spôsobilo indukciu apoptózy a potlačenie rastu buniek nádoru prsníka v rovnakej miere, nebol teda zaznamenaný odlišný vplyv týchto izoformiem (Körner a kol., 2007).

Z doterajších štúdií vyplýva, že adiponektín má vplyv na široké spektrum funkcií v rôznych tkanivách. Spôsob a miera akou tieto funkcie ovplyvňuje závisí od jeho oligomérskej formy. Štúdie vplyvu rozličných oligomérsnych foriem adiponektínu na preimplantačný vývin zatiaľ ešte neboli publikované, ale dá sa predpokladať, že ich vplyv môže byť odlišný.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y: Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 257:79–83.
- Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocytosecreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat. Med.* 2001;7, 947–953.
- Bub JD, Miyazaki T, Iwamoto Y. Adiponectin as a growth inhibitor in prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;340, 1158–1166.
- Ding ST, Liu BH, Ko YH. Cloning and expression of porcine adiponectin and adiponectin receptor 1 and 2 genes in pigs. *J Anim Sci.* 2004 Nov;82(11):3162-74.
- Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:2005–2010.
- Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao TS, Lodish HF. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jul 13;101(28):10308-13.
- Chabrolle C, Tosca L, Dupont J. Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis. *Reproduction* 2007;133:719– 31.
- Chappaz E, Albornoz MS, Campos D, Che L, Palin MF, Murphy BD, Bordignon V. Adiponectin enhances in vitro development of swine embryos. *Domest Anim Endocrinol* 2008;35:198–207.
- Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jun;89(6):2548-56.
- Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, Walsh K, Kumada M, Abe Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ. Res.* 2004;94, e27–e31.
- Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi T, Suzuki R, Satoh H, Tsuchida A, Moroi M, Sugi K, Noda T, Ebinuma H, Ueta Y, Kondo T, Araki E, Ezaki O, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Minokoshi Y, Kadowaki T. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab.* 2007;6, 55–68.
- Körner A, Pazaitou-Panayiotou K, Kelesidis T, Kelesidis I, Williams CJ, Kaprara A, Bullen J, Neuwirth A, Tseleni S, Mitsiades N, Kiess W, Mantzoros CS. Total and high-molecular-weight adiponectin in breast cancer: in vitro and in vivo studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007;92, 1041–1048.
- Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, Dobias-Goff M, Palin MF, Murphy BD. Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. *Endocrinology* 2006;147:5178–86.
- Matsuda M, Shimomura I, Sata M, Arita Y, Nishida M, Maeda N, Kumada M, Okamoto Y, Nagaretani H, Nishizawa H, Kishida K, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Nagai R, Funahashi T, Matsuzawa Y. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipovascular axis. *J Biol Chem.* 2002 Oct 4;277(40):37487-91.
- Neumeier M, Weigert J, Schaffler A, Wehrwein G, Muller-Ladner U, Scholmerich J, Wrede C, Buechler C. Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells. *J. Leukocyte Biol.* 2006;79, 803–808.

- Ouedraogo R, Wu X, Xu SQ, Fuchsel L, Motoshima H, Mahadev K, Hough K, Scalia R, Goldstein BJ. Adiponectin suppression of high-glucose-induced reactive oxygen species in vascular endothelial cells: evidence for involvement of a cAMP signaling pathway. *Diabetes* 2006;55, 1840–1846.
- Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, Rajala MW, Doebber T, Berger JP, Wagner JA, Wu M, Knopps A, Xiang AH, Utzschneider KM, Kahn SE, Olefsky JM, Buchanan TA, Scherer PE. (2004) Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J. Biol. Chem.* 279, 12152–12162.
- Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem.* 1995 Nov 10;270(45):26746-9.
- Schmidt T, Fischer S, Tsikolia N, Navarrete Santos A, Rohrbach S, Ramin N, Thieme R, Fischer B. Expression of adipokines in preimplantation rabbit and mice embryos. *Histochem Cell Biol.* 2008; 129(6):817-25.
- Takemura Y, Osuga Y, Yamauchi T, Kobayashi M, Harada M, Hirata T, Morimoto C, Hirota Y, Yoshino O, Koga K, Yano T, Kadowaki T, Taketani Y. Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium. *Endocrinology.* 2006; 147(7):3203–3210.
- Tsao TS, Tomas E, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Ruderman NB, Heuser JE, Lodish HF. Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity: different oligomers activate different signal transduction pathways. *J. Biol. Chem.* 2003;278, 50810–50817.
- Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem.* 2003 Oct 10;278(41):40352-63.
- Wang Y, Lam KS, Xu J Y, Lu G, Xu LY, Cooper GJ, Xu A. Adiponectin inhibits cell proliferation by interacting with several growth factors in an oligomerization dependent manner. *J. Biol. Chem.* 2005;280, 18341–18347.
- Wang Y, Lam KS, Chan L, Chan KW, Lam JB, Lam MC, Hoo RC, Mak WW, Cooper GJ, Xu A. Post-translational modifications of the four conserved lysine residues within the collagenous domain of adiponectin are required for the formation of its high molecular weight oligomeric complex. *J. Biol. Chem.* 2006;281, 16391–16400.
- Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara, K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature.* 2003;423:762–769.
- Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T, Ito Y, Kamon J, Tsuchida A, Kumagai K, Kozono H, Hada Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Awazawa M, Takamoto I, Froguel P, Hara K, Tobe K, Nagai R, Ueki K, Kadowaki T. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med.* 2007 Mar;13(3):332-9.

## DETEKCIA REZISTENCIE PARAZITOV OVIEC REZISTENTNÝCH NA IVERMEKTÍNY

Dolinská M.

Parazitologický ústav, SAV, Košice

### ABSTRAKT

Parazitózy hospodárskych zvierat negatívne vplyvajú na zdravotný stav oviec. V súčasnosti sa proti parazitom používajú širokospektrálne antihelmintiká, voči ktorým sa už vyvinula rezistencia. Cieľom tejto práce bolo zistiť možnosti využitia *in vitro* testu vývinu lariiev na detekciu rezistencie voči makrocyclickým laktónom. V práci sme použili dva citlivé a štyri rezistentné izoláty gastrointestinálneho parazita *Haemonchus contortus*. Výsledky testu boli analyzované pomocou logitového regresného modelu. Zo získaných hodnôt LD<sub>50</sub>/LD<sub>99</sub> boli určené faktory rezistencie, ktorých rozsah bol v rozmedzí od 0,68 do 60,95 pri použití rôznych derivátov ivermektínu. Najväčší rozdiel medzi citlivými a rezistentnými izolátmi sme získali pri použití ivermektín aglykónu. Záverom možno povedať, že test vývinu lariiev je vhodnou, citlivou a spoľahlivou metódou na detekciu rezistencie voči makrocyclickým laktónom.

### ÚVOD

Chov oviec na Slovensku sa považuje za najstaršie odvetvie živočíšnej výroby. V posledných rokoch sa počty oviec zvyšujú vzhľadom na ich produkčnú ale aj krajinotvornú funkciu bez negatívnych dopadov na životné prostredie. Zdravotný stav oviec ovplyvňuje viacero faktorov medzi ktoré patria aj ochorenia parazitárneho pôvodu, ktoré môžu spôsobiť až ekonomické straty. Na terapiu a prevenciu parazitárnych ochorení používame širokospektrálne antihelmintiká. Doposiaľ sú známe tri skupiny antihelmintík – benzimidazoly, imidazotiazoly a makrocyclické laktóny, voči ktorým sa vyvinula rezistencia a to hlavne v krajinách s rozvinutým chovom hospodárskych zvierat. Rezistencia je definovaná ako schopnosť parazitov prežiť doporučenú dávku liečiva, aj keď pôvodne boli na dané liečivo citlivé. Rezistencia je dedičná (Sangster, 1999). Na Slovensku sa prvý krát zisťoval výskyt rezistencie parazitov v rokoch 1991 – 1993. Pri tomto prieskume bola zistená rezistencia voči benzimidazolovým antihelmintikám v 8% zo 77 vyšetrených fariem (Praslička a kol., 1994). V rokoch 2003 - 2004 Čerňanská a kol. (2006) detegovali rezistenciu voči benzimidazolom v 3,7% z 27 vyšetrených fariem a rezistenciu voči ivermektínu v 23,1% z 26 vyšetrených fariem.

Na detekciu rezistencie voči antihelmintikám sa používajú *in vivo* a *in vitro* testy. Rastúci význam antihelmintickej rezistencie viedol k zvýšenej potrebe štandardizovaných a spoľahlivých detekčných metód (Coles a kol., 1992). *In vivo* testy sú cenovo drahšie, časovo náročnejšie a niekedy charakterizované nízkou preukázateľnosťou výsledkov (Várady a Čorba, 1999). Na detekciu rezistencie voči makrocyclickým laktónom sa najčastejšie používajú nasledovné *in vitro* testy: test vývinu lariiev, modifikovaný test migrácie lariiev, test inhibície príjmu potravy, test paralýzy lariiev a test pohyblivosti lariiev. Nevýhodou väčšiny týchto testov je, že vzhľadom na nízku citlivosť nedokážu presne diagnostikovať rezistentnú časť populácie parazitov. Našou úlohou bolo preto vybrať najcitlivejšiu a najspoľahlivejšiu metódu na detekciu rezistencie voči makrocyclickým laktónom. Na základe našich predchádzajúcich skúseností je takouto metódou test vývinu lariiev.

## MATERIÁL A METODIKA

Na prevedenie *in vitro* testu vývinu lariiev je potrebná izolácia vajíčok z trusu zvierat. Vzorky trusu oviec sme premývali cez tri na seba uložené sitá s rôznym priemerom ôk – 250, 100 a 25 µm. Vajíčka helmintov, ktoré sa koncentrovali na najspodnejšom site sme spláchli vodou do kadičky a nechali sedimentovať. Následne sme sediment preniesli do skúmaviek. Po centrifugácii sme opäť odstránili supernatant a sediment sme zmiešali spolu s flotačným soľným/cukrovým roztokom. Skúmavky sme uzatvorili vrchnáčikmi a po následnej centrifugácii sa nám na vnútorné časti vrchnákov vyflotovali vajíčka helmintov. Zachytené vajíčka sme spláchli vodou do kadičky, určili počet a použili v *in vitro* teste.

V teste vývinu lariiev sme použili 12 koncentrácií liečiv ivermektínu, eprinomektínu a ivermektín aglykónu, deionizovanú vodu, výživné médium a suspenziu vajíčok. Test bol vykonaný v 96 – jamkových platničkách. V kontrolných jamkách bol namiesto liečiva použitý dimetylsulfoxid. Platničky sme inkubovali 7 dní pri teplote 27 °C. Tento proces bol ukončený pridaním jódu do každej jamky. Následne sa určil počet vajíčok, lariiev I., II. a III. štádia v každej z 12 koncentrácií liečiva, ako aj v kontrolných jamkách. Pomocou logaritmickeho-kocentračného logitsového modelu (Waller a kol., 1985) sme určili hodnotu LD<sub>50</sub> (koncentrácia antihelmintika, ktorá zabráni vývinu 50% lariiev do tretieho infekčného štádia) a hodnotu LD<sub>99</sub> (koncentrácia antihelmintika, ktorá zabráni vývinu 99% lariiev do tretieho infekčného štádia). Porovnaním hodnôt LD<sub>50</sub> / LD<sub>99</sub> rezistentného a hodnôt LD<sub>50</sub> / LD<sub>99</sub> citlivého kmeňa sme určili faktory rezistencie. Táto hodnota nám vyjadruje koľkokrát je hodnota rezistentného izolátu väčšia v porovnaní s hodnotou zistenou pri citlivom izoláte.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V tabuľke 1, 2 a 3 uvádzame priemerné hodnoty LD<sub>50</sub>/LD<sub>99</sub> pre citlivé a rezistentné izoláty získané po inkubácii v rôznych derivátoch ivermektínu. V tabuľke 4 sú uvedené porovnania (faktor rezistencie) rezistentných a citlivých izolátov parazita *Haemonchus contortus*. Z dosiahnutých výsledkov je evidentné, že najväčšie rozdiely medzi izolátmi sme získali pri použití ivermektín aglykónu.

**Tab. 1** Aritmetický priemer ± SD hodnoty LD<sub>50</sub>/LD<sub>99</sub> pre citlivé a rezistentné izoláty získané pri LDT, liečivo - IVERMEKTÍN

kmeň	LD <sub>50</sub> (µg.ml <sup>-1</sup> ) ± SD	CV (%)	LD <sub>99</sub> (µg.ml <sup>-1</sup> ) ± SD	CV (%)
<b>Citlivé izoláty</b>				
McMaster	2,322 ± 1,120	48,22	7,743 ± 4,941	63,82
ISE	2,363 ± 0,827	20,30	15,59 ± 14,82	95,10
<b>Rezistentné izoláty</b>				
MOX	9,120 ± 5,064	55,52	46,54 ± 32,14	69,07
CAVR	4,410 ± 3,877	97,91	14,44 ± 1 3,97	96,75
ISE – SEL.	9,220 ± 8,110	97,96	26,80 ± 27,94	104,27
ISE – SEL. L.	17,94 ± 6,099	34,01	110,2 ± 75,19	68,25

**Tab. 2** Aritmetický priemer ± SD hodnoty LD<sub>50</sub>/LD<sub>99</sub> pre citlivé a rezistentné izoláty získané pri LDT, liečivo – IVERMEKTÍN AGLYKÓN

kmeň	LD <sub>50</sub> (µg.ml <sup>-1</sup> ) ± SD	CV (%)	LD <sub>99</sub> (µg.ml <sup>-1</sup> ) ± SD	CV (%)
<b>Citlivé izoláty</b>				
McMaster	0,941 ± 0,518	55,07	2,492 ± 1,023	41,07
ISE	0,697 ± 0,141	20,30	7,655 ± 7,57	98,76
<b>Rezistentné izoláty</b>				
MOX	0,642 ± 0,131	20,41	7,435 ± 6,385	85,87
CAVR	7,188 ± 2,779	39,66	104,1 ± 103,5	99,42
ISE – SEL.	15,17 ± 9,028	59,49	73,03 ± 30,0	41,08
ISE – SEL. L.	16,70 ± 2,35	14,10	151,9 ± 159,7	105,09

**Tab. 3** Aritmetický priemer ± SD hodnoty LD<sub>50</sub>/LD<sub>99</sub> pre citlivé a rezistentné izoláty získané pri LDT, liečivo– EPRINOMEKTÍN

kmeň	LD <sub>50</sub> (µg.ml <sup>-1</sup> ) ± SD	CV (%)	LD <sub>99</sub> (µg.ml <sup>-1</sup> ) ± SD	CV (%)
<b>Citlivé izoláty</b>				
McMaster	0,787 ± 0,380	48,27	3,638 ± 2,050	56,36
ISE	0,802 ± 0,059	7,4	8,225 ± 7,265	88,33
<b>Rezistentné izoláty</b>				
MOX	1,17 ± 0,138	11,87	24,34 ± 23,63	97,08
CAVR	4,206 ± 0,886	21,9	40,34 ± 31,47	78,00
ISE – SEL.	9,192 ± 3,479	37,85	34,66 ± 21,01	60,61
ISE – SEL. L.	12,66 ± 0,654	5,17	41,27 ± 21,43	51,93

**Tab. 4** Faktory rezistencie rôznych kmeňov parazita *Haemonchus contortus*

kmeň	ivermektín		ivermektín aglykón		eprinomektín	
	RF <sub>50</sub>	RF <sub>99</sub>	RF <sub>50</sub>	RF <sub>99</sub>	RF <sub>50</sub>	RF <sub>99</sub>
MOX/McM	3,92	6,01	0,68	2,98	1,48	6,69
CAVR/McM	1,89	1,86	7,63	41,77	5,34	11,08
ISE-S/McM	3,97	3,46	16,12	29,30	11,68	9,53
ISE-S-L/McM	7,72	14,23	17,7	60,95	16,09	11,54
MOX/ISE	3,85	2,98	0,92	0,97	1,45	2,95
CAVR/ISE	1,86	0,92	10,31	13,58	5,24	4,9
ISE-S/ISE	3,9	1,71	21,76	9,54	11,46	4,21
ISE-S-L/ISE	7,89	7,06	23,95	19,84	15,78	5,02

Väčšina z testov, ktoré sa používajú na detekciu rezistencie na ML porovnáva paralýzu rezistentných a citlivých populácií pretože tieto liečivá spôsobujú paralýzu pažeráka nematódov (Geary a kol., 1993) a majú tiež paralyzujúci účinok na somatickú svalovinu týchto parazitov (Gill a kol., 1991). Údaje z doteraz publikovaných prác však poukazujú na nízke hodnoty faktora rezistencie (2-4) pri porovnaní rezistentných a citlivých parazitov. Nami získané výsledky poukazujú na skutočnosť, že pri inkubácii parazitov v rôznych derivátoch ivermektínu (ivermektín aglykón, eprinomektín) sa významne zvýši citlivosť testov, čo umožní nielen potvrdiť rezistenciu, ale aj určiť počiatočnú fázu nástupu rezistencie u parazitov v terénnych podmienkach. Zistili sme, že pri použití ivermektín aglykónu bol faktor rezistencie v rozmedzí od 7,6 do 60,9. Vo všeobecnosti možno povedať, že čím vyšší je faktor rezistencie, tým je testovaná metóda spoľahlivejšia a citlivejšia z pohľadu detekcie rezistentnej časti populácie. Preto môžeme túto metódu považovať za spoľahlivú a citlivú nielen v laboratórnych podmienkach, ale aj pri terénnej diagnostike rezistencie. Na základe dosiahnutých výsledkov považujeme test vývinu lariiev za vhodný pre detekciu rezistencie voči ML a plánujeme ho zahrnúť do monitoringu zisťovania prevalencie rezistencie na Slovensku.

#### POĎAKOVANIE

Táto práca bola realizovaná s finančnou podporou grantového projektu APVV LPP 0186-07.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Coles GC, Bauer C, Borgsteede FHM, Geerts S, Klei TR, Taylor MA, Waller PJ. World association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*. 1992; 44: 35 - 44
- Čerňanská D, Várady M, Čorba J. A survey on anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in the Slovak Republic. *Veterinary Parasitology*. 2006; 135: 39 - 45
- Geary TG, Sims SM, Thomas EM, Vanover L, Davis JP, Winterrowd CA, Klein RD, Ho NFH, Thompson DP. *Haemonchus contortus*: ivermectin induced paralysis of the pharynx. *Experimental Parasitology*. 1993; 77: 88 - 96
- Gill JH, Redwin JM, Van Wyk JA, Lacey E. Detection of resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*. 1991; 2: 771 - 776
- Praslička J, Várady M, Čorba J, Veselý L. A survey of anthelmintic resistance in Slovakia. *Veterinary Parasitology*. 1994; 52: 169 - 171
- Sangster NC. Anthelmintic resistance: past, present and future. *International Journal for Parasitology*. 1999; 29: 115 - 124
- Várady M, Čorba J. Comparison of six in vitro tests in determining benzimidazole and levamisole resistance in *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* of sheep. *Veterinary Parasitology*. 1999; 80: 239 - 249
- Waller PJ, Dobson RJ, Donald AD, Griffiths DA, Smith EF. Selection studies on anthelmintic resistant and susceptible populations of *Trichostrongylus colubriformis* of sheep. *International Journal for Parasitology*. 1985; 15: 669 - 676

# VÝSKYT VIRULENTNÝCH FAKTOROV U RÔZNYCH FYLOGENETICKÝCH SKUPÍN HYDINOVÝCH *ESCHERICHIA COLI*

Drugdová Z.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

## ABSTRAKT

Cieľom nášho výskumu bolo odhalenie prítomnosti virulentných faktorov u hydínových *E.coli* kmeňov izolovaných v priebehu jedného roku z kuracieho mäsa a fekálii brojlerov pred porážkou a následne začlenenie kmeňov *E.coli* do jednotlivých fylogenetických skupín. Vyšetřili sme sto izolátov *E.coli* metodikou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) s využitím primerov virulentných génov *iutA*, *iss*, *cvaC*, *tsh*, *papC*, *kpsII*, *ibeA*. Kmene sme zatriedili do štyroch fylogenetických skupín pomocou Clermontovej metodiky a stanovili sme percentuálny výskyt virulentných faktorov u komenzálov a patogénov. Vykonali sme tiež serotypizáciu pomocou monovalentných a polyvalentných antisér. Virulentné gény sa vyskytovali podstatne častejšie u mäsových izolátov ako u fekálnych izolátov zdravých brojlerov. Najväčší výskyt vykazoval gén *iss* a najmenší *ibeA* u oboch skupín. Fylogenetická typizácia ukázala, že všetky fekálne izoláty patrili do patogénnej skupiny D a B2, zatiaľ čo polovica mäsových izolátov patrila do komenzálnych skupín A a B1, pričom B2 bola skupinou s najväčším výskytom virulentných faktorov vôbec. Nepreukázala sa jasná korelácia medzi výskytom virulentných faktorov a fylogenetickými skupinami. Serotypizácia preukázala, že väčšina kmeňov patrila do patogénneho sérotypu O78.

## ÚVOD

So zavedením systémov manažmentu kvality v hydínárskych závodoch sa zvyšujú požiadavky na mikrobiologickú analýzu fekálnej a environmentálnej kontaminácie pri porážke hydiny. Baktérie z čriev kuracích brojlerov môžu byť transferované do mäsových produktov, čo vedie ku fekálnej kontaminácii počas rôznych fáz porážkového procesu a následného spracovania zvierat. Prítomnosť *Escherichie coli* ako indikátorového organizmu indikuje nielen zlú hygienu, ale sama o sebe môže byť patogénna. Aviárne patogénne *E.coli* (APEC) sú známe ako nositelia veľkého počtu virulentných faktorov ako *iutA*, *iss*, *cvaC*, *tsh*, *papC*, *kpsII*, *ibeA*. (Delicato a kol., 2003). Rodriguez-Siek (Rodriguez-Siek a kol., 2005) odhalil, že uropatogénne *E.coli* (UPEC) a APEC majú podobnosti v ich séroskupinách, virulentných genotypoch a v príslušnosti ku fylogenetickým skupinám, čo podporuje hypotézu, že hydina môže byť nositeľom *E.coli* spôsobujúcej humánne urinárne ochorenia. V odhade kvality potravín je odporúčaná kvantifikácia počtu *E.coli* buniek, ale nevyhnutný je aj odhad prítomnosti virulentných faktorov.

## MATERIÁL A METODIKA

V priebehu jedného roku sme vyšetřili 175 kmeňov *E.coli*. Tampóny z povrchu mäsa mrazených kurčiat zo slovenských supermarketov a rektálne tampóny z brojlerových fariem boli resuscitované v peptónovej vode (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) a naočkované na McConkey agar (Oxoid). Následne sme vybrali 28 mäsových a 72 rektálnych kmeňov, pričom identifikáciu sme previedli za pomoci agaru podľa Hajna (Imuna, Šarišské Michaľany, Slovensko), Uriselect agaru (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) a Entero testu 24 (Pliva-Lachema, Brno, Česká republika). Serotypizáciu sme vykonali u 9 mäsových kmeňov aglutináciu pomocou polyvalentných Anti-Coli A (O1, O2, O18, O78) a monovalentných O78, O1 a O2 antisér (Sifin, Berlín, Nemecko). Skrining izolátov *E.coli* na prítomnosť APEC virulentných génov sme vykonali pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) amplifikáciou *iutA* – receptoru pre aerobaktín (annealingová teplota 63°C, amplicónová veľkosť 300bp), *cvaC* kolicínu V (63°C, 680bp), *kpsII* – kapsulárnej



polysialicovej kyseliny (63°C, 272bp) (Johnson a kol., 2000), *iss* – séra zvýšeného prežívania (61°C, 760bp), *tsh* – teplotne senzitivného hemaglutinínu (55°C, 620bp) (Dozois a kol., 2000), *papC* – P fimbriálneho adhezínu (65°C, 328bp) (Le Bouguenec a kol., 1992), *ibeA* – invazívneho faktoru spôsobujúceho neonatálnu meningitídu (55°C, 814bp) (Moulin-Schouleur a kol., 2006). Kmeňe *E.coli* boli pridelené do fylogenetických skupín A, B1, B2, D (Clermont a kol., 2000) na základe PCR s použitím primerov ChuA, YjaA a TspE4C2 (annealingová teplota 59°C, amplicóny veľkosti 279bp, 211bp, 152bp). PCR bola prevedená v celkovom objeme 25 µl, pričom obsahovala 1 µ DNA vzorky, obidva primery po 20 pmol, štyri deoxynukleotidové trifosfáty každý po 200 µmol·l<sup>-1</sup>, PCR pufo, 1.5 mmol·l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, a 1U platinovej Taq DNA polymerázy (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Teplotný program pozostával z dentaruácie pri 94°C na 5 minút, 30 cyklov pri 94°C na 1 minútu, z annealingovej teploty špecifickej pre každý primer na 1 minútu a z 74°C teploty na záver po dobu 1 minúty v termocykleri MJ Mini (Bio-Rad Laboratories). Amplifikované DNA fragmenty boli separované na 1% agarózovom géli a farbené s Gold View farbivom na nukleové kyseliny (SBS Genetech, Beijing, Čína). Ako štandard molekulárnej hmotnosti sme použili 100bp ladder (Invitrogen).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

U mäsových izolátov sme zaznamenali výrazne častejšie výskyt piatich virulentných génov *iutA*, *iss*, *cvaC*, *tsh* a *papC* ako u fekálnych izolátov *E.coli* (Tab.1).

**Tab. 1** Frekvencia virulentných génov u 72 fekálnych a 28 mäsových izolátov (Drugdová a kol., 2010)

Virulentné faktory	Fekálne <i>E.coli</i>	Mäsové <i>E.coli</i>
<i>iss</i>	39/72 (54.1%)	20/28 (71.4%)
<i>iutA</i>	54/72 (75%)	25/28 (89.2%)
<i>cvaC</i>	15/72 (20.8%)	12/28 (42.8%)
<i>tsh</i>	15/72 (20.8%)	16/28 (57.4%)
<i>papC</i>	12/72 (16.6%)	8/28 (28.5%)
<i>kpsII</i>	27/72 (37.5%)	8/28 (28.5%)
<i>ibeA</i>	6/72 (8.3%)	3/28 (10.7%)

Typický APEC patotyp obsahuje rôzne gény kódujúce Fe transportéri, ako *irp2*, *fyuA*, *iutA*, *iroN* a *sitA* ako aj plazmidové gény, vrátane *cvi/cvaC*, *tsh* a *iss* (Rodriguez-Siek a kol., 2005). Takisto *pap* gény, kódujúce P fimbrie boli oveľa častejšie pozorované u APEC kmeňov ako u fekálnych kmeňov. Veľmi rozšírenou črtou aviárnych *E.coli* kmeňov je ich rezistencia na sérum (*iss*), čím sa odlišujú virulentné od nevirulentných (Foley a kol., 2000). Virulentné *E.coli* samozrejme ale nemusia byť typické patogény. Vlastností našich mäsových izolátov jasne korelujú z predošlými zisteniami, keďže polovica kmeňov boli komenzáli s virulentnými faktormi. Fylogenetická typizácia ukázala, že všetky fekálne izoláty zdravých brojlerov patrili do patogénnej skupiny D (62.5%) a B2 (37.5%), zatiaľ čo 53% mäsových kmeňov patrilo do komenzálnych fylogenetických skupín A a B1. Náš výskum však poukazuje na to, že izoláty z fylogenetických skupín A a B1 môžu mať virulentné profily

podobné B2 izolátom (Tab.2). Ako vidno v tabuľke 2, *iutA*, *iss* a *tsh* sa vyskytujú rovnako u komenzálov ako aj u patogénov. *Kps* a *ibeA* sa naopak častejšie vyskytujú u patogénov, zatiaľ čo *cvaC* dominuje u komenzálov. Z týchto zistení teda vyplýva, že sme nezaznamenali jasnú koreláciu medzi fylogenetickými skupinami a výskytom virulentných faktorov. Po vykonaní serotypizácie 9 mäsových kmeňov patrilo do patogénneho sérotypu O78. APEC teda pravdepodobne slúžia ako rezervoár virulentných génov pre humánne ExPEC. U našich slovenských hydínových vzoriek sme u *E.coli* objavili virulentné gény príbuzné aviárnym patogénnym, alebo humánnym uropatogénnym *E.coli*. Predávané potraviny môžu byť dôležitým nositeľom rozširujúcim virulentné *E.coli*, ako aj *Campylobacter jejuni* (Josefsen a kol., 2004) a *Salmonella enterica* (Krasenicsová a kol., 2006), ktoré môžu predstavovať novú skupinu medicínsky významných patogénov potravinového pôvodu.

**Tab.2** Distribúcia virulentných génov a fylogenetické skupiny u 28 hydínových mäsových *E.coli* kmeňov (Drugdová a kol., 2010).

Virulentné faktory	Počet kmeňov	Komenzály/počet kmeňov	Patogény/počet kmeňov
žiadny	1	Skupina A/1	
<i>iut</i>	1	Skupina A/1	
<i>kps, pap</i>	1		Skupina B2/1
<i>iut, iss</i>	3	Skupina A/1 Skupina B/1	Skupina B2/1
<i>iut, tsh</i>	1		Skupina B2/1
<i>iut, ibe</i>	2		Skupina B2/2
<i>kps, tsh</i>	1	Skupina A/1	
<i>iut, iss, cva</i>	2	Skupina A/2	
<i>iut, cva, tsh, pap</i>	1	Skupina A/1	
<i>iut, iss, kps</i>	2		Skupina B2/2
<i>iut, iss, cva, tsh</i>	3	Skupina A/2	Skupina B2/1
<i>iut, iss, kps, tsh</i>	3		Skupina B2/3
<i>iut,iss,kps, tsh, ibe</i>	1		Skupina B2/1
<i>iut, iss, cva, tsh, pap</i>	6	Skupina B1/5	Skupina B2/1

## POĎAKOVANIE

Tento výskum bol podporený slovenskými grantmi LPP 0045-09 a VEGA 2/0012/08.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl Environ Microbiol. 2000; 66:4555-4558.
- Delicato ER, Guimaraes de Britto B, Gaziri LCJ, Vidott MC. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. Veterin Microbiol. 2003; 94:97-103.
- Dozois CM, Dho-Moulin M, Brée A, Fairbrother JM, Desautels C, Curtiss III R. Relation between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *tsh* genetic region. Infect Immunity. 2000; 68:4145-4154.
- Drugdová Z, Kmeť V, Bujňáková D. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from chicken meat in Slovakia. J Food Nutr Res. 2010; 49:10-13.
- Foley SL, Horne SM, Giddings CW, Robinson M, Nolan LK. Iss from a virulent avian *Escherichia coli*. Avian Diseases. 2000; 44:185-191.
- Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J Infect Diseases. 2000; 181:261-272.

- Josefsen MH, Cook N, D'Agostino M, Hansen F, Wagner M, Demnerová K, Heuvelink A, Tassios PT, Lindmark H, Kmet' V, Barbanera M, Fach P, Loncarevic S, Hoorfar J. Validation of a PCR-based method for detection of food-borne thermotolerant campylobacters in a multicenter collaborative trial. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70:4379-4383.
- Krascenicsová K, Kaclíková E, Pangallo D, Siekel P, Girotti S, Kuchta T. Detection of *Salmonella enterica* in food on the next day after the sample collection using 5'-nuclease polymerase chain reaction with end-point fluorimetry. *J Food Nutr Res.* 2006; 45:30-33.
- Le Bouguenec C, Archambaud M, Labigne A. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa* and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992; 30:1189-1193.
- Moulin-chouleur M, Schouleur C, Tailliez P, Mu-Rong Kao-Bree A, Germon P, Oswald E, Mainil J, Blanco M, Blanco J. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:3484-3492.
- Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK. Characterizing the APEC pathotype. *Veter Research.* 2005; 36:241-256.

# COLV PLAZMIDOM KÓDOVANÁ REZISTENCIA NA ORTUŤ V *ESCHERICHIA COLI* POPULÁCII POCHÁDZAJÚCEJ Z FAECES PRASIAŤ

Fecskeová L.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

## ABSTRAKT

Izoloval sa a čiastočne charakterizoval nový typ ColV plazmidu, označený ako pColV-F1. Okrem rezistencie na tetracyklín, produkcie kolicínov, determinantov sprostredkujúcich vlastný prenos a niekoľko ďalších vlastností prispievajúcich k patogenite, ktoré sa bežne nachádzajú na ColV plazmidoch, tento plazmid obsahuje aj *merA* génom kódovanú rezistenciu na ortuť, pravdepodobne spojenú s génovým elementom patriacim do IS66 rodiny, doteraz u ColV plazmidov nepozorovanú. Výskyt ColV plazmidom kódovanej rezistencie na ortuť sa študoval v populácii *E. coli* z hnačkujúcich prasiat, kde napriek rozsiahlemu rozšíreniu pColV-F1 podobných plazmidov, prenosná rezistencia na ortuť sa vyskytovala len výnimočne.

## ÚVOD

Napriek tomu, že baktérie *Escherichia coli* sú bežnou súčasťou normálnej mikroflóry zvierat a človeka, niektoré patogénne kmene vyvolávajú závažné ochorenia. Vo veľkej miere sú však za ich patogenitu zodpovedné mobilné génové elementy kódujúce rôzne faktory virulencie. Typickými predstaviteľmi takýchto elementov sú tzv. ColV plazmidy, ktoré tvoria heterogénnu skupinu veľkých, konjugatívnych plazmidov patriacich do IncFI skupiny inkompatibility (Waters a Crosa, 1991). Boli nájdené prevažne v patogénnych enterobaktériách a práve preto sa dlho spájali s patogenitou *E. coli*, i keď samotná kolicinogenita k tejto vlastnosti neprispieva. Namiesto toho však ColV plazmidy často kódujú širokú škálu rôznych determinantov zvyšujúcich patogenitu hostiteľskej baktérie. Rozsiahly výskyt týchto génov virulencie bol popísaný aj u *E. coli* izolátov pochádzajúcich z hydiny (Drugdová a kol., 2010). Tieto gény resp. skupiny génov sa často nachádzajú v spojení s rôznymi mobilnými génovými elementami ľahko prístupnými v procese horizontálneho šírenia a predstavujúcimi akési evolučné medzištádium pri vytváraní chromozomálnych ostrovov patogenity (tzv. PAI, *pathogenity island*) (Johnson a kol., 2006).

Plazmid pColV-F1, pravdepodobne zodpovedný za šírenie tetracyklínovej rezistencie v *E. coli* populácii v tráviacom trakte ovce (Malík a kol., 2005), bol izolovaný a čiastočne charakterizovaný na našom ústave. Je to veľký, konjugatívny plazmid patriaci do IncFI skupiny inkompatibility, ktorý napriek svojej veľkosti nepredstavuje prakticky žiadnu prídavnú metabolickú záťaž pre hostiteľskú baktériu. Ďalšími analýzami sa odhalilo, že obsahuje niekoľko molekulárnych determinantov, ktoré by potenciálne mohli byť zodpovedné za kompenzáciu metabolickej záťaže. Predpokladáme, že sú to predovšetkým tvorba kolicínu V, ktorá zvyhodňuje prežívanie hostiteľa v jeho prirodzenom prostredí.

V tejto práci sme pokračovali v charakterizácii tohto nového člena ColV rodiny a zisťovali sme rozšírenie podobných plazmidov v patogénnej *E. coli* populácii pochádzajúcej z čriev prasiat.

## MATERIÁL A METÓDY

*Kultivácia baktérií a izolácia DNA.* V práci sme použili divoké kmene *E. coli* pochádzajúce z faeces hnačkujúcich prasiat a transkonjuganty divokých kmeňov a laboratórneho kmeňa *E. coli* DH5 $\alpha$ . Všetky kmene boli kultivované v LB médiu pri 37 °C s prídavkom antibiotík

v koncentrácii 16 µg/ml tetracyklínu a 100 µg/ml nalidixínu. Totálna DNA bola izolovaná metódou podľa Pospiecha a Neumanna (1995). Plazmidová DNA bola izolovaná alkalickou lýzou.

*Konjugatívny prenos.* Nočnú kultúru tetracyklín rezistentných donorových kmeňov a nalidixín rezistentného recipientného laboratórneho kmeňa DH5α sme zmiešali v pomere 1:1 (cfu) a vysiali na agarové LB platne. Po 5 hodinovej kultivácii pri 37°C sme platne zmyli 5 ml LB média a desatinným riedením sme vysiali na LB platne s obsahom hore uvedených antibiotík a kultivovali sme pri 37 °C po dobu 16 hod.

*Polymerázová reťazová reakcia.* Ako templát v PCR reakciách sme použili 1-2 ng totálnej DNA. PCR reakcie boli vykonávané v termocykléry Techne Thermal Cycler (Promega, USA). Sekvencie použitých primérov, teploty annealingu a veľkosti očakávaných amplicónov sú uvedené v tabuľke 1. Použitý program bol nasledujúci: po iniciačnej denaturácii (94°C 3 min) nasledovalo 35 cyklov s parametrami 94 °C 1 min, t annealingu\* 1 min, 72 °C 1 min a ukončená finálnou extenziou pri 72 °C 10 min.

**Tab. 1.** Popis, sekvencia použitých primérov a teploty použité pri annealingu

Primér/gén	sekvencie primérov (5'→3')	Teplota annealingu* (°C)	veľkosť amplicónu (bp)
<i>tetB</i>	F ctcagtattccaagcgtttg R ctaagcacttgctcctggt	55	430
<i>cvaB</i>	F tccgtataaggctcgtgca R tgcctctctgaccagtttcttc	56	602
<i>iss</i>	F cagcaaccggaaccactgatg R agcattgccagagcggcagaa	62	329
<i>iucA</i>	F atgagaatcattattgacataatt R ctcacgggtgaaaatattt	47	1478
<i>iutA</i>	F ggctggacatcatgggaactgg R cgctgggaacggtagaatcg	62	301
IS66 <i>tnp</i>	F agccgctcgaaaaagtctc R tgcggatggatgcctttct	57,5	734
<i>merA</i>	F accatcggcggcacctgcgt R accatcgtcaggtagggaaca	64	1237
<i>merA</i> – IS66 <i>tnp</i>	kombinácie <i>merA</i> a IS66 <i>tnp</i> primérov	65	?

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V predchádzajúcich prácach sa identifikoval veľký, konjugatívny ColV plazmid prenášajúci tetracyklínovú (Tc) rezistenciu. Zistilo sa, že obsahuje gén pre transponázu (*tnp*) nachádzajúceho sa na genetickom mobilnom elemente rodiny IS66. Výskyt kompletného *mer* operónu kódujúceho rezistenciu voči ortuti v spojení s touto rodinou mobilných elementov u enterobaktérií bol už v minulosti dokumentovaný (Mindlin a kol., 2005), avšak nie v spojení s ColV plazmidom. Potenciálna prítomnosť prenosného determinantu rezistencie na ortuť bola potvrdená na LB agarových platniach s obsahom HgCl<sub>2</sub>, kde transkonjuganty prežívali aj pri vyššej koncentrácii ortuti v porovnaní s laboratórnym recipientným kmeňom. Následne PCR amplifikáciou sa potvrdila prítomnosť 1200 bp úseku *merA* génu. Kolokalizáciu génu pre transponázu inzerčnej sekvencie IS66 a *merA* génu sa nám pomocou PCR reakcie nateraz nepodarilo dokázať.

V ďalších krokoch sme pokračovali s Tc-rezistentnými, patogénnymi *E. coli* izolátmi z faeces hnačkujúcich prasiat. Zamerali sme sa na variabilitu výskytu niektorých vlastností plazmidu pColV-F1 v spojení s prenosnou Tc rezistenciou a rezistenciou voči ortuti. Zo 16 Tc rezistentných izolátov bola táto rezistencia kódovaná *tetB* génom v 14 prípadoch a konjugatívny prenos tohto génu sme zaznamenali u 11 z nich (Tab. 2). Vo väčšine prípadov bol tento prenos sprevádzaný získaním ColV plazmidu, čo sme detegovali taktiež pomocou PCR amplifikácie *cvaB* génu, jedného zo 4 génov kolicínového operónu kódujúceho kolicín V exportný proteín. Vybrané typické faktory virulencie ako napríklad determinant zodpovedný za zvýšené prežívanie v sére (*iss*) alebo gény kódujúce mechanizmus vychytávania trojmocného železa zo séra (*iutA* a *iucA*) boli prítomné približne v 50% kmeňov. Prítomnosť *merA* génu sa však potvrdila v podstatne menšom množstve izolátov, či už divokých alebo transkonjugantov. Z celkového počtu 6 *merA* pozitívnych divokých izolátov (35%) sa javil tento gén prenosný len v 4 prípadoch (23,5%). Kombináciu prenosného *tetB-merA-cvaB* genotypu sme pozorovali len u 17,6% kmeňov.

Identifikovali a čiastočne sme charakterizovali nový typ ColV plazmidu (pColV-F1), ktorý kóduje aj rezistenciu na ortuť, doteraz u ColV plazmidov nepozorovanú. Štúdium frekvencie výskytu pColV-F1 podobných plazmidov a jeho vybraných vlastností ukázali, že kým ColV plazmidy sa v patogénných *E. coli* kmeňoch vyskytujú relatívne často; s limitovanou variabilitou výskytu faktorov patogenity u jednotlivých kmeňoch; prítomnosť génov rezistencie na ortuť u týchto plazmidov je však skôr výnimočná.

**Tab. 2.** Fenotypové a genotypové vlastnosti testovaných divokých kmeňov (D) a transkonjugantov (T)

kmeň	Tc <sup>R</sup> (fenotyp)		Hg <sup>R</sup> (fenotyp)		<i>tetB</i>		<i>cvaB</i>		<i>Iss</i>		<i>iucA</i>		<i>iutA</i>		<i>merA</i>	
	D	T	D	T	D	T	D	T	D	T	D	T	D	T	D	T
BA	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
DEN	+	NA	-	NA	+	NA	+	NA	+	NA	+	NA	+	NA	-	NA
HEM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
KE	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KM	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
LMK	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
NEH	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
181	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
201	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+/-	+/-	+	+
146	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
192	+	NA	-	NA	-	NA	-	NA	+	NA	+	NA	-	NA	-	NA
351	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
377	+	NA	+	NA	+	NA	-	NA	-	NA	-	NA	+	NA	-	NA
500	+	NA	-	NA	+	NA	+	NA	+	NA	+	NA	+	NA	-	NA
506	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
1652	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Z11	-	NA	-	-	-	NA	+	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	-

NA – neaplikovateľné

## POĎAKOVANIE

Tento projekt bol podporovaný Vedeckou Grantovou Agentúrou VEGA, grant č. 2/0051/08.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Drugdová, Z., Kmeť, V., Bujňáková, D.: Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from chicken meat in Slovakia. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2010; 49:10-3
- Johnson, T.J., Siek, K.E., Johnson, S.J., Nolan, L.K.: DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *Journal of Bacteriol.* 2006; 188:745-58
- Malík R., Ivan J., Javorský P., Pristaš P.: Seasonal dynamics of antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae* in the gastrointestinal tract of domestic sheep. *Fol. Microbiol.* 2005; 50:349-52
- Mindlin, S., Minakhin, L., Petrova, M., Kholodii, G., Minakhina, S., Gorlenko, Z., Nikiforov, V.: Present-day mercury resistance transposons are common in bacteria preserved in permafrost grounds since the Upper Pleistocene. *Research in Microbiol.* 2005; 156:994-1004
- Pospiech A., Neumann B.: A versatile quick/prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends Genet.* 1995; 11:217-18
- Waters, V.L., Crosa J.H.: Colicine V virulence plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1991; 55: 437-50

## ÚLOHA ESTROGÉNOVÝCH RECEPTOROV V HOJENÍ RÁN

Gál P.<sup>1,2,5</sup>, Vasilenko T.<sup>2,3</sup>, Novotný M.<sup>4</sup>, Szabo P.<sup>5,7</sup>, Lenhardt Ľ.<sup>2</sup>, Sabol F.<sup>6</sup>, Smetana K Jr.<sup>6,7</sup>

<sup>1</sup> Úsek pre biomedicínsky výskum VÚSCH, a.s., Košice, SR, <sup>2</sup> Ústav patologickej anatómie, UVLF, Košice, SR, <sup>3</sup> III. chirurgická klinika, SZU, Nemocnica Košice-Šaca, SR, <sup>4</sup> Ústav patologickej fyziológie, UPJŠ – LF, <sup>5</sup> Anatomický ústav, UK – I.LF, Praha, ČR, <sup>6</sup> Klinika srdcovej chirurgie, VÚSCH, a.s., Košice, SR, <sup>7</sup> Centrum buněčné terapie a tkáňových náhrad, UK – 2.LF, Praha, ČR

### ABSTRAKT

U žien v postmenopauzálnom období je znížená hladina estrogénu jednou z hlavných príčin mnohým s vekom spojených procesov vrátane zlého hojenia rán. Z toho dôvodu bolo cieľom našej práce zistiť vplyv špecifickej estrogénovej substitučnej terapie (EST) na hojenie excíznych a incíznych rán na potkanoch in vivo ako aj na diferenciálu fibroblastov in vitro. V práci bola pozorovaná vyššia pevnosť rán u potkanov liečených beta agonistom. Len v ranách liečených alfa agonistom bola pozorovaná výrazná diferenciácia fibroblastov na myofibroblasty čo bolo potvrdené aj v našej in vitro štúdií. Na záver môžeme konstatovať, že EST by mala byť aj receptorovo- aj ranovo-špecifická. Z tohto pohľadu táto práca prináša nové informácie o EST a môže mať výrazný dopad na budúcu liečbu pacientov.

### ÚVOD

V krajinách s kvalitnou zdravotníckou starostlivosťou sa zvyšuje priemerný vek populácie. U žien v postmenopauzálnom období je znížená hladina estrogénu jednou z hlavných príčin mnohým s vekom spojených procesov vrátane zlého hojenia rán (Hall et al. 2005). V predchádzajúcich štúdiách bolo preukázané, že ženy prijímajúce estrogénovú substitučnú liečbu (EST) mali nižšiu incidenciu chronických rán (Kovacs 2005; Margolis et al. 2002). Mimoto v Ashcroft a kol. (1999) v klinickej štúdií dokázali, že lokálna aplikácia estrogénu zlepšuje hojenie kožných rán. V estrogénom liečenej skupine bola popísaná významná redukcia veľkosti rany, zvýšené množstvo kolagénu a zvýšená pevnosť rany. Navyše bolo dokázané, že EST znižuje riziko zlomenín, kolorektálneho karcinómu ako aj incidenciu postmenopauzálnych symptómov (Warren 2004).

Je dobre známe, že starnutie zdravých žien je spojené s poklesom hladín transformujúceho rastového faktora beta 1 (TGF- $\beta$ 1). Ashcroft a kol. ukázali, že estrogén zvyšuje produkciu TGF- $\beta$ 1 kožnými fibroblastami čo viedlo k zrýchleniu maturácie rany. V súčasnosti sa však skôr predpokladá, že jednotlivé podtypy estrogénových receptorov (ER) hrajú rôznu úlohu v procese hojenia kože čo bolo naznačené v štúdií publikovanej Merlo a kol. (2009) realizovanej na ľudských keratinocytoch. V tejto práci bolo ukázané, že agonista ER- $\alpha$  zvyšuje bunkovú proliferáciu a zároveň stimuluje sekréciu TGF- $\beta$ 1, pričom agonista ER- $\beta$  sekréciu TGF- $\beta$ 1 neovplyvňuje. Možno sa domnievať, že pre zošité incízne rany činnosť myofibroblastov (kontrakcia rany) nie je na rozdiel od rán excíznych rozhodujúca. Na základe uvedeného predpokladu je najdôležitejšou otázkou, na ktorú je potrebné v našom projekte odpovedať je či má byť estrogénová substitučná liečba odlišná v závislosti od typu rany (excízna vs. incízna) a byť receptorovo-špecifická.

### MATERIÁL A METODIKA

#### *In vivo*

V práci bolo použitých 48 samíc potkana plemena Sprague-Dawley vo veku 6 mesiacov. Náhodným výberom boli rozdelené do šiestich skupín: C-SO-V – kontrolná falošne operované liečené nosičom, OVX-V – ovariektomizované liečené nosičom, OVX- $\alpha$  –



ovarietomizované liečené PPT a OVX- $\beta$  – ovariectomizované liečené DPN.

Tri mesiace pred samotným pokusom s hojením rán (Gál et al. 2008), boli potkany zo všetkých OVX skupín ovariectomizované. U potkanov v skupine C-SO-V, boli falošne operované bez odstránenia ovárií.

Na sledovanie hojenia kožných rán, boli všetkým jedincom v pokuse na ľavej a pravej polovici chrbta v celkovej anestézii a za aseptických podmienok vytvorené 2 paralelné, 40 mm dlhé kožné rany, následne suturované intradermálnym pokračujúcim stehom. 1 centimeter nad každou ranou bola vytvorená kruhová rana s priemerom 4 mm v celej hrúbke kože.

Zvieratá v skupinách OVX- $\alpha$  a OVX- $\beta$  boli liečené (1 krát denne) príslušnými modulátormi ER v dávke 1mg/kg subkutánne (Lund et al. 2005; Wegorzewska et al. 2008). Zvieratám v ostatných skupinách bol denne v podobnom objeme subkutánne podávaný nosič (1% DMSO). Zvieratá boli utračené éterom po 5 a 10 dňoch od vytvorenia rán. Vzorky rán z chrbta potkanov boli odobraté za účelom merania pevnosti rán a histológie. Pevnosť rany bola meraná na prístroji zhotovenom v našom laboratóriu podľa metodiky popísanej v predchádzajúcej štúdií (Gál et al. 2009). Parafínové rezy z rán boli farbené hematoxilín-eozínom a Van Giesonom.

#### *In vitro*

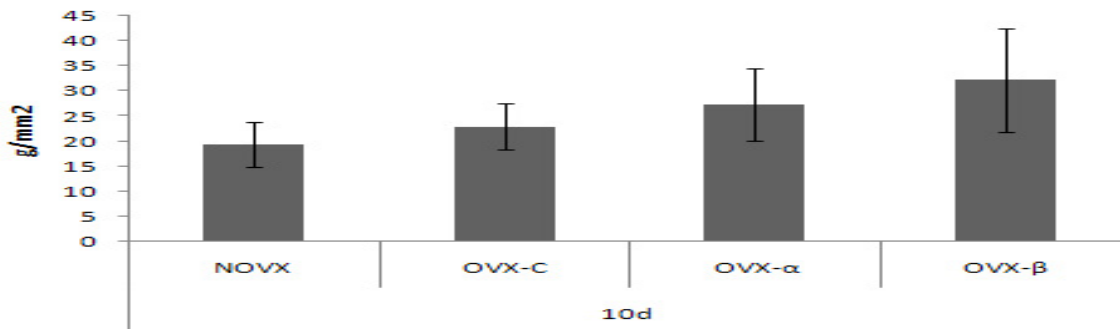
V in vitro štúdií boli použité humánne dermálne fibroblasty. Bunky boli pestované v štandardných médiách a za štandardných podmienok s následovnými koncentraciami PPT a DPN: 1nM, 10nM, 100nM, 1 000nM a 10 000nM.

#### *Imunohistochemia/imunocytochemia*

Mrazené rezy z rán a fibroblasty boli imunohistochemicky farbené s nasledovnou kombináciou protilátok: anti-fibronectin (zelený kanál), anti- $\alpha$ -smooth muscle actin (červený kanál) a DAPI (modrý kanál). Obráz s jednotlivých fluorescenčných kanálov bol skladaný v programe LUCIA 5.1.

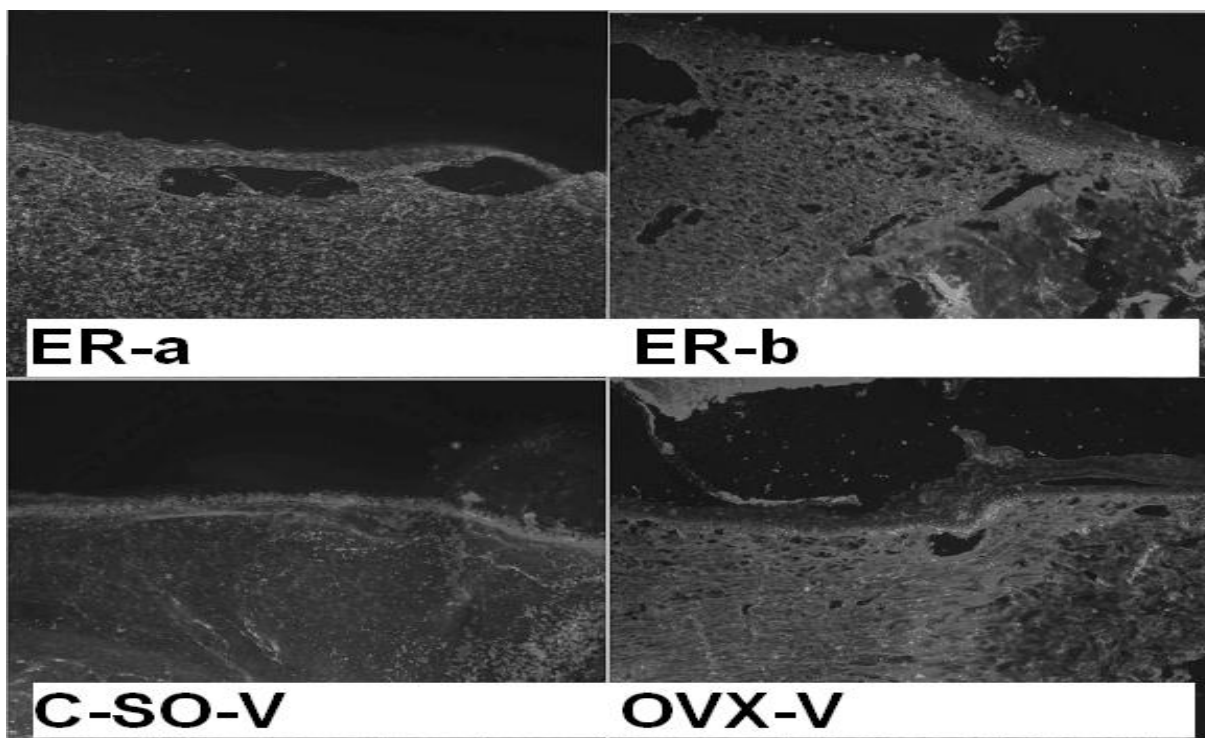
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V našich predošlých štúdiách sme dokázali že nešpecifická EST znižuje pevnosť rany a zároveň zvyšuje formovanie nových ciev v granulačnom tkanive ovariectomizovaných potkanov (Gál et al. 2008a). Vo všeobecnosti je hlavným rozdielom medzi primárnym a sekundárnym hojením rany množstvo granulačného tkaniva. Kým sa pri primárnom hojení tvorí len málo, alebo takmer žiadne granulačné tkanivo pri sekundárnom hojení dochádza k podstatne výraznejšej tvorbe nového tkaniva pričom je potrebná extenzívna tvorba granulačného tkaniva (Gál et al. 2008b). Vzhľadom k tomu že estrogénové receptory sú zapojené do odlišných dráh modulujúcich hojenie rán, ER- $\alpha$  na rozdiel od ER- $\beta$ , zvyšuje bunkovú proliferáciu aj cestou sekrécie TGF- $\beta$ 1 (Merlo et al. 2008), existuje tu predpoklad, že pre rôzne typy rán sa bude EST líšiť. To sa nám podarilo čiastočne potvrdiť v našej predchádzajúcej štúdií, kde sme pozorovali pokles pevnosti, ktorý bol sprostredkovaný skôr ER- $\alpha$  ako ER- $\beta$  (Gál et al. 2010).



Obr. 1: Pevnosť rán meraná po 10 dňoch hojenia. Najvyššia pevnosť nameraná v ranách liečených agonistom beta estrogénového receptora

V tejto práci bola pozorovaná vyššia pevnosť rán u potkanov liečených beta agonistom a len v ranách liečených alfa agonistom bola pozorovaná výrazná diferenciacia fibroblastov na myofibroblasty čo bolo potvrdené aj v našej terajšej *in vitro* štúdií.



Obr. 2: Rany odobraté s potkanov po 10 dňoch hojenia. Výrazná prítomnosť myofibroblastov v ranách liečených ER-alfa agonistom a minimálna prítomnosť v kontrolách (červený kanál – farbenie: alfa-smooth muscle actin).

Na záver môžeme konštatovať, že estrogénová suplementačná terapia by mala byť aj receptorovo- aj ranovo-špecifická. Z tohto pohľadu táto práca prináša nové informácie o hormonálnej substitučnej terapii a môže mať výrazný dopad na budúcu liečbu pacientov.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ashcroft GS, Greenwell-Wild T, Horan MA, Wahl SM, Ferguson MW. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. *Am J Pathol.* 1999;155(4):1137-46.
- Gál P, Toporcer T, Vidinský B, Mokry M, Grendel T, Novotný M, Sokolský J, Bobrov N,

- Toporcerová S, Sabo J, Mozes S. Postsurgical administration of estradiol benzoate decreases tensile strength of healing skin wounds in ovariectomized rats. *J Surg Res.* 2008;1;147(1):117-22.
- Gál P, Kilik R, Mokry M, Vidinsky B, Vasilenko), Mozes S, Bobrov N, Tomori Z, Bober J, Lenhardt L. Simple method of open skin wound healing model in corticosteroid-treated and diabetic rats: standardization of semi-quantitative and quantitative histological assessments. *Vet Med – Czech.* 2008;53(12):652-9.
- Gál P, Toporcer T, Vidinský B, Hudák R, Zivcák J, Sabo J. Simple interrupted percutaneous suture versus intradermal running suture for wound tensile strength measurement in rats: a technical note. *Eur Surg Res.* 2009;43(1):61-5.
- Gál P, Novotný M, Vasilenko T, Depta F, Sulla I, Tomori Z. Decrease in wound tensile strength following post-surgical estrogen replacement therapy in ovariectomized rats during the early phase of healing is mediated via ER-alpha rather than ER-beta: a preliminary report. *J Surg Res.* 2010;159(1):e25-8.
- Hall G, Phillips TJ. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53(4):555-68.
- Kovacs EJ. Aging, traumatic injury, and estrogen treatment. *Exp Gerontol.* 2005;40(7):549-55.
- Lund TD, Rovis T, Chung WC, Handa RJ. Novel actions of estrogen receptor-beta on anxiety-related behaviors. *Endocrinology.* 2005;146(2):797-807.
- Margolis DJ, Knauss J, Bilker W. Hormone replacement therapy and prevention of pressure ulcers and venous leg ulcers. *Lancet.* 2002;359(9307):675-7.
- Merlo S, Frasca G, Canonico PL, Sortino MA. Differential involvement of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta in the healing promoting effect of estrogen in human keratinocytes. *J Endocrinol.* 2009;200(2):189-97.
- Warren MP. A comparative review of the risks and benefits of hormone replacement therapy regimens. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190(4):1141-67.
- Wegorzewska IN, Walters K, Weiser MJ, Cruthirds DF, Ewell E, Larco DO, Handa RJ, Wu TJ. Postovariectomy weight gain in female rats is reversed by estrogen receptor alpha agonist, propylpyrazoletriol. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;199(1):67.e1-5.

# SEZÓNNE ROZDIELY V KONCENTRÁCIÍ VZDUŠNÝCH MIKROORGANIZMOV A VÝSKYT ANTIBIOTIKO - REZISTENTNÝCH BAKTÉRIÍ V PROSTREDÍ ČISTIARNE ODPADOVÝCH VÔD

Gregová, G.<sup>1</sup>, Venglovský, J.<sup>1</sup>, Kmet', V.<sup>2</sup>, Sasáková, N.<sup>1</sup>, Laktičová, K.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Katedra životného prostredia, veterinárnej legislatívy a ekonomiky UVLF, Košice*

<sup>2</sup>*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice*

## ABSTRAKT

Úprava odpadových vôd zahŕňa použitie mechanických, chemických a biologických procesov čistenia na zabezpečenie prípustného stupňa znečistenia vypúšťaných vôd do recipienta. Počas týchto čistiacich procesov dochádza k odstraňovaniu, inaktivácii patogénov a parazitov, súčasne sa však tieto organizmy môžu dostať do vzduchu daného pracovného prostredia a vytvárať nebezpečný bioaerosól (Ondrašovič a kol., 1996).

Cieľom našej práce bolo zistiť miesta s najväčšou koncentráciou vzdušných mikroorganizmov na identifikáciu zdravotných rizík v prevádzke čistiarní odpadových vôd a jej okolí. Použitie prístroja MAS 100 Eco je v tomto prípade veľmi vhodné, z dôvodu jeho kompaktnosti a následného rýchleho spracovania odobratých vzoriek.

Vzhľadom na vysokú spotrebu antibiotík v humánnej aj veterinárnej medicíne, je v súčasnosti obzvlášť aktuálnou témou zisťovanie rezistentných mikroorganizmov v životnom prostredí. Je veľmi dôležitý neustály výskum vzniku nových rezistentných kmeňov a následné použitie získaných výsledkov pri vývoji nových, účinných farmaceutických prípravkov boja proti nim.

## ÚVOD

Bioaerosól predstavuje rozptýlený biologický materiál pozostávajúci z biotických a abiotických zložiek s priemerom 20nm až 100µm. Medzi biotické zložky patria baktérie, vírusy, huby, protozoá a prachové častice, z ktorých je väčšina usmrcovaná v atmosfére. Abiotické zložky sú mykotoxíny, endotoxíny, anorganický prach, mŕtve biotické zložky a iné (Cox a Wathes, 1995).

Inhalácia vzdušných mikroorganizmov v pracovnom prostredí je spojené so širokou škálou zdraviu škodlivých pôsobení, ako sú infekčné ochorenia (tuberkulóza, legionárska choroba, brucelóza, tuberkulóza, Q-horúčka, slintačka a krívačka a iné), akútne toxické pôsobenie (farmárske pľúca, syndróm chorých budov, toxický prašný orgánový syndróm a vlhkosťná horúčka a iné), alergie, karcinogénne ochorenia a iné (Michels, 2001).

Vážnou hrozbou pre zdravie ľudí je vznik rezistencie u patogénov spôsobujúcich zoonózy. V poľnohospodárstve a v humánnej medicíne je používaných mnoho podobných alebo rovnakých liekov, čo by pri vzniku rezistencie mohlo viesť k ochoreniam s možnými vážnymi následkami (McEwen a Fedorka-Cray, 2002)

## MATERIÁL A METODIKA

Na meranie bioaerosólu bol v pokuse použitý prístroj MAS-100 *Eco*. Je to vysokovýkonný prístroj, využívajúci princíp Andersenovho aeroskopu, ktorý nasáva vzduch cez perforovanú platničku. Prúd vzduchu s časticami je nasmerovaný na štandardnú Petriho misku s Ø 90 mm, obsahujúcu agar. Po expozícii sa platne dali inkubovať. Endoagar, mäsopeptónový agar pri teplote 37°C počas 24 hodín a saboraaudov agar pri izbovej teplote počas 4 dní. Po uplynutí doby inkubácie boli odčítané porastené kolónie, následne upravené pomocou korekčných tabuliek a prepočítané na m<sup>3</sup>.

Citlivosť (MIC- minimálna inhibičná koncentrácia) bolo determinovaná kolorimetrickou mikrodilučnou metódou podľa CLSI príručky, s použitím ampicillinu, ampicillinu a sulbactamu, ceftiofuru, ceftriaxonu, ceftazidimu, ceftazidimu a kyseliny klavulánovej,

apramycinu, gentamicinu, streptomycinu, neomycinu, spectinomycinu, kyseliny nalidixinovej, enrofloxacinu, ciprofloxacinu, chloramfenikolu, florfenikolu, tetracyklínu a cotrimoxazolu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V pokuse sme zisťovali koncentrácie mikroorganizmov v prostredí čistiarne odpadových vôd počas celého roka. Výsledky boli dané do súvislosti s relatívnou vlhkosťou vzduchu, teplotou prostredia a hodnotili sme vplyv týchto fyzikálnych ukazovateľov a sezónnych vplyvov na hladinu vzdušného bioaerosólu.

Výsledky zistené počas leta boli značne zvýšené oproti zimnému obdobiu, čo súvisí so zvýšenou hodnotou teploty a znížením relatívnej vlhkosti (tab.1).

Podmienky prostredia významne ovplyvňujú koncentráciu mikroorganizmov v ovzduší čistiarne. Podľa Handleyho a Webstera (1995) na prežívanie mikroorganizmov vo vzduchu vplývajú hlavne faktory ako teplota, relatívna vlhkosť, prúdenie vzduchu, ročné obdobie, časť dňa, slnečné žiarenie, veľkosť častíc a iné

Najväčšia koncentrácia mikroorganizmov bola v prvej fáze čistenia odpadových vôd, čiže pri hrubom predčistení na hradliciach, pri Parshalovom mernom žľabe a pri jemnom predčistení na lapačoch piesku a na sitách.

Zvýšená vlhkosť vzduchu (v dôsledku zvýšenej aerácie, miešania a špliechania) a dostatok organických látok vo vode predstavujú ideálne podmienky pre prežívanie mikroorganizmov v bioaerosóle v tomto prostredí.

Tab.1 Koncentrácia mikroorganizmov v bioaerosóle v čistiarni odpadových vôd

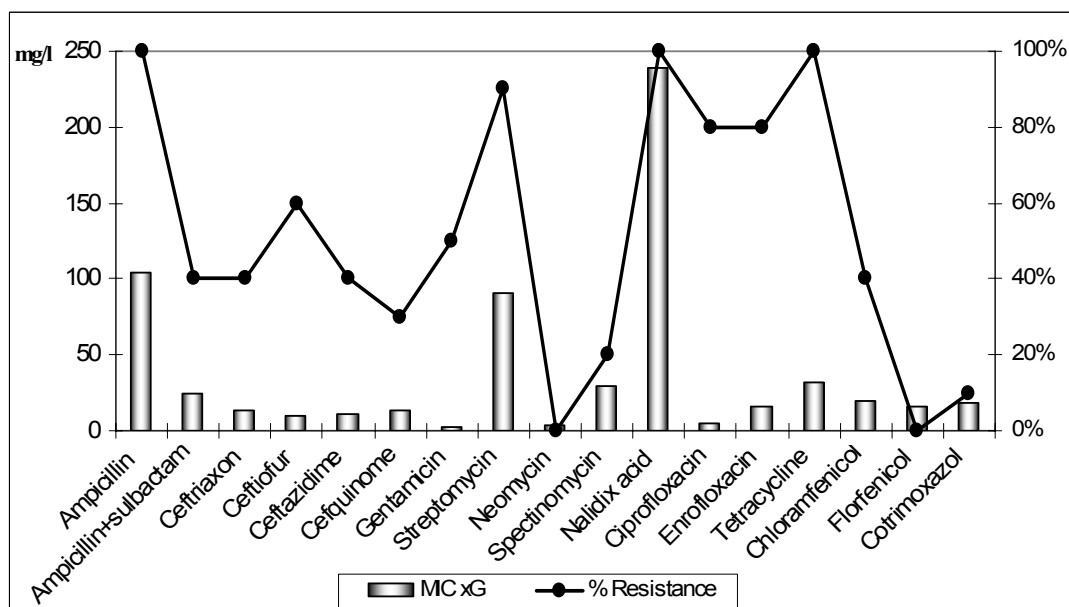
MIESTA MERANIA	Prítok	Hrubé predčistenie (von)	Hrubé predčistenie (dnu)	Parshalov merný žľab	Lapač piesku	Sediment. nádrž	Odvodňovanie kalov
<b>JARNÉ MERANIE</b>							
Teplota	11.5°C	11°C	14°C	13.8°C	11°C	11.6°C	14.6°C
Relatívna vlhkosť	54%	56.90%	47.70%	57.40%	61.70%	56.70%	49%
CPM (KTJ /m <sup>3</sup> )	2.15·10 <sup>3</sup>	2.6·10 <sup>3</sup>	5.15·10 <sup>3</sup>	3.35·10 <sup>3</sup>	3.95·10 <sup>3</sup>	1.0·10 <sup>3</sup>	0.85·10 <sup>3</sup>
KB (KTJ /m <sup>3</sup> )	1.65·10 <sup>3</sup>	0.2·10 <sup>3</sup>	5.5·10 <sup>3</sup>	1.0·10 <sup>3</sup>	9.8·10 <sup>3</sup>	0	0
Plesne (KTJ /m <sup>3</sup> )	0.6·10 <sup>3</sup>	0.8·10 <sup>3</sup>	1.8·10 <sup>3</sup>	3.7·10 <sup>3</sup>	2.9·10 <sup>3</sup>	0.8·10 <sup>3</sup>	0.7·10 <sup>3</sup>
<b>LERTNÉ MERANIE</b>							
Teplota	26°C	26.5°C	25°C	26.5°C	24.4°C	27.2°C	25.6°C
Relatívna vlhkosť	40%	45%	43%	45%	45.90%	44.50%	45.60%
CPM (KTJ /m <sup>3</sup> )	5.35·10 <sup>3</sup>	4·10 <sup>3</sup>	13.7·10 <sup>3</sup>	6·10 <sup>3</sup>	87.5·10 <sup>3</sup>	2.5·10 <sup>3</sup>	8.5·10 <sup>3</sup>
KB (KTJ /m <sup>3</sup> )	0.45·10 <sup>3</sup>	0	0.8·10 <sup>3</sup>	3.5·10 <sup>3</sup>	17.83·10 <sup>3</sup>	0	0.5·10 <sup>3</sup>
Plesne (KTJ /m <sup>3</sup> )	34.5·10 <sup>3</sup>	30.7·10 <sup>3</sup>	17.8·10 <sup>3</sup>	44·10 <sup>3</sup>	52·10 <sup>3</sup>	34.1·10 <sup>3</sup>	50·10 <sup>3</sup>
<b>JESENNÉ MERANIE</b>							
Teplota	12.5°C	9.8°C	9.5°C	13.8°C	13.3°C	11.9°C	14.5°C
Relatívna vlhkosť	59%	61.50%	56.60%	63.40%	64.10%	57.10%	52%
CPM (KTJ /m <sup>3</sup> )	2.15·10 <sup>3</sup>	2.6·10 <sup>3</sup>	5.15·10 <sup>3</sup>	3.35·10 <sup>3</sup>	3.95·10 <sup>3</sup>	1.0·10 <sup>3</sup>	0.85·10 <sup>3</sup>
KB (KTJ /m <sup>3</sup> )	1.65·10 <sup>3</sup>	0.2·10 <sup>3</sup>	5.5·10 <sup>3</sup>	1.0·10 <sup>3</sup>	9.8·10 <sup>3</sup>	0	0
Plesne (KTJ /m <sup>3</sup> )	0.6·10 <sup>3</sup>	0.8·10 <sup>3</sup>	1.8·10 <sup>3</sup>	3.7·10 <sup>3</sup>	2.9·10 <sup>3</sup>	0.8·10 <sup>3</sup>	0.7·10 <sup>3</sup>
<b>ZIMNÉ MERANIE</b>							
Teplota	0.9°C	0.3°C	3.5°C	1.0°C	0.3°C	1.6°C	3.5°C
Relatívna vlhkosť	68.20%	71.50%	73.70%	71.90%	80.50%	69.70%	76.90%
CPM (KTJ /m <sup>3</sup> )	0.72·10 <sup>3</sup>	1.4·10 <sup>3</sup>	7.7·10 <sup>3</sup>	3.6·10 <sup>3</sup>	12.3·10 <sup>3</sup>	0.65·10 <sup>3</sup>	1.2·10 <sup>3</sup>
KB (KTJ /m <sup>3</sup> )	0.23·10 <sup>3</sup>	0	2.3·10 <sup>3</sup>	3.3·10 <sup>3</sup>	7.1·10 <sup>3</sup>	0.1·10 <sup>3</sup>	0.1·10 <sup>3</sup>
Plesne (KTJ /m <sup>3</sup> )	0.3·10 <sup>3</sup>	0.1·10 <sup>3</sup>	0	0.2·10 <sup>3</sup>	0	0.2·10 <sup>3</sup>	0.2·10 <sup>3</sup>

Pri sedimentačných, aktivačných nádržiach a pri odvodňovaní kalov boli hodnoty mikroorganizmov nižšie, čo súvisí s ich predchádzajúcim spracovaním odpadových vôd. Merania vo vonkajšom prostredí môžu podstatne ovplyvniť aj poveternostné podmienky.

Oplinger (2005) zistil, že sa iba plesne vyskytujú vo vyššej koncentrácii v lete, ich koncentrácia bola približne osemkrát vyššia ako v zime. Tvrdil, že koncentrácia celkových počtov Gram-negatívnych baktérií a vzdušných endotoxínov bola nesignifikantne ovplyvnená klimatickými faktormi. Klimatické faktory ovplyvňujú signifikantne iba koncentráciu vzdušných plesní. Prežívanie baktérií môže byť spojené s teplotou, vystavením UV lúčom, ochrane zo strany pevných častíc a od prúdenia.

V miestach s vyššou koncentraciou mikroorganizmov (Parshalov merný žlab, lapač piesku) boli zistené antibiotiko rezistentné *E.coli* (Graf 1), a taktiež antibiotiko rezistentná *Escherichia coli* s CTX-M1 betalaktamázou.

Graf 1 Hodnota mikroinhibičnej koncentrácie a percento rezistencie u *E. Coli* z čistiarne odpadových vôd



Schroeder a kolektív (2002) testovali 752 ľudských a zvieracích izolátov *E.coli* na rezistenciu k niektorým antibiotikám. Približne polovica z nich bola rezistentných k jednému alebo viacerým antibiotikám vrátane penicilínu, sulfonamidu, cephalosporínu, tetracyclínu a aminoglykozidu.

V pracovnom prostredí čistiarne odpadových vôd je koncentrácia vzdušných mikroorganizmov ovplyvnená procesmi čistenia, pri ktorých dochádza k aerácii, premiestňovaniu, tvorbe bublín a špliechaniu vody (Michels, 2001).

V uzavretých priestoroch čistiarne odpadových vôd so zvýšenou hladinou bioaerosólu a nedostatočnou výmenou vzduchu je potenciálne vyššie riziko ohrozenia zdravia pracovníkov (Seltzer, 1994).

Rezistentné mikroorganizmy vyskytujúce sa v bioaerosóle v prostredí čistiarní odpadových vôd, môžu znamenať nebezpečenstvo poškodenia zdravia v dôsledku dlhotrvajúcich a vážnych ochorení s možnosťou následného zlyhania liečby (Travers and Barza, 2002).

Bolo zistené, že pracovníci čistiarní majú zvýšený výskyt ochorení priamo súvisiacich s pobytom v prostredí s vysokou koncentraciou mikroorganizmov vo vzduchu, z toho

vyplýva, že čistiarne odpadových vôd predstavujú možnú hrozbu pre osoby, ktoré v nich pracujú, ako aj pre ich blízke okolie (Rogers and Haines, 2005).

#### POĎAKOVANIE

Práca vznikla za finančnej podpory grantu APVV-0028-07 a VEGA-0012-08.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Brandi, G., Sisti, M. and Amagliani, G. (2000) Evaluation of the environmental impact of microbial aerosols generated by wastewater treatment plants utilising different aeration systems. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 845-852.
- Cox, C.S. – Wathes, C.M.: *Bioaerosols Handbook*. Lewis Publishers. CRC Press LLC. Boca Raton, USA, 1995, p. 621.
- Handley, B.A., Webster, A.J.F. (1995) Some factors affecting the airborne survival of bacteria outdoors. *Journal of Applied bacteriology*. 79: 368-378.
- McEwen, S.A. and P.J. Fedorka-Cray (2002) Antimicrobial use and resistance in animals, In: *The need to Improve Antimicrobial Use in Agriculture: Ecological and Human Health Consequences*, M. Barza and S.L. Gorbach (Eds.), *Clin. Infect. Dis.* 34(S3):S93-S106.
- Melbostad, E., Eduard, W., Skogstad, A., Sandven, P., Lassen, J., Sostrand, P., Heldal, K. Exposure to bacterial aerosols and work-related symptoms in sewage workers. *American Journal of Industrial Medicine*, 1994, 25: 59-63.
- Michels, CH.D.: *Bioaerosol Levels at Feedlots and an Indoor Wastewater Treatment Headworks*, A Thesis Submitted to the Faculty of graduate studies in partial fulfillment of the requirements of the degree of master of science department of civil engineering Calgary, Alberta, 2001.
- Ondrašovič, M., Para, L., Ondrašovičová, O., Vargová, M., Kočíšová, A.: *Veterinárna starostlivosť o životné prostredie*, Košice, 1996, s. 15-21.
- Oppliger, A., Hilfiker, S., Vu Duc, T.: Influence of Seasons and Sampling Strategy on Assessment of Bioaerosols in Sewage Treatment Plants in Switzerland *Ann. occup. Hyg.*, Vol. 49, No. 5, pp. 393–400, 2005
- Seltzer J.: Biological contaminants, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1994, 94, (2): 318-326.
- Schroeder, C. M., C. Zhao, C. DebRoy, J. Torcolini, S. Zhao, D.G. White, D.D. Wagner, P.F. McDermott, P.D. Walker, and J. Meng (2002) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 576-581.
- Stampi, S., Zannetti, F., Crestani, A., Deluca, G.: Occurrence and seasonal variation of airborne gram negative bacteria in a sewage treatment plant. *Microbiologica*, 2000, 23, pp. 97-104.
- Travers, K a Barza, M. Morbidity of infections caused by antimicrobial-resistant bacteria, In: *The need to Improve Antimicrobial Use in Agriculture: Ecological and Human Health Consequences*, M Barza and SL Gorbach (Eds.), *Clin. Infect. Dis.*, 2002, 34(S3):S131-S134.

## RÁDIOGRAFICKÉ URČENIE VEĽKOSTI SRDCA PLANIMETRICKOU METÓDOU VYUŽÍVAJÚCOU VNÚTORNÉ POMERY HRUDNÍKA

Grünermelová L., Ševčík A., Páleník L.

*Klinika malých zvierat , UVLF, Košice*

### ABSTRAKT

Rádiograficky vieme stanoviť veľkosť srdca odhadom na základe skúseností, orientačne podľa počtu interkostálnych priestorov, ktoré zaberá srdce, alebo presne metódou merania VHS (Vertebral heart score). VHS metóda je založená na meraní veľkosti srdca, ktorú prirovnáva k thorakálnym stavcov a je vyjadrená číselne vo vertebrálnych jednotkách(v). Cieľom práce bolo porovnať tri spôsoby merania VHS a určiť možnosti všeobecného použitia VHS metód aj pre nešpecializovaných rádiológov (študent 5.r.,1r., a doktorand UVLF). Pri štatistickom vyhodnotení troch VHS metód jednocesnou Anovou testom podľa Tuckeyho sme zistili, že rozdiel medzi nimi nie je štatisticky významný ( $p < 0,05$ ). Z výsledkov vyplýva, že všetky tri metódy sú rovnocenné a je len na rozhodnutí lekára ktorú z nich si vyberie. Porovnaním výsledkov troch študentov s rôznymi skúsenosťami v oblasti rádiológie sme dospeli k záveru, že tieto metódy sú univerzálne použiteľné a nezávislé na praktických skúsenostiach hodnotiteľa. V dnešnej dobe sa stanovenie VHS rutinne vykonáva u každého kardiologického pacienta na Klinike malých zvierat UVLF, kvôli jeho jednoduchosti na prevedenie a interpretácii. Často krát nahrádza slovný popis, výstižnejšie a presnejšie vyjadruje progresiu prebiehajúceho ochorenia pri násobných vyšetreniach. Ďalším výskumom sa budeme zaoberať koreláciou medzi RTG a USG vyšetrením srdca a mekkých tkanív.

### ÚVOD

Rádiografický vzhľad hrudníka malých zvierat sa líši v závislosti od polohy, respiračnej fázy, plemennej príslušnosti a telesnej kondície. Od roku 1968 kedy bolo stanovené pravidlo, že veľkosť srdca by nemala byť väčšia ako 2,5 – 3,5 interkostálneho priestoru, prešla rádiológia prudkým vývojom. Vertebral Heart Size (vertebrálny index veľkosti srdca) predstavuje metódu, ktorá zohľadňuje rôznu konformáciu hrudníka plemien psov, používa presné body merania, ktoré sú anatomicky odôvodniteľné a je jednoduchou pre použitie a interpretáciu(BAVEGEMS,2005). Vertebral heart size /score /scale /system /sum je rôznymi autormi jednotne označované skratkou VHS. VHS predstavuje číselné vyjadrenie porovnania veľkosti kardiálnej siluety s veľkosťou a počtom hrudných stavcov na latero-laterálnom rádiograme a meria sa vo vertebrálnych jednotkách (v). Vo všeobecnosti fyziologickým rozmedzím pre väčšinu plemien psov predstavuje: 9,7 +/- 0,5v (8,7-10,7) a pre mačky 7,5 +/- 0,3v (6,9-8,1). Cieľom práce bolo porovnať tri spôsoby merania VHS a určiť možnosti všeobecného použitia VHS metód aj pre nešpecializovaných rádiológov (študent 5.r.,1r., a doktorand UVLF).

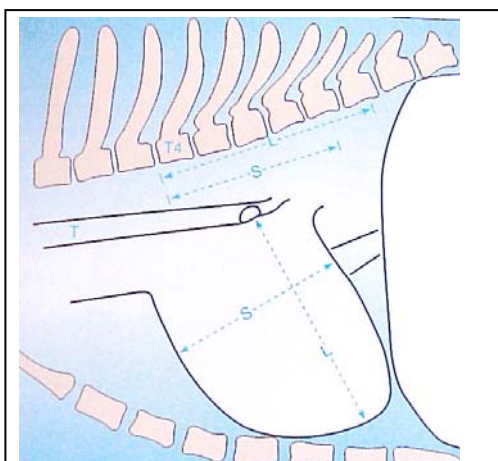
### MATERIÁL A METODIKA

Táto štúdia bola prevedená retrospektívne a príbežnou analýzou rádiogramov zvierat vyšetovaných na Klinike malých zvierat UVLF. Získané boli pravé alebo ľavé laterálne, dorzoventrálne alebo ventrodorzálne rádiogramy od 190 zvierat. Z toho 17 mačiek (7 ♀, 10 ♂) a 173 psov (76 ♀, 97 ♂), ktoré vykazovali akútne či chronické dýchacie ťažkosti, intoleranciu záťaže, boli po traume alebo pre operačne na vylúčenie metastáz. Na vyhodnotenie boli použité len rádiogramy vysokej kvality a bez evidencie rotácie tela zvierat'a. Z tohto súboru sme pre nečitateľnosť kardiálnej siluety spôsobenej efúziou hrudníka, rozsiahlymi metastázami, alebo chybnými projekciami vylúčili 21 rádiogramov. Spôsob merania srdca sme uskutočnili tromi spôsobmi.

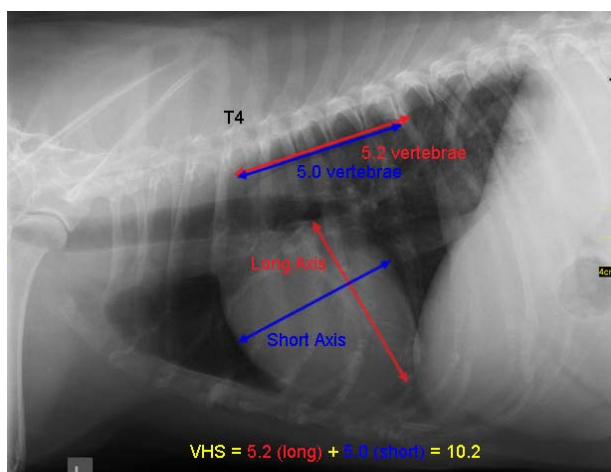


### 1. spôsob merania veľkosti srdca (VHS<sub>1</sub>)

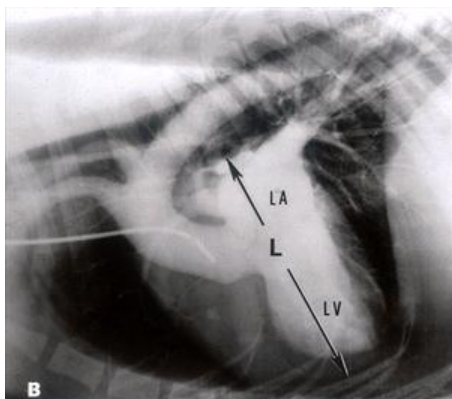
Priložíme kancelársky papier A4 na latero-laterálny rádiogram hrudníka tak, aby smeroval od ľavého hlavného bronchu po najdialšiu kontúru apexu srdca. Nameraná vzdialenosť predstavuje dlhú os srdca (LA- long axis) (obr.1,2). Krátku os srdca (SA- short axis) meriame v najširšom mieste strednej tretiny srdca a kolmo na LA. Dlhá os srdca prechádza ľavou predsieňou a komorou, kým krátka os srdca prebieha pravou a ľavou predsieňou (Obr.2,3). Rovnako ako dlhú, tak aj krátku os srdca preniesieme nad hrudné stavce začínajúc kranialným okrajom Th<sub>4</sub>. V prípade, že označenie kaudálnej vzdialenosti neprekrýva celý stavec, odhadneme túto vzdialenosť s presnosťou 0,1 vertebrálnej jednotky (v). Obidve získané číselné hodnoty (pre krátku a dlhú os srdca) sčítame, čím dostaneme hodnotu veľkosti srdca vo v (BUCHANAN, BUCHELER, 1995).



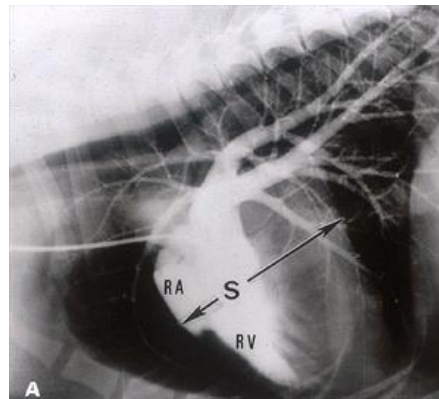
Obr.1 Schéma merania VHS



Obr.2 Meranie VHS na rádiograme



Obr.2 Dlhá os srdca (ľavá predsieň a komora)



Obr.3 Krátka os srdca (pravá a ľavá predsieň)

### 2. spôsob merania veľkosti srdca (VHS<sub>2</sub>)

Dlhú a krátku os srdca meriame rovnakým spôsobom ako to bolo popísané v spôsobe 1., ale s tým rozdielom, že na meranie vzdialeností sme na miesto papiera použili pravítko. Tak sme získali namerané hodnoty pre LA a SA v mm. Každú z týchto hodnôt sme vydělili dĺžkou (od kranialného okraja Th<sub>4</sub> po kaudálny okraj medzistavcového disku) Th<sub>4</sub> stavca v mm. Súčet týchto hodnôt nám udáva veľkosť srdca vo v (SPASOJEVIĆ A KOL., 2007).

### 3. spôsob merania veľkosti srdca (VHS<sub>3</sub>)

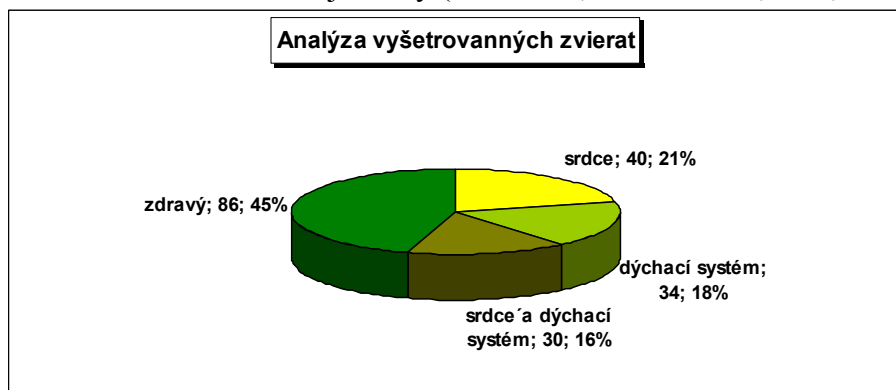
Rozdiel medzi druhou a treťou metódou je v tom, že krátka os srdca má iné referenčné body merania. Krátka os srdca je, meraná medzi dorzálnym a ventrálным ohraničením šírky vena cava caudalis. Dodržiavame pravidlo kolmosti na LA. LA a SA nameriame v mm, vydělíme dĺžkou Th<sub>4</sub> stavca a sčítame, čím získame hodnotu VHS vo v (SPASOJEVIĆ A KOL., 2007).

## Štatistické vyhodnotenie

Údaje boli štatisticky vyhodnotené jednocestnou ANOVOU testom podľa Tuckeyho.

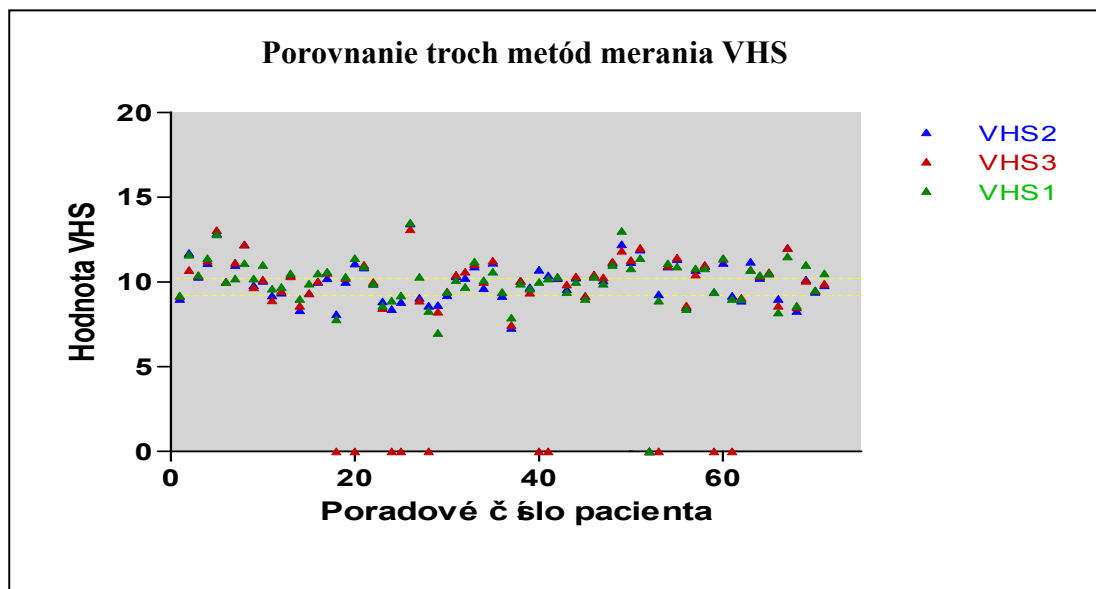
### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Thorakálna rádiografia je jednou z najdostupnejších metód hodnotenia srdca a pľúc pre veterinárnych lekárov. Avšak problémy s interpretáciou stále existujú pri stanovení zmien veľkosti a tvaru kardiálnej siluety (DENNYS,HERRTAGE,1995, DARK A KOL.,1996)



**Graf.1** zobrazuje percentuálne a číselné vyjadrenie chorobnosti zvierat

Analyzovali sme rádiogramy 190 vyšetrovaných psov a mačiek. Rádiogramy hrudníka boli vykonané kvôli akútnym či chronickým dýchacím ťažkostiam, intolerancii záťaže, pre operačne na vylúčenie metastáz a po traume. 86(45%) prípadov tvorili zvieratá bez patologického procesu prebiehajúceho v dutine hrudnej. (Jednotlivé diagnózy boli stanovené po komplexnom vyšetrení zvierat nie len na základe RTG). 34(18%) pacientov trpelo ochorením respiračného aparátu, 40(21%) kardiologickými poruchami a 30(16%) aj kardiologickými aj respiračnými.



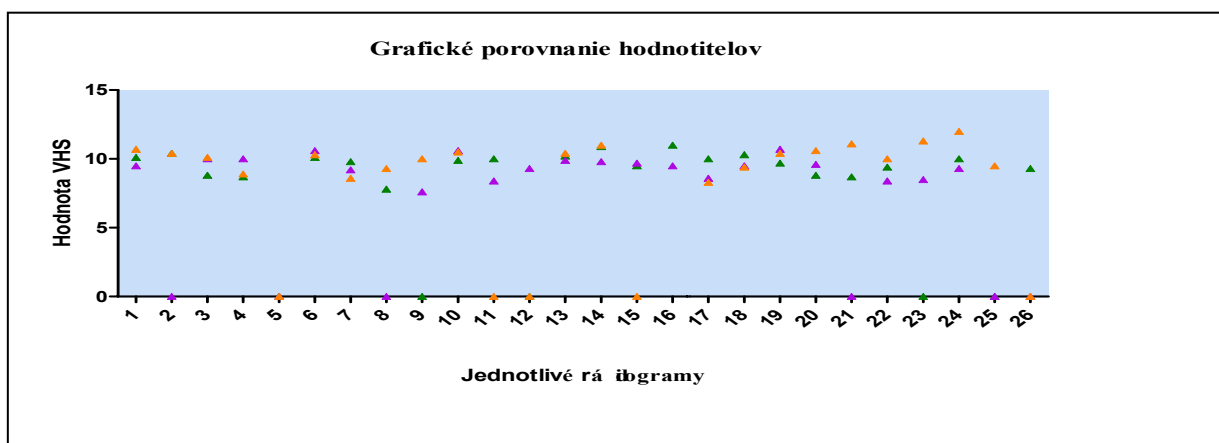
**Graf 2.** Porovnanie troch metód VHS zvolenej vzorky zvierat

Pri štatistickom vyhodnotení nameraných veličín VHS tromi rôznymi metódami sme zistili, že rozdiel medzi nimi nie je štatisticky významný( $p < 0,05$ ). Z výsledkov vyplýva, že všetky tri metódy sú rovnocenné a je len na rozhodnutí lekára ktorú z nich si vyberie.

Z pedagogického pozorovania sme dospeli k záveru, že študenti istejšie vyjadrovali svoj názor ohľadne veľkosti srdca po prevedenom meraní VHS ako bez neho. Na základe tohto pozorovania usudzujeme, že meranie VHS slúži ako pomôcka pre nešpecializovaných

kardiológov na zistenie rádiografickej veľkosti srdca. Rádiológovia špecialisti zvyčajne vedia zhodnotiť veľkosť srdca empiricky, ale aj oni využívajú VHS práve v hraničných prípadoch (BUCHANAN, BUCHELER, 1997). Na UVLF sa vykonáva VHS rutinne u všetkých kardiologických pacientoch. VHS metódy sú vhodné na spresnenie rádiografickej diagnózy kardiálneho ochorenia. Naša štúdia potvrdzuje aj názor Hansona (HANSON A KOL., 2005), že táto metóda je nezávislá na praktických skúsenostiach hodnotiteľa.

**Graf.3** Porovnanie hodnotiteľov (študent 5. ročníka UVLF-fialová, a 1. ročníka UVLF-oranžová a doktorand UVLF-zelená)



Štatistickým porovnaním výsledkov ( $p < 0,05$ ) troch študentov s rôznymi skúsenosťami v oblasti rádiológie sme dospeli k záveru, že tieto metódy sú nenáročné na čas a prevedenie, nezávislé na praktických skúsenostiach a univerzálne použiteľné, graf 3.

Kardiomegália je jedným z pomocných ukazovateľov pri diagnostike kardiálneho ochorenia (hypertrofická alebo dilatčná kardiomyopatia). Vždy sa odporúča porovnanie rádiogramu chorých psov s rádiogramami zdravých psov presne toho istého plemena a veľkosti, čo však v praxi nie je vždy možné (GULANBER, 2005). Priemerný vek zvierat pri diagnostikovaní kardiomegálie sa pohyboval od 2 rokov do 16 s priemerom 9,5 roku. Dá sa predpokladať, že kardiomegália je zväčša diagnostikovaná po prvýkrát u zvierat v strednom veku.

Poradie	Plemeno
1.	Kríženec stredných plemien
2.	Kokeršpaniel
3.	Pudiel
4.	Yorkšírsky teriér
5.	Maltéz, Labrador, Čivava
6.	Kavalier kingcharles španiel, Rhodézky ridbek
7.	Zlatý retriever, Bradáč, PPP, Jazvečík, Rotweiler

**Tab.1** zobrazuje najčastejšie postihnuté plemená Kardiomegáliou. Častosť výskytu daného symptómu u určitého plemena je ovplyvnená obľúbenosťou v danom kraji a výsekom vzorky zvierat z palety veterinárnych lekárov v Košiciach.

V dnešnej dobe sa stanovenie VHS rutinne vykonáva u každého kardiologického pacienta na Klinike malých zvierat UVLF, kvôli jeho jednoduchosti na prevedenie a interpretácii. Často krát nahrádza slovný popis, výstižnejšie a presnejšie vyjadruje progresiu prebiehajúceho ochorenia pri násobných vyšetreniach, ale stále je potrebný popis relatívnych veľkostných pomerov jednotlivých odielov srdca a veľkých ciev.

## POĎAKOVANIE

Daná problematika bola riešená za podpory grantu 1/0800/10.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bavegems V., Caelenberg A., Duchateau L., Sys S., Bree H., Rick A. Vertebral heart size ranges specific for whippets. 2005;46:400-403
- Buchanan J.W., Bucheler J. Vertebral scale system to measure canine heart size in radiographs. JAVMA. 1995; 206(2):194-9
- Dark P., Bonagura J.D., Kelly D.F. Color atlas of veterinary cardiology. Mosby. 1996; 32-7
- Dennys R., Herrtage M., Manual of small animal diagnostic imaging, British small animal veterinary association, 1996; 51-6
- Gülanber E.G., Gönenci R., Kaya Ü., Akosoy Ö., Biricik H. S. Vertebral Scale System to Measure Heart Size in Thoracic Radiographs of Turkish Sheperd Dogs, Turk J Vet Anim Sci, č. 2005, 29:723-726
- Hansson K., Haggstorm J., Kvart C., Lord P. Interobserver variability of vertebral heart size measurement in dogs with normal and enlarged hearts. Veterinary Radiology and ultrasound. 2005;46:122-130
- Spasojevič K. L., Krstic N., Trailovic R.D. Comparison of three methods of measuring vertebral heart size in german shepherd dogs, Acta Veterinaria, 2007;2-3:133-141

## **NIČENIE HRABOŠA POĽNÉHO A JEHO DOPAD NA VEREJNÉ ZDRAVIE**

Harkabus J., Hromada R., Ondrášovič M., Ondrášovičová O., Sasáková N.

*Katedra životného prostredia, veterinárskej legislatívy a ekonomiky, UVLF, Košice*

### **ABSTRAKT**

V práci bol sledovaný vznik reziduí antikoagulačných rodenticídov po ich aplikácii na pôdu. Najvyšší obsah reziduí vo všetkých sledovaných komoditách bol zaznamenaný po použití prípravku KUMATOX G s účinnou látkou warfarín, pričom najvyšší obsah reziduí bol v pšenici a naopak najnižší bol v repke. Na základe prepočtu ADI (Acceptable Daily Intakepre) v porovnaní so zistenými množstvami reziduí sa zistilo, že u brodifacoumu sa rovnala 400- 966 násobnému prekročeniu tejto dávky a u bromadiolonu sa rovnala 92- 250 násobnému prekročeniu tejto dávky.

### **ÚVOD**

Využívanie pesticídov je súčasťou tvorby a ochrany životného prostredia. Ich použitie však musí byť cielené, aby sa nenarušila biologická rovnováha ekosystému a cestou potravinového reťazca sa neohrozilo zdravie človeka a zvierat (Ondrášovič a kol., 1996).

V práci boli testované rodenticídne prípravky KUMATOX G s účinnou látkou warfarín, BRODER G s účinnou látkou brodifacoum a DERATION G s účinnou látkou bromadiolon. Sledované boli reziduá daných rodenticídov v obilninách, ale aj kukurici a repke. Zo získaných výsledkov bola prepočítaná akceptovateľná denná dávka (ADI, Acceptable Daily Intakepre) (Zapletal a kol., 2001) pre 60kg človeka.

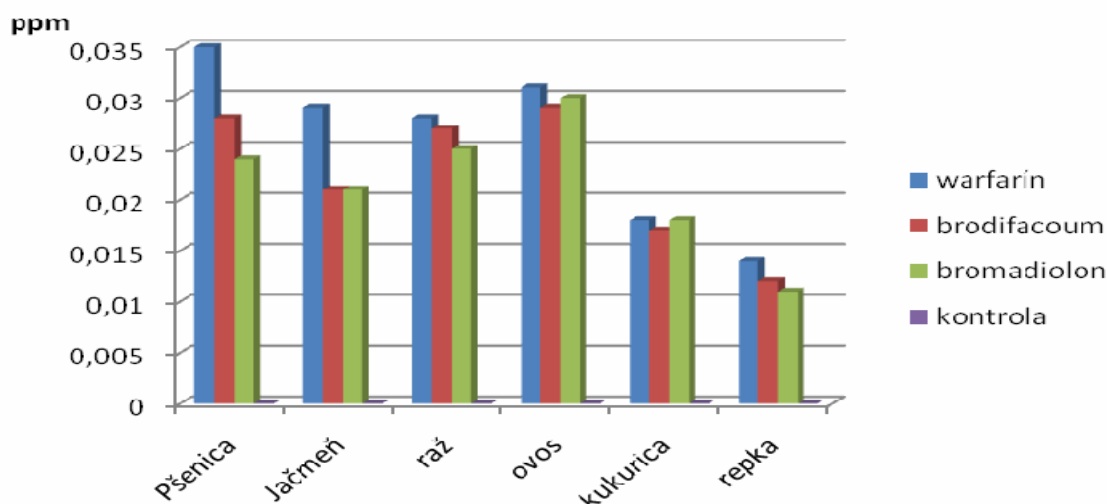
### **MATERIÁL A METODIKA**

Nástrahy boli aplikované do nádoby s pôdou o rozmere 1x1x0,5 m a nasledovne zapravené do pôdy pri výseve na poľnohospodárske plodiny v množstve 100g/m<sup>2</sup>. Žiadne iné agrotechnické zásahy neboli vykonané počas celého vegetačného obdobia. V období zberu boli ručne odobraté vzorky celých nadzemných častí rastlín. Zároveň bola vykonaná výsadba kontroly bez aplikácie rodenticídov. Samotné stanovenie reziduí bolo vykonané pomocou HPLC chromatografickej analýzy. Výsledky boli následne porovnané s hodnotami ADI pre človeka.

### **VÝSLEDKY A DISKUSIA**

V grafe 1 sú graficky znázornené množstvá reziduí antikoagulačných rodenticídov v obilninách, ako aj kukurici, repke a porovnanie s kontrolou. Poukazuje na reziduá po aplikácii 100g/1m<sup>2</sup>. Najnižší obsah antikoagulačných rodenticídov spomedzi všetkých komodít bol zistený v repke, zatiaľ čo ovos vykazoval ich najvyššie hodnoty.

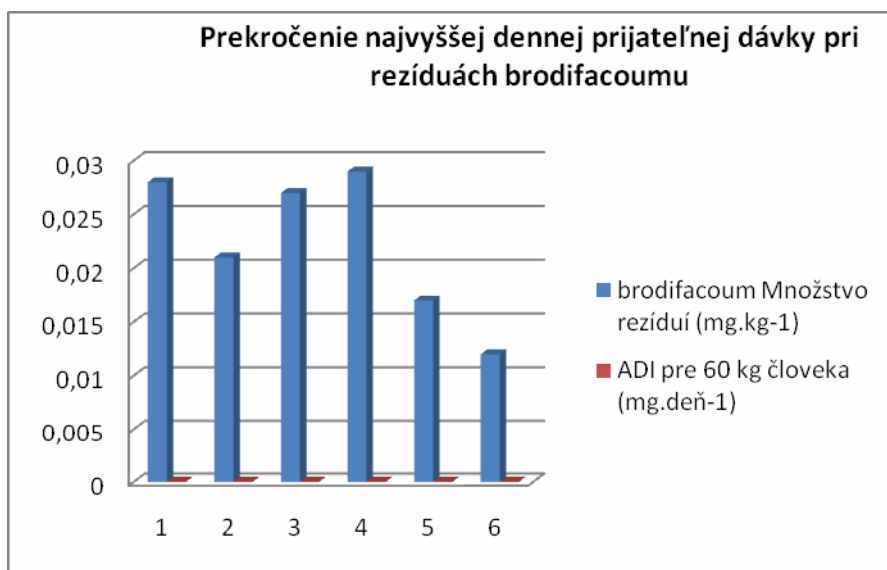
### Rezíduá rodenticídov v rastlinách po aplikácii 100g/1m<sup>2</sup>



Graf 1.

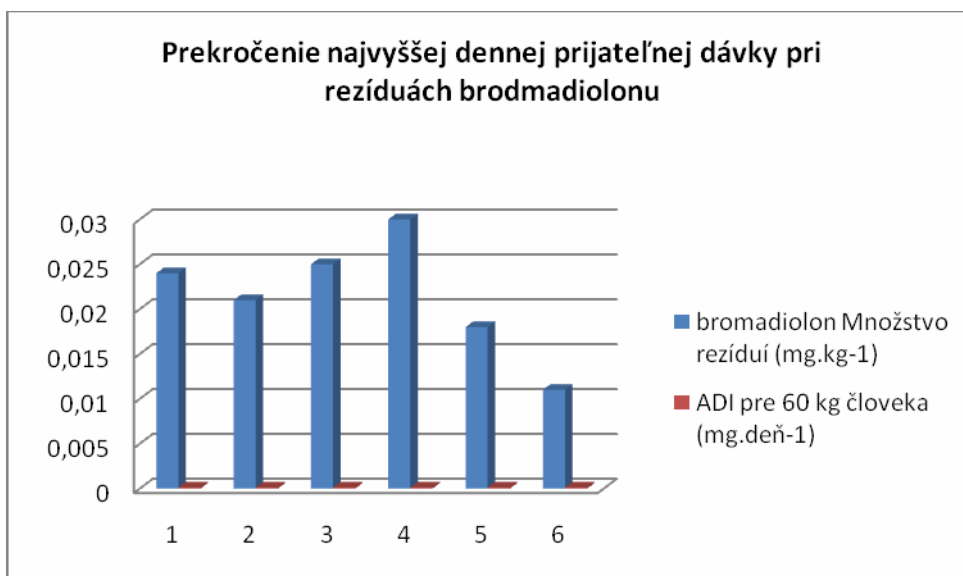
Po aplikácii prípravku KUMATOX G sa zistili najvyššie rezíduá spomedzi všetkých použitých antikoagulačných rodenticídov. Najvyššie koncentrácie warfarínu boli detekované v pšenici na úrovni 0,035ppm. V ostatných komoditách boli zistené nasledovné hodnoty, a to v jačmeni 0,029 ppm, v raži 0,028ppm, v ovse 0,031ppm, v kukurici 0,018 a repke 0,014 ppm. Najnižší obsah antikoagulačných rodenticídov spomedzi všetkých komodít bol zistený v repke.

V grafe číslo 2 sú vyhodnotenia množstva reziduí brodifacoumu z prípravku BRODER G v 1.pšenici, 2.jačmeni, 3.raži, 4.ovsi, 5.kukurici a 6.repke v porovnaní s ADI (Acceptable Daily Intake) 60kg človeka po aplikácii 100g/1m<sup>2</sup> prípravku rodenticídu. Najvyššie hodnoty boli zistené v ovsi (0,029ppm) a pšenici (0,028ppm), zatiaľ čo najnižšie hodnoty boli zistené v repke (0,012 ppm). Hodnota ADI pre Brodifacoum je 0.0000005mg/kg/deň. ([http://www.rentokil-initial.com/files/54839Brod\\_Paste\\_AUS.pdf](http://www.rentokil-initial.com/files/54839Brod_Paste_AUS.pdf)). Pri prepočte najvyššej dennej prijateľnej dávky pre 60kg človeka došlo v meraných komoditách k 400- 966 násobnému prekročeniu tejto dávky.



Graf 2.

V grafe číslo 3 sú vyhodnotenia množstva reziduí bromadiolonu z prípravku DERATION G v 1.pšenici, 2.jačmeni, 3.raži, 4.ovsi, 5.kukurici a 6.repke v porovnaní s ADI (Acceptable Daily Intake) pre 60kg človeka po aplikácii 100g/1m<sup>2</sup> prípravku rodenticídu. Po použití bromadiolonu boli najvyššie hodnoty reziduí spomedzi všetkých komodít zistené v ovsi (0,03ppm) a naopak najnižšie boli v repke (0,011 ppm). Hodnota ADI pre bromadiolon je 0.000002mg/kg/deň (<http://www.rentokilproducts.com.au/Downloads/2009UpdatedMSDS/Bromakil%20Super%20Rat%20Drink.pdf>). Pri prepočte najvyššej dennej prijateľnej dávky pre 60kg človeka došlo v meraných komoditách k 92- 250 násobnému prekročeniu tejto dávky.



Graf 3.

#### POĎAKOVANIE

Práca bola vykonaná s podporou projektu VEGA reg. číslo projektu 1/0312/10 s názvom asanácia životného prostredia pri tvorbe a ochrane verejného zdravia, riziká spojené s rezistenciou na dezinfekčné prostriedky a rezíduami deratizačných prostriedkov.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

[http://www.rentokil-initial.com/files/54839Brod\\_Paste\\_AUS.pdf](http://www.rentokil-initial.com/files/54839Brod_Paste_AUS.pdf)

<http://www.rentokilproducts.com.au/Downloads/2009UpdatedMSDS/Bromakil%20Super%20Rat%20Drink.pdf>

Ondrášovic M, Para Ľ, Ondrášovičová O, Vargová M, Kočišová A. Veterinárna starostlivosť o životné prostredie. DataHelp 1996 Košice,109.

Zapletal O, Ruprich J, Dvořáková D, Nepejchalová L, Vránová E. Speciální veterinární toxikologie. Ediční středisko Veterinární a farmaceutické univerzity Bmo 2001; 133 148.

# TESTOVANIE FUNGICÍDNEJ ÚČINNOSTI VYBRANÝCH CHEMICKÝCH AGENSOV

Kaduková Jana, Laciaková Anna, Máté Dionýz

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach Katedra hygieny a technológie potravín

## ABSTRAKT

Testovaná bola antifugálna účinnosť vybraných 8 komerčne vyrábaných dezinfekčných prípravkov, a to Hviezda (novovyvíjaný viaczložkový prípravok na báze peroxidu vodíka) v koncentráciách 100%, 10%, 5%, 2%, Pedox (viaczložkový prípravok na báze kyseliny peroxyoctovej) v koncentráciách 3%, 2%, 1%, 0,5%. Od firmy Ecolab bol testovaný P3 - hypochloran, P3 -oxysan. Fungicídna účinnosť bola stanovená aj pre Topax 32 (3%), Topax 56 (3%), Topax 66 (2%), P3 Steril (2%). Z chemických látok sme sa zamerali na kyselinu kaprylovú, peroxid vodíka z ktorých po overení ich fungicídnej účinnosti boli vytvorené vzájomné kombinácie. Fungicídna účinnosť bola overovaná na *Aspergillus parasiticus*. Na základe dosiahnutých výsledkov suspenznou metódou môžeme konštatovať, že najúčinnější z testovaných prípravkov vo všetkých koncentráciách ako aj stanovených časových expozíciách (5, 15, 30 min.) sa javila Hviezda, Pedox. Dobrú fungicídnu účinnosť potvrdili aj vyššie spomínané komerčne vyrábané dezinfekčné prostriedky. Z chemických látok v zostupnom poradí bola najúčinnější kyselina kaprylová, peroxid vodíka. (Keywords: acids, disinfection, fungicidal)

## ÚVOD

Cieľom dezinfekcie je odstránenie mikroorganizmov z plochy, ktorá je v kontakte s potravinami, čím sa zabráni sekundárnej kontaminácii surovín a výrobkov. Vo väčšine prípadov nedostatočná fungicídna účinnosť je spôsobená nesprávnym dodržiavaním dezinfekčného procesu, a to v dôsledku ich nesprávneho použitia ako napr. koncentrácia, doba expozície. (Langsrud a kol., 2003). Fungicídny účinok dezinfekčného prostriedku vyjadruje aktivitu chemickej látky alebo zmesi látok, ktoré vedie k usmrteniu buniek mikroskopickej huby alebo bakteriálnej bunky (Štefkovičová a kol., 2007). Na mikroskopické vlákňité huby a ich spóry pôsobí dezinfekčný prípravok priamym kontaktom s povrchovými štruktúrami buniek, prienikom cez bunkovú stenu alebo membránu alebo reakciou s nukleovými kyselinami tzv. fungicídne, fungistatické pôsobenie (Melicherčíková, 2003). Cieľom našej práce bolo zistiť účinnosť nami vybraných chemických látok v postupne znižujúcich koncentráciách a vplyvu časovej expozície.

## MATERIÁL A METÓDY

### **Materiál:**

Použité dezinfekčné prostriedky:

- Pedox PAA/50:30 (na báze účinnej látky kyselina peroctová, 20% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Polychem, s.r.o.), bol pripravený na obsah účinnej látky v koncentráciách 3%, 2%, 1%, 0,5%,
- Hviezda (dezinfekčný prípravok vo vývoji, účinná zložka H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dvojitý prípravok pripravený podľa pokynov Laboratória Decomkovu s.r.o., pracovisko Hradec Králové) použité v koncentráciách 100%, 10%, 5%, 2%,
- kyselina kaprylová (20%, 15%, 8%, 5%),
- peroxid vodíka (30%, 15%, 8%, 5%).

Od firmy Ecolab bol testovaný:

- P3 - hypochloran s obsahom (chlornan sodný, hydroxid sodný),
- P3 - oxysan (kyselina octová, peroctová, oktánová, peroxyoktánová, peroxid vodíka).



Fungicídna účinnosť bola stanovená aj pre:

- Topax 32 (3%), (hydroxid sodný D-glukopyranóza, oligoméry, decyloktylglykozidy, Dekán-1-ol)
- Topax 56 (3%), (kyselina trihydrogénfosforečná 2- (2-butoxyetoxy)etanol)
- Topax 66 (2%), (chlórnan sodný, hydroxid sodný, N-alkyl-N,N-dimetylamíny, N-oxidy)
- P3 Steril (2%).

#### Metodiky:

Fungicídna účinnosť v laboratórnych podmienkach bola hodnotená na základe suspenzného testu a potvrdená vyočkováním na povrch Sabouraudovho žiného agaru. Na testovanie bol použitý štandardný kmeň plesní *Aspergillus parasiticus* (CCM F-108) získaný z Českej zbierky mikroorganizmov z Masarykovej univerzity v Brne. Pre suspenzný test bolo z testovaných dezinfekčných prostriedkov pripravených 25 ml rôznych riedení.

#### Suspenzný test:

Do skúmaviek sa napipetuje 0,1 ml 72 hod. plesňovej kultúry a pridá sa 9,9 ml pripravených roztokov. Po 5, 15, 30 minútových expozíciách sa prenieslo 0,1 ml z jednotlivých suspenzií do pripravených skúmaviek s 9,9 ml Sabouraudovho bujónu. Po ukončení sa inkubuje pri cca 22°C, 72 hodín. Fungicídna účinnosť bola vyhodnotená na základe zakalenosti bujónu. Na potvrdenie fungicídnej účinnosti boli jednotlivé riedenia a expozície vyočkovávané na povrch Petriho misky s Sabouraudovým živným agarom a inkubované pri teplote 22°C, 72 hodín.

#### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na čistenie a dezinfekciu v potravinárskej výrobe sa okrem klasických prípravkov ako sú lúhy a kyseliny stále viac používajú komerčne vyrábané dezinfekčné prostriedky, ktoré obsahujú viacero dezinfekčných účinných látok. Takéto kombinácie prípravkov by sa mali vyznačovať vyššou fungicídnu účinnosťou a súčasne veľmi nízkou toxicitou pre ľudí a zvieratá (Kašková, 2005).

Tab 1: Fungicídny účinok po testácií dezinfekčných prípravkov na *Aspergillus parasiticus*

Koncentrácia %	100%			10%			5%			3%			2%			1%			0,5%		
	5	15	30	5	15	30	5	15	30	5	15	30	5	15	30	5	15	30	5	15	30
<i>HVIEZDA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	N	N	N	N	N
<i>PEDOX</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-

Vysvetlivky: - účinná koncentrácia; + - neúčinná koncentrácia; N - netestovaná koncentrácia

Tab 2: Fungicídny účinok po testácii dezinfekčných prípravkov na *Aspergillus parasiticus*

Koncentrácia %	30%			20%			15%			8,0%			5%		
Expozícia (min)	5	15	30	5	15	30	5	15	30	5	15	30	5	15	30
KYS. KAPRYLOVÁ	N	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEROXID VODÍKA	-	-	-	N	N	N	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Vysvetlivky: - účinná koncentrácia; + - neúčinná koncentrácia; N - netestovaná koncentrácia

Tab 3: Fungicídny účinok po testácii dezinfekčných prípravkov na *Aspergillus parasiticus*

Koncentrácia %	2%			3%		
Expozícia (min)	5	15	30	5	15	30
P3 -STERIL	-	-	-	-	-	-
TOPAX 56	-	-	-	-	-	-
TOPAX 66	-	-	-	-	-	-
TOPAX 32	-	-	-	-	-	-

Vysvetlivky: - účinná koncentrácia; + - neúčinná koncentrácia

Z uvedených výsledkov testovania suspenznou metódou môžeme konštatovať, že najúčinnější z testovaných prípravkov vo všetkých koncentráciach ako aj stanovených časových expozíciách (5, 15, 30 min.) sa javila Hviezda a Padox. Dobrú fungicídnu účinnosť potvrdili aj vyššie spomínané komerčne vyrábané dezinfekčné prostriedky v odporúčaných koncentráciach výrobcov. Z chemických látok v zostupnom poradí bola najúčinnější kyselina kaprylová, peroxid vodíka.

#### POĎAKOVANIE

Práca bola podporená projektom KEGA 3/7385/09.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Langsrud S., Sidhu M.S., Heir E., Hoick A.L, Bacterial disinfectant resistance a challenge for the food industry. International Biodeterioration & Biodegradation, 2003; 51: 283-290.  
 Štefkovičová M., Dezinfekcia a sterilizácia teória a prax - II, Vrana, s.r.o., Žilina, 2007.  
 Melicherčíková V., Ochranná dezinfekce, Sdružení pracovníku dezinfekce, dezinfekce a deratizace České republiky, Praha 2003.  
 Kašková A., 2005, Vplyv hygieny a sanitácie na kvalitu a bezpečnosť potravín, Dizertačná práca, 2005.

## SURVEILLANCE LYSSAVÍRUSOVEJ INFEKCIE V SYNANTROPNEJ POPULÁCIÍ VYBRANÝCH DRUHOV NETOPIEROV V SLOVENSKEJ REPUBLIKE

Korytár L.<sup>1</sup>, Ondrejka R.<sup>1</sup>, Ondrejková A.<sup>1</sup>, Pokeš M.<sup>1</sup>, Slepcká E.<sup>1</sup>, Beníšek Z.<sup>1</sup>, Ceľuch M.<sup>2</sup>,  
Fulín M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ústav epizootológie a preventívnej veterinárskej medicíny, UVLF v Košiciach, Košice

<sup>2</sup>Spoločnosť pre ochranu netopierov na Slovensku, Bardejov

<sup>3</sup>Východoslovenské múzeum v Košiciach, Košice

### ABSTRAKT

Práca sumarizuje výsledky vyšetrenia netopierov druhu raniak hrdzavý (*Nyctalus noctula*) večernica malá (*Pipistrellus pipistrellus*) a večernica pestrá (*Vespertilio murinus*) metódou imunofluorescenčnej mikroskopie za účelom detekcie infekcie európskym netopierím lyssavírusom. Všetky vyšetované jedince pochádzali z kolónií nájdených počas vegetačného obdobia, alebo počas hybernačnej periódy v obytných budovách v mestách Košice a Ružomberok. Ani v jednom prípade nebola zistená prítomnosť lyssavírusovej infekcie.

### ÚVOD

Postupná urbanizácia krajiny spôsobuje environmentálne zmeny ovplyvňujúce druhovú štruktúru populácie netopierov, ich úkrytovú a potravnú ekológiu (Johnson et al., 2008). Netopiere obsadzujú na území miest jednak prirodzené úkryty (napr. stromové dutiny, priestory pod uvoľnenou kôrou, staré duté vetvy, dutiny po d'atľoch), avšak väčšina synantropných druhov je z dôvodu nedostatku prirodzených úkrytov úzko naviazaná na úkryty poskytované ľudskými stavbami (Reiter & Zahn, 2006). Významným fenoménom je aj zimovanie netopierov v panelových domoch (Horáček, 2004). Ako druhy najčastejšie osídľujúce výškové panelové domy na území SR sa uvádzajú večernica malá (*Pipistrellus pipistrellus*), večernica pozdná (*Eptesicus serotinus*) a raniak hrdzavý (*Nyctalus noctula*) (Lehotská & Lehotský, 2000). Najmä počas zimného obdobia sa spomína výskyt druhu večernica pestrá (*Vespertilio murinus*) (Matis & Dittel, 1997).

Európske insektivorné netopiere sú rezervoármi dvoch Európskych netopierích lyssavírusov: EBL-1 a EBL-2 (European bat Lyssavirus 1 a 2). Prenos vírusu bol dokázaný medzi rôznymi druhmi insektivorných netopierov (Ondrejková 2004).

EBL-1 vytvára v Európe dve genetické línie, EBL-1a a EBL-1b. Existuje predpoklad, že variant 1a bol iba nedávno introdukovaný do európskeho priestoru zo severnej Afriky cez južné Španielsko a postupne sa šíri západovýchodným smerom. Priestorová distribúcia variantu 1b vykazuje šírenie v mere sever-juh. Výskyt oboch variantov súčasne bol potvrdený iba v Holandsku a vo Francúzsku. Vyše 95%-ná incidencia EBL-1 v Európe bola potvrdená u večernice pozdnej (*E. serotinus*) (Harris a kol., 2006).

EBL-1 infekcia bola tiež identifikovaná dvakrát u oviec v Dánsku r. 1998 a 2002, raz u kuny skalnej v Nemecku r. 2001, u domácej mačky v Dánsku r. 2004 (Harris a kol. 2006) a u dvoch domácich mačiek vo Francúzsku r. 2003 a 2007 (Dacheux a kol., 2009).

EBL-2 bol prvýkrát izolovaný z humánneho prípadu, kedy sa infikoval švajčiarsky chiropterológ od netopierov pravdepodobne vo Fínsku. Roku 1986 bol vírus izolovaný v Dánsku a Nemecku z *M. daubentonii* a v Dánsku z *M. dasycneme*. Celkovo bol tento variant hlásený 18-krát z Holandska, Nemecka, Dánska, Fínska, Švajčiarska, Ukrajiny a z Veľkej Británie (Harris a kol., 2006). EBL-2 bol izolovaný z netopierov rodu *Myotis* aj v Škótsku (Aegerter 2004).

Cieľom našej práce bola detekcia možnej prítomnosti lyssavírusového antigénu v tkanivách čerstvých kadáverov netopierov viacerých druhov nájdených v blízkosti ľudských obydľí, respektíve priamo v nich. Pri väčšine uhynutých jedincov príčina úhynu nebola jednoznačne známa.

## MATERIÁL A METODIKA

Štúdia bola vykonávaná na základe povolenia a rozhodnutia MŽP SR, ktorým sa udelila pre UVLF v Košiciach výnimka z § 35 ods. 1 písm. a), b) zákona č. 543/2002 Z.z. o ochrane prírody a krajiny na odchyt insektivorných netopierov na území SR.

Vyšetrovaných bolo 25 jedincov insektivorných netopierov troch bežných synantropných druhov. Jednotlivé zvieratá pochádzali z uviaznutých kolónií, nájdených najmä v obytných panelových budovách. Vždy išlo o čerstvé kadávery. Z každého vyšetrowaného netopiera bol odobratý mozog, slinné žľazy a hnedý tuk. Tento materiál slúžil na detekciu lyssavirusového antigénu. Z mozgu, slinných žliaz a hnedého tuku boli pripravené otláčkové preparáty. Otláčkové preparáty boli ofarbené a vyšetrowané priamou metódou imunofluorescencie (PMIF).

## VÝSLEDKY

Bolo vyšetrowaných 20 raniakov hrdzavých (*N. noctula*) 4 večernice malé (*P. pipistrellus*) a 1 večernica pestrá (Tab. č. 1). Vo vyšetrowaných tkanivách nebola potvrdená prítomnosť vírusových partikul.

Tab. č. 1: Prehľad vyšetrowaných jedincov

Druh	Pohlavie	Dátum nálezu	Lokalita nálezu	Príčina úhynu	Výsledok vyšetrowania
<i>Nnoc.</i>	♂♂	apríl 2010	Ružomberok	neznáma	negatívny
<i>Nnoc.</i>	♀♀	apríl 2010	Ružomberok	neznáma	negatívny
<i>Nnoc.</i>	♂♂	apríl 2010	Ružomberok	neznáma	negatívny
<i>Nnoc.</i>	♀♀	apríl 2010	Ružomberok	neznáma	negatívny
<i>Nnoc.</i>	♂♂	apríl 2010	Ružomberok	neznáma	negatívny
<i>Nnoc.</i>	♀♀	apríl 2010	Ružomberok	neznáma	negatívny
<i>Nnoc.</i>	♂♂	apríl 2010	Ružomberok	neznáma	negatívny
<i>Nnoc.</i>	♀♀	apríl 2010	Ružomberok	neznáma	negatívny
<i>Nnoc.</i>	♂♂	apríl 2010	Ružomberok	neznáma	negatívny
<i>Nnoc.</i>	♂♂	apríl 2010	Ružomberok	neznáma	negatívny
<i>Nnoc.</i>	♂♂	apríl 2010	Ružomberok	neznáma	negatívny
<i>Nnoc.</i>	♂♂	apríl 2010	Ružomberok	neznáma	negatívny
<i>Nnoc.</i>	♀♀	apríl 2010	Ružomberok	neznáma	negatívny
<i>Nnoc.</i>	♂♂	apríl 2010	Ružomberok	neznáma	negatívny
<i>Nnoc.</i>	♂♂	apríl 2010	Ružomberok	neznáma	negatívny
<i>Nnoc.</i>	♀♀	apríl 2010	Ružomberok	neznáma	negatívny
<i>Nnoc.</i>	♂♂	apríl 2010	Ružomberok	neznáma	negatívny
<i>Nnoc.</i>	♂♂	apríl 2010	Ružomberok	neznáma	negatívny
<i>Ppip.</i>	♂♂	11. 9. 2009	Košice	predácia mačkou	negatívny
<i>Ppip.</i>	♂♂	2009	Košice	dehydratácia	negatívny
<i>Ppip.</i>	♀♀	2009	Košice	dehydratácia	negatívny
<i>Ppip.</i>	♀♀	január 2010	Košice	prerušenie hibernácie	negatívny
<i>Vmur.</i>	♂♂	4. 4. 2009	Košice	mechanický inzult	negatívny

Vysvetlivky: ♂♂ – samec, ♀♀ – samica, *Nnoc.* – *Nyctalus noctula*, *Ppip.* – *Pipistrellus pipistrellus*, *Vmur.* – *Vespertilio murinus*

## DISKUSIA

Podľa dostupnej literatúry patria nami skúmané druhy netopierov ku najčastejšie nachádzaným v priestoroch panelových budov na Slovensku (Lehotská & Lehotský, 2000, Ceľuch & Kaňuch, 2002, Matis & Dittel, 1997). Zaujímavá je absencia druhu večernica pozdna (*E. serotinus*).

Na území Slovenskej republiky boli doteraz izolované dva kmene európskeho netopierieho lyssavírusu. Prvý kmeň bol v roku 1991 izolovaný z mozgu druhovo nedeterminovaného netopiera, ktorý exponoval človeka v okr. Žiar nad Hronom. Lyssavírusový kmeň bol pomocou monoklonálnych protilátok determinovaný ako EBL-1 (Švrček a kol., 2007). Druhý kmeň bol izolovaný z večernice pozdnej (*E. serotinus*), ktorá r. 2000 exponovala človeka v meste Prešov (Ondrejková a kol., 2004).

V celoeurópskom meradle bola infekcia EBL-1 popísaná u týchto druhov: *Eptesicus serotinus*, *Nyctalus noctula*, *Vespertilio murinus*, *Myotis myotis*, *Myotis dasycneme*, *Myotis daubentonii*, *Myotis nattereri*, *Pipistrellus pipistrellus*, *Pipistrellus nathusii*, *Rhinolophus ferrumequinum*, *Miniopterus schreibersii* (Kuzmin & Rupprecht 2007). Vírus bol taktiež potvrdený aj u druhov *Plecotus auritus*, *Barbastella barbastellus* a *Tadarida teniotis* (Müller a kol., 2007).

EBL-2 bol izolovaný z druhov *M. daubentonii* a *M. dasycneme* (Harris a kol., 2006).

## POĎAKOVANIE

Táto práca bola pripravená realizáciou projektu „INFEKTZOON – centrum excelentnosti pre nákazy zvierat a zoonózy“, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.“

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Aegerter JN, Smith GC, Moore N, Brookes SM, Fooks AR, Racey PA, Swift SM, Mackie I. The extent and frequency of European Bat Lyssavirus (EBLV2) in Scotland as determined by surveillance testing of sero-prevalence and tissue sampling [online]. Scottish Natural Heritage Commissioned Report No. 108. 2004 (ROAME No. F 02AC337). Dostupné na internete: [http://www.scottishfossilcode.org/pdfs/publications/commissioned\\_reports/F02AC337.pdf](http://www.scottishfossilcode.org/pdfs/publications/commissioned_reports/F02AC337.pdf)
- Ceľuch M, Kaňuch P. Zimný výskyt netopierov v panelových blokoch na sídlisku Sekčov v Prešove. *Vespertilio*. 2002; 6: 44.
- Dacheux L, Larrous F, Mailles A, Boisseleau D, Delmas O, Biron Ch, Bouchier Ch, Capek I, Muller M, Ilari F, Lefranc T, Raffi F, Goudal M, Bourhy H. European Bat Lyssavirus Transmission among Cats. *Eur Emerg Infect Dis*. 2009; 15: 280–284.
- Harris SL, Brookes SM, Jones G, Hutson AM, Racey PA, Aegerter J, Smith GC, McElhinne LM, Fooks AR. European bat lyssaviruses: Distribution, prevalence and implications for conservation. *Biol conser*. 2006; 131: 193–210.
- Horáček D. *Vespertilio murinus* a *Pipistrellus pipistrellus* ve spárách panelových domů v Liberci. *Vespertilio*. 2004; 8: 140–142.
- Johnson JB, Gates JE, Ford WM. Distribution and activity of bats at local and landscape scales within a rural–urban gradient. *Urban Ecosyst*. 2008; 11: 227–242. Dostupné na internete: [http://www.nrs.fs.fed.us/pubs/jrnl/2008/nrs\\_2008\\_johnson-001.pdf](http://www.nrs.fs.fed.us/pubs/jrnl/2008/nrs_2008_johnson-001.pdf)
- Kuzmin IV, Rupprecht CHE. Bat rabies. Pp. 259–307. In: Jackson AC, Wunner WH (eds.). *Rabies*. Elsevier Inc., London. 2007; 660pp.
- Lehotská B, Lehotský R. Skúsenosti z ochrany zimnej kolónie raniaka hrdzavého (*Nyctalus noctula*) v panelovom dome na bratislavskom sídlisku Dlhé Diely. *Vespertilio*. 2000; 4: 105–110.
- Matis Š, Dittel L. Jesenné pozorovania *Vespertilio murinus* v niektorých mestách na Slovensku. *Vespertilio*. 1997; 2: 141–142.
- Müller T, Johnson N, Freuling CM, Fooks AR, Selhorst T, Vos A. Epidemiology of bat rabies in Germany. *Arch Virol*. 2007; 152: 273–288.

- Ondrejková A. Epizootológia a laboratórna diagnostika besnoty a ďalších lyssavírusových chorôb. Habilitačná práca. Ústav vedeckých informácií a knižnica Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach. 2004; 133 pp.
- Ondrejková A, Franka R, Ondrejka R, Švrček Š, Süli J, Beníšek Z, Zubrický P, Bajová V, Bugarský A, Bourhy H. Identification of a Lyssavirus isolate from a bat (*Eptesicus serotinus*). Bull Vet Ins. Pulawy. 2004; 48: 11–13.
- Reiter G, Zahn A. Bat roosts in the alpine area: Guidelines for the renovation of buildings. 2006; 5–6. Dostupné na internete: <http://www.lsn.tirol.gv.at/en/doc/guidelines.pdf>
- Švček Š, Bajová V, Čížek M, Levkutová M, Mojžišová J, Ondrejka R, Ondrejková A, Süliová J, Vilček Š. Súčasný stav poznania o lyssavíruoch a lyssavírusových chorobách, vypracovanie epizootologickej schémy cyklov, foriem a variantov besnoty a ďalších lyssavírusových chorôb. Slov vet čas. 2007; 3: 166–171.

## **KERATITIS SUPERFICIALIS PIGMENTOSA CHRONICA U PLEMENA NEMECKÝ OVČIAK, POROVNANIE TERAPIE**

Kováčová Z.<sup>1</sup>, Trbolová A.<sup>1</sup>

*Klinika malých zvierat, UVLF, Košice*

### **ABSTRAKT**

Chronická povrchová keratitída (iné názvy - Pannus nemeckých ovčiakov), je autoimunitne spôsobený, obojstranný, často nesymetrický zápal rohovky. Ku klinickým prejavom ochorenia patrí neovaskularizácia, ukladanie pigmentu na zmenenom povrchu rohovky (zmeny postupujú od spodného okraja do centra rohovky) a edém rohovky. Postihnutí jedinci boli rozdelení do 2 skupín podľa terapie, ktorá im bola nasadená. V prvej skupine bola účinnou látkou kortikosteroid (5 ) a v skupine druhej bol nasadený cyklosporín A (4), obe liečivá majú silné imunosupresívne vlastnosti. Pacienti chodili na mesačné kontroly spojené s fotodokumentáciou a následným porovnávaním predchádzajúceho stavu na rohovke.

### **ÚVOD**

Pannus môže iniciovať ultrafialové žiarenie, ktoré spôsobuje modifikáciu špecifických antigénov nachádzajúcich sa v rohovke, proti ktorým následne dochádza k imunitnej odpovedi. Priebeh ochorenia je postupný, od niekoľkých mesiacov až po niekoľko rokov. Pokiaľ sa nezačne so správnou terapiou, ochorenie končí slepotou.

Predisponované plemená: nemecký ovčiak 82% prípadov (Stacy E. A., 2008), americký kokeršpaniel, airedale terier, austrálsky pastiersky pes, belgický malinois, belgický ovčiarsky - Groenendael, belgický tervuren, borderkólia, mývalí pes, Coton de Tulear, jazvečík, dalmatín, anglický buldog, anglický špringeršpaniel, chrt, japonský čin, miniatúrny pinč, Ochorenie postihuje najčastejšie psy plemena nemecký ovčiak a jeho krížencov, vo veku 1-5 rokov. U ostatných plemien je diagnostikovaná medzi 4-6 rokom života.

Pannus často prebieha s ďalším autoimunitným ochorením, prejavujúcim sa depigmentáciou okraja tretieho viečka – plazmoma. Ide o autoimunitne spôsobené ochorenie. Dochádza ku zhrubnutiu, depigmentácii a tvarovaniu folikulov na okraji spojovky tretieho viečka. Terapia je v tomto prípade rovnaká.

Diagnostika je založená na základe klinických príznakov, plemennej predispozície a vo vylúčení ostatných možných ochorení. K pomocným diagnostickým testom patrí STT (Schirmer tear test – Schirmerov slzný test) na vylúčenie syndrómu suchého oka a fluoresceínový test na vylúčenie vredu rohovky.

Cieľom práce je porovnávanie súčasne používanej terapie, kde sa zameriavame na sledovanie účinnosti a elimináciu vedľajších účinkov dlhodobého lokálneho podávania imunosupresívnych liekov.

### **MATERIÁL A METODIKA**

Majitelia zvierat prichádzali na prvé oftalmologické vyšetrenie od septembra 2009 do júna 2010 na Kliniku malých zvierat UVLF. Kde boli postupne zaradení do skupín. Boli oboznámení s diagnózou svojho psa a poučení o následných krokoch. Dochádzali na mesačné kontroly, ktoré zahŕňali oftalmologické vyšetrenia, fotodokumentáciu oboch očí, ako aj zabezpečenie liekov na ďalší mesiac. Terapia u týchto jedincov je doživotná. Toto ochorenie sa nedá vyliečiť, dajú sa len tlmiť jeho príznaky.

V prvej skupine o počte 5 psov sa lokálne aplikoval 0.1% dexamethason (3xdenne) a v skupine číslo 2. sa aplikoval 1 % cyklosporín A (2xdenne) tiež lokálne.

Počas dlhodobého podávania imunosupresívnych liekov lokálnou aplikáciou do oka sa znižuje imunita, kde následne hrozí bakteriálna, alebo vírusová infekcia. Ďalší z vedľajších

účinkov je znížená regeneračná schopnosť epitelu rohovky ako aj ukladanie cholesterolu a minerálnych látok v rohovke.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Spolupráca a vzájomná dôvera medzi majiteľom postihnutého psa a doktorom je v tomto prípade nevyhnutá. Jedine správna terapia podávaná pravidelne, môže zabezpečiť pozitívne výsledky.

U všetkých pacientov boli výsledky na prvej kontrole markantné a majitelia spokojní, čo zaručilo ďalšiu spoluprácu.

Pacienti prichádzali do ambulancie s rozsiahlou vaskularizáciou postupujúcou od spodného okraja rohovky, edémom a postupným ukladaním pigmentu. U 8 z 9 pacientov sa vyskytlo ďalšie ochorenie nazývané plazmoma, ktoré je pri pannuse častým sprievodným javom.

Po mesačnej terapii nastal výrazný ústup vaskularizácie, edém rohovky takmer vymizol. Pigment, ktorý sa ukladal na rohovke sa v prípade zjavného zníženia priehľadnosti rohovky môže odstrániť povrchovou keratektómiou, alebo kryochirurgickým ošetrením rohovky. Tieto chirurgické metódy neboli použité.

Liečivá, ktoré sme lokálne aplikovali majú silné imunosupresívne vlastnosti. Cyklosporín A (CyA) je cyklický polypeptid, ktorý predstavuje prvú prírodnú látku so selektívnym imunosupresívnym účinkom. Hlavným mechanizmom účinku je potlačenie aktivácie lymfocytov. Cyklosporíny sú produkované vláknitými pôdnymi hubami *Trypocladium inflatum*.

Dexamethason je veľmi účinný liek patriaci do skupiny syntetických glukokortikosteroidov. Pôsobí protizápalovo a imunosupresívne.

Výsledky terapie u oboch skupín boli takmer zhodné. V skupine s použitím kortikosteroidov sa u 2 psov z 5 vyskytlo ukladanie cholesterolu a minerálnych látok do rohovky, čo minimálne ovplyvňuje vízus jedincov.

V celkom hodnotení porovnania týchto 2 terapií je už len na zvážení doktora ako aj dostupnosti liekov, ktorú z týchto metód použije.

## POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporovaná grantom VEGA Ministerstva školstva a vedy SR a Slovenskou akadémiou vied (č. 1/0559/09: „Klinické a experimentálne štúdium patogenézy niektorých chorôb psov, ich terapia a riešenie hypotermie pri celkovej anestézii u zvierat“).

## POUŽITÁ LITERATÚRA

Gelatt K.N. *Veterinary Ophtalmology*. 2007; 654-657

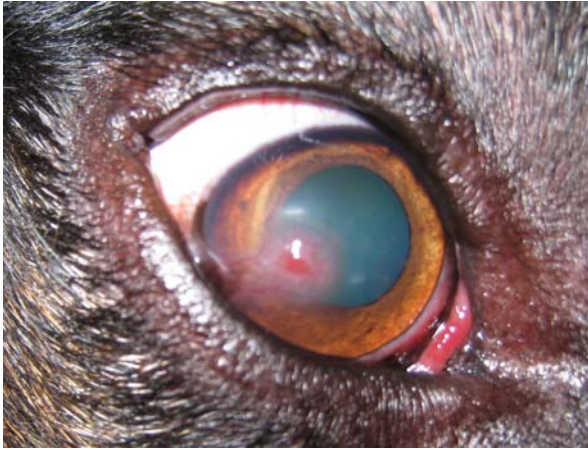
Maggs D.J., Miller P.E., Ofri R. *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. 2008; 194-5

Andrew S. E. *Ophthalmic Immunology and Immune-mediated Disease; Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, Volume 38, Issue 2, Marec 2008, 269-290

Ledecký V., Trbolová A., Janda J., Tkáč J., Ševčík A., Capík I. *Oftalmológia zvierat*. 1997; 68

Svoboda M., Senior D.F., Doubek J., Klimeš J. a kol. *Nemoci psa a kočky*, II. díl. 2001; 572-3





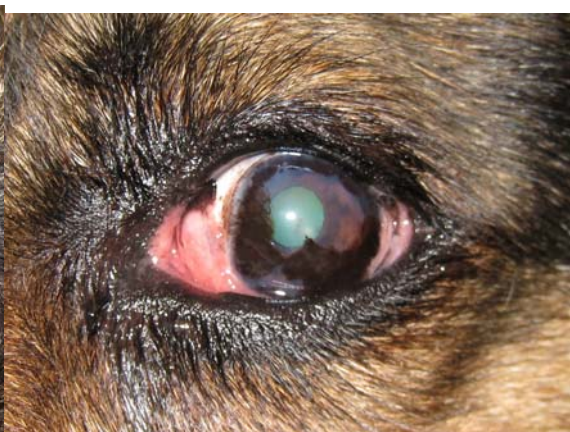
Obr.č.1. Vaskularizácia postupujúca od spodného okraja rohovky, edém rohovky a plazmoma 3.viečka na pravom oku u 5ročného samca nemeckého ovčiaka. 1 návšteva.



Obr.č.3. Rozsiahli edém rohovky, pigmentácia epitelu, plazma rozšírená aj do laterálneho a mediálneho kútika. 11 ročný toho času prakticky slepý samec nemeckého ovčiaka, ktorému bola dlhodobo podávaná nesprávna terapia.



Obr.č.2. Pacient z obrázku č.1. po 6 mesiacoch od začiatku terapie. Ústup klinických prejavov pannusu a plazmomy a prevaj jedného z vedľajších účinkov dlhodobého podávania imunopresív – ukladanie minerálnych látok a cholesterolu v rohovke.



Obr.č.4 Pacient z obrázku č.3. po 3 mesiacoch od začiatku terapie

## KOŽNÝ FLAP AKO MOŽNOSŤ TERAPIE PRI POŠKODENÍ KOŽE U VOĽNE ŽIJÚCICH ZVIERAT

Kožár M.<sup>1</sup>, Molnár L.<sup>2</sup>, Trbolová A.<sup>1</sup>

*Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach*

<sup>1</sup>*Klinika malých zvierat,* <sup>2</sup>*Klinika exotických a voľne žijúcich zvierat*

### ABSTRAKT

V klinickej praxi sa u voľne, ale aj doma žijúcich vtákov sa často stretávame s rozsiahlymi poškodeniami kože, alebo poškodením kože na ťažko prístupných miestach. Na zvládnutie týchto defektov doposiaľ neboli vyvinuté presné postupy manažmentu. V praxi sa využívajú moderné metódy získané z humánnej medicíny a veterinárnej medicíny u malých zvierat, ktoré sú prispôbené na kožné modifikácie vyskytujúce sa u vtákov. V našej práci sme použili jednu z týchto metód a to metódu terapie kožných rán za pomoci vaskularizovaného kožného flapu. Ošetrovaných bolo 6 pacientov, pričom u piatich bol výsledok pozitívny s plným funkčným využitím postihnutého miesta do dvoch mesiacov od vykonania zákroku.

Osvojením postupu metódy aplikácie vaskularizovaného kožného flapu sme odobrili jej využitie v klinickej praxi pri ťažko hojacích a rozsiahlych kožných defektoch vtákov.

### ÚVOD

Kožné defekty sú častým problémom vyskytujúcim sa u voľne, ale i doma žijúcich vtákov. Vznikajú ako následok poškodenia kože pri traume, kožných zápaloch (*pododermatitis*), omrzlinách, popáleninách, poškodení mäkkých tkanív pri otvorených zlomeninách, ale aj pri nevhodnom spôsobe chovu. Ich zvládnutie znamená veľkú výzvu pre veterinárneho lekára (Ferrell, 2002, Stroud a kol., 2003).

Vtáčia koža má rovnaké základné štruktúry ako koža cicavcov, avšak vystupuje s množstvom modifikácií a odlišností oproti koži cicavcov (Pass, 1995). Tieto evolučné adaptácie, ako sú hrúbka kože, nedostatočné množstvo podkožného tkaniva a slabé krvné zásobenie, hlavne v periférnych častiach končatín (Ferrell, 2002), zhoršujú využitie metód manažmentu kožných defektov využívaných u cicavcov s pozitívnym výsledkom. Ďalším problémom u vtákov je častá absencia voľnej kože v oblasti kožného defektu, s ktorou by bolo možné ranu uzavrieť. Tieto limitácie si vyžadujú poznatky nových metód zvládnutia poškodenia kože. K týmto metódam terapie kože sa radí využitie kožného flapu, kožných graftov a extracelulárnych matric (Stroud a kol., 2003).

Kožný flap je definovaný ako čiastočne oddelený segment kože a podkožného tkaniva so zachovaným krvným zásobením preložený na nové recipientné lôžko. Na vytvorenie živého kožného flapu musia chirurgovia vedieť anatómiu kožných zvláštností a ciev na zachovanie cirkulácie krvi (Ferrell, 2002). Avšak väčšina jednoduchých flapov je založená na nešpecifickom alebo náhodnom zásobení subdermálnym plexom (Nesbit a Laub, 2009). Proces jeho vytvorenia zahŕňa incízie kože odpovedajúce veľkosti kožného defektu s odstupujúcou bázou pri zachovanom krvnom zásobení.

Pri aplikácii kožného flapu musí byť posúdená veľkosť defektu kože, stav kože v okolí defektu potrebnej na vytvorenie kožného flapu a samotný typ flapu. Medzi tri najčastejšie typy flapov patria jednoduchý kožný flap, pri ktorom dochádza k natiahnutiu segmentu kože, rotácia flapu a transpozícia flapu. Dôležité je taktiež brať do úvahy natiahnutie segmentu kože, ktoré je najväčšie u jednoduchého flapu, stredné pri rotácii a najmenšie pri transpozícii kožného flapu. Na dostatočné prekrytie kožného defektu a zabezpečenie ideálnej adaptácie vaskularizovaného kožného flapu do recipientného lôžka kože v oblasti defektu môžeme kombinovať techniku prenosu s vytvorením uvoľňovacích rezov. Uvoľňovacie rezy majú výhodu zväčšenia povrchu pokrytia s vytvorením množstva štartovacích bodov pre epitelizáciu, ale slúžia aj ako drenáž pri odtokaní sekréty z rany (Stroud a kol., 2003).

Po zvážení postupu odpovedajúcemu miestu lokalizácie a veľkosti defektu je segment kože jemne oddelený a uvoľnený od podkožia a prenesený na miesto defektu, ktoré je ním prekryté a prichytené sutúrou (Ferell, 2002). Doposiaľ neexistuje žiadna literatúra popisujúca presné postupy prevedenia kožného flapu u vtákov s jasným popisom cievného modelu.

Cieľom tejto štúdie je osvojenie si postupu metódy riešenia defektov kože za pomoci vaskularizovaného kožného flapu ako aj jej využitie a prínos v klinickej praxi.

## MATERIÁL A METODIKA

Experimentálna štúdia prebiehala na Klinike exotických a voľne žijúcich zvierat Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach od októbra 2009 do marca 2010. K chirurgickému riešeniu ošetrovania veľkých kožných defektov, alebo poškodení kože na ťažšie dostupných miestach u vtákov bola použitá metóda aplikácie jednoduchého a rotovaného kožného flapu. Použitím tejto metódy bolo ošetrovaných šesť pacientov. Skupinu pacientov tvorili: orol kráľovský (*Aquila heliaca*), myšiak lesný (*Buteo buteo*), jastrab krahulec (*Accipiter nisus*), prepelica poľná (*Coturnix coturnix*) a korela chochlatá (*Nymphicus hollandicus*). Pri prehliadke pacienta boli posúdené veľkosť a rozsah defektu so zameraním na možnosť využitia tejto alternatívnej metódy terapie poškodenia kože. Taktiež bol posúdený zdravotný stav pacienta pred zákrokom a jeho spoločenské postavenie.

Pacienti boli prvotne podrobení medikamentózne terapii na potlačenie bakteriálnej infekcie a zápalu. Ako antibiotická clona bol podávaný enrofloxacín v prípravku Enroxil (KRKA) v dávke  $7 \text{ mg.kg}^{-1}$  živej hmotnosti. Lokálne bol aplikovaný 1 % tanín-alkoholový zábal s antimikrobiálnym a adstringenčným terapeutickým účinkom, ako aj oxytetracyklín s polymyxínom vo forme maste (Pfizer) (Obr. 1). Následne bola rana opätovne posúdená pre aplikáciu kožného flapu, prípadne boli odstránené nekrotické časti tkaniva a kože.

Pred vykonaním zákroku boli pacienti uvedení do anestézy buď injekčne za pomoci ketamínu v dávke  $20 \text{ mg.kg}^{-1}$  živej hmotnosti v prípravku Ketamidol (Richter pharma ag) a xylazín  $2 \text{ mg.kg}^{-1}$  živej hmotnosti v prípravku Rometar (BIOVETA), alebo za pomoci inhalačnej anestézy s isofluránom.

Samotný zákrok pozostával z vyrezania segmentu zdravej kože odpovedajúceho veľkosti kožného defektu. Segment kože bol umiestnený na recipientné lôžko rany jednoduchými (Obr. 2), alebo odľahčenými U- stehmi za pomoci šijacieho materiálu Prolene 3/0 (ETHICON). Po vykonaní samotného zákroku na mieste defektu bol použitý 20 % Solcoseryl gél (VALEANT) na podporenie granulácie epitelu a ako ochranná bariéra bakteriálnej infekcie bola použitá Betadine masť (EGIS). Rana bola prekrytá hydrokoloidným dressingom vo forme náplaste (Hydrocoll, HARTMANN), obväzovým materiálom a vrchnou vrstvou adhezívneho samolepiaceho obväzového materiálu (CoPoly).



Obr. 1 Lokálna aplikácia liečiv



Obr. 2 Prišitie vaskularizovaného kožného flapu



## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Indikáciami pre použitie kožného flapu, ako metódy terapie poškodenia kože, bolo nasledovné. Pri troch pacientoch (myšiak lesný /2 ks/, prepelica poľná) bolo prítomné poškodenie kože na prstových vankúšikoch z dôvodu traumy, otlakov a omrzlín (Obr. 3), u jedného pacienta (orol kráľovský) bolo prítomné poškodenie článkov tretích prstov (Obr. 4) s rozsiahlou nekrózou kože po poranení elektrickým prúdom, u jedného pacienta (korela chochlatá) bolo poškodenie kože nohy zarezaním krúžku a u jedného pacienta (jastrab krahulec) bolo prítomné potrhanie kože krídla z dôvodu otvorenej zlomeniny lakťového kĺbu.

U pacientov bola po vykonaní zákroku sledovaná kontrola hojenia rany a samotný stav rany z dôvodu možnej prítomnosti vysychania okrajov rany, čo je častou komplikáciou spôsobenou tenkou kožou u vtákov. Preväzy boli vykonávané po zákroku raz týždenne, neskôr raz za dva až tri týždne.

U väčšiny pacientov bolo do obdobia dvoch mesiacov pozorované úplné vyhojenie defektu kože. Vaskularizovaný kožný flap bol prijatý na recipientnom lôžku na celej ploche (Obr. 5). Jedince boli plne schopné využívať a zaťažovať končatinu a celú plochu chodidla. Avšak u jedného pacienta (jastrab krahulec) došlo k úhynu z dôvodu zlého kondičného stavu a pooperačných komplikácií sprevádzaných ťažkým zápalom a vysychaním kože a svaloviny v okolí rany.

K dosiahnutiu dobrých výsledkov a úspešnosti terapie nám výrazne napomohlo použitie hydrokoloidnej bandáže (Obr. 6), ktorá podporila vytvorenie ideálneho prostredia pre hojenie rany za vzniku adekvátnej bariéry voči vonkajšiemu prostrediu a zabráneniu infekcie.



Obr. 3 Prítomnosť omrzlín končatiny myšiaka



Obr. 4 Poškodenie článkov tretieho prsta orla



Obr. 5 Prijatie kožného flapu na kožnom defekte



Obr. 6 Naloženie hydrokoloidnej bandáže

Publikovaných prác na využitie chirurgickej terapie poškodenia kože kožným flapom je pomerne málo. Hannon a Mc Gehee (1995) uviedli využitie vaskularizovaného kožného flapu na

zvládnutie veľkej kožnej rany na krídle u sovy. Po sedemnástich dňoch od vykonania operačného zákroku však pozorovali nekrotizáciu distálnej časti flapu. Nekrotické tkanivo bolo odstránené a rana vyčistená s nálezom nového epitelizačného tkaniva. Po mesiaci od zákroku sa miesto defektu prekryté kožným flapom úplne zahojilo. Malley a Whitbread (1996) popísali využitie vaskularizovaného kožného flapu na defekte hlavy u jastraba. Autori kládli dôraz predovšetkým na pooperačnú starostlivosť o pacienta z dôvodu vysychania kožného flapu po chirurgickom zákroku. Pri použití vaskularizovaného kožného flapu Gentzom a Linom (2000) u sokola došlo k primárnemu manažovaniu rany v prvom týždni terapie a po tomto období bol kožný defekt prekrytý kožným flapom. V štrnásty deň od vykonania zákroku bolo hojenie rany ukončené. Pri vykonaní operačného zákroku je dôležité brať do úvahy na operených častiach kože zmenu uhlov perových folikulov pri premiestnení vaskularizovaného kožného flapu na recipientné lôžko (Ferell, 2002).

Využitie vaskularizovaného kožného flapu v klinickej praxi u vtákov je pomerne mladou metódou, ale o to viac účinnejšou pri rozsiahlych poškodeniach kože a na miestach s ťažším prístupom. Pozitívne výsledky si vyžadujú zasvätenie chirurga do anatómie kože, krvného zásobenia a fyziológie vtákov.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ferell, S. T. Avian Intengumentary Surgery. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 2002: 11: 125-135.
- Gentz, E. J., Lin, K. A. Use a dorsal cervical single pedicle advancement flap in three birds with cranial skin defects. *J Avian Med Surg*. 2000: 14: 31-36.
- Hannon, D. E, Mc Gehee, N. W. Use of a single pedicle advancement flap for wound repair in a great horned owl (*Bubo virginatus*). *Proc Annu Conf Assoc Avian Vet*. 1995: 285-289.
- Malley, A. D., Whitbread, T. J. The intengument. In: Beynon, P. H., Forbes, N. A., Harcourt-Brown N., eds. *BSAVA Manual of Raptors, Pigeons and Waterfowl*, Gloucestershire, UK: British Small Animal Veterinary Association Ltd. 1996: 129-139.
- Nesbit, R. D., Laub, D. R. jr. Flaps, Random Skin Flaps. <http://emedicine.medscape.com/article/1284569-overview> (2009-05-11).
- Pass, D. A. Normal Anatomy of the Avian Skin and Feathers. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 1995: 4: 152-160.
- Stroud, P. K., Amalsadvala, T., Swaim, S. F. The Use of Skin Flaps and Grafts for Wound Management in Raptors. *Journal of Avian Medicine and Surgery*. 2003: 17: 78-85.

## VÝSLEDKY DVOJROČNÉHO SURVEILLANCE BLUE TONGUE NA FARME DOJNÍC

Lacková Z.<sup>1</sup>, Bireš J.<sup>1</sup>, Kočišová A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Klinika prežúvavcov, UVLF Košice, <sup>2</sup>Ústav parazitológie, UVLF Košice

### ABSTRAKT

Cieľom práce bolo získať počas dvojročného sledovania na farme dojníc prvotné informácie o výskyte a nálezovej situácii choroby modrého jazyka. Surveillance zhubnej katarálnej horúčky pozostávajúcej z klimatických, entomologických sledovaní, klinicko – biochemických vyšetrení zvierat a sérologickej diagnostiky sa realizoval v období od mája 2008 do decembra 2009 na farme dojníc (202 m n. m.). Entomologické sledovanie pozostávalo z odchyty pakomárikov a ich diferenciácii podľa charakteristických znakov. Klinické vyšetrenie sa u zvierat robilo na základe bežnej obhliadky zvierat. Z hematologických a biochemických parametrov sme sledovali hemoglobín (Hb), erytrocyty (Er), hematokrit (Ht), leukocyty (Le), diferenciálny krvný obraz (Ly-lymfocyty, Mo-monocyty, Ba-bazofily, Ty-tyčinky, Seg-segmenty, Eo-eozinofily), aktivitu enzýmov – alkalická fosfatáza (ALP), aspartátaminotransferáza (AST), gamaglutamyltransferáza (GGT), kreatínkináza (CPK), koncentráciu celkového bilirubínu (CBi), celkových bielkovín (CB), albumínu (Alb), kreatinínu (Kreat), celkových imunoglobulínov (CIg), močoviny (U), neesterifikovaných mastných kyselín (NEFA), vápnik (Ca), fosfor (P), železo (Fe), meď (Cu), zinok (Zn). Vyšetrenie prítomnosti protilátok proti vírusu bluetongue (BTV) (vp 7 proteín) prebiehalo metódou ELISA. Potvrdili sme prítomnosť zástupcov pakomárikov rodu *Culicoides*, ktoré sú považované za vektory bluetongue (BT), pričom v prvom roku sledovania dominuje Komplex *Obsoletus* a v druhom roku sú to zástupcovia Komplexu *Pulicaris*. 90,1% odchytených pakomárikov v roku 2008 a 21,1 % v roku 2009 patrí do skupiny pakomárikov nepodieľajúcich sa na prenose vírusu BT. Najvyšší počet pakomárikov bolo v roku 2008 odchytených v druhej polovici júna a začiatkom júla. V roku 2009, vzhľadom na nízky počet odchytených pakomárikov nebolo možné sezónnu dynamiku vyhodnotiť. Pri klinickom a laboratórnom sledovaní neboli pozorované klinické symptómy resp. biochemické zmeny, ktoré by mali bezprostredný vzťah ku chorobe modrého jazyka. Diagnostikované odchýlky poukazovali na narušenie celkového metabolizmu v súvislosti s výskytom iných chorôb a nedostatkami vo výžive.

### ÚVOD

Katarálna horúčka oviec je transmisívna orbivirusová choroba hlavne domácich (ovce, dobytok, kozy) a voľne žijúcich prežúvavcov (jeleňovití). Aj keď bol vírus izolovaný aj u iných druhov prežúvavcov, ide predovšetkým o ochorenie oviec. Pôvodne bola choroba modrý jazyk považovaná za ochorenie afrického kontinentu. Do Európy na ostrov Cyprus sa prvýkrát preniesla v roku 1943. Hlavné nákazové prepuknutia v krajinách strednej a západnej Európy nastali v roku 2006. Od tohto obdobia začala byť nákaza zdravotným a ekonomickým problémom chovateľov hovädzieho dobytku, oviec a kôz. Cieľom práce bolo získať prvotné informácie o výskyte katarálnej horúčky oviec na farme dojníc. Taktiež sledovať potencionálny výskyt vektora nákazy a posúdiť jeho úlohu pri prenose ochorenia. V rámci sledovaných laboratórnych a klinických vyšetrení sa zamerať na tie zmeny, ktoré majú bezprostredný vzťah k chorobe modrého jazyka.

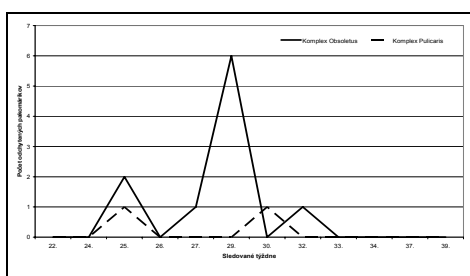
### MATERIÁL A METODIKA

Surveillance zhubnej katarálnej horúčky pozostávajúcej z klimatických, entomologických sledovaní, klinicko – biochemických vyšetrení zvierat a sérologickej diagnostiky sa realizoval v období od mája 2008 do decembra 2009 na farme dojníc (202 m n. m.). Meteorologické údaje (teplota vzduchu, relatívna vlhkosť vzduchu, rýchlosť vetra, smer vetra, oblačnosť) pre oblasť

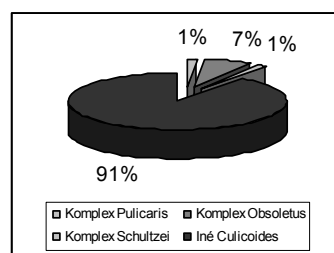
Trebišova sa zaznamenávali denne z internetových stránok [www.shmu.sk](http://www.shmu.sk), [www.onlinepocasie.sk](http://www.onlinepocasie.sk). Entomologický prieskum sa zabezpečoval odchytom vektora týždenne pomocou lapača hmyzu (model JW1212), ktorý bol inštalovaný v deň odchyty medzi 17. až 18. hodinou a odoberaný nasledujúci deň medzi 5. až 6. hodinou ráno. Samotný zber hmyzu prebiehal do plastovej nádoby podľa návodu výrobcu. Spracovanie vzoriek a samotná diagnostika bola robená na Ústave parazitológie UVL, metódou podľa Goffredo a Meiswinkel (2004), na druhové určovanie sa použil kľúč podľa Rawlings (1996). Klinické vyšetrenie hovädzieho dobytku sa robilo v mesačných intervaloch na základe bežnej obhliadky zvierat (klinická obhliadka stáda, klinické vyšetrenie chorých zvierat) a údajov privátneho veterinárneho lekára a chovateľa. Laboratórne vyšetrenie sa realizovalo v mesačných intervaloch od tých istých 15 kusov hovädzieho dobytku (čiernostrakatý dobytok). V prvom roku sledovania to bola skupina vysokogavidných jalovíc, v druhom skupina dojníc po prvej resp. druhej laktácii. Z hematologických a biochemických parametrov sme sledovali hemoglobín (Hb), erytrocyty (Er), hematokrit (Ht), leukocyty (Le), diferenciálny krvný obraz (Ly-lymfocyty, Mo-monocyty, Ba-bazofily, Ty-tyčinky, Seg-segmeny, Eo-eozinofily), aktivitu enzýmov – alkalická fosfatáza (ALP), aspartátaminotransferáza (AST), gamaglutamyltransferáza (GGT), kreatínkináza (CPK), koncentráciu celkového bilirubínu (CBi), celkových bielkovín (CB), albumínu (Alb), kreatinínu (Kreat), celkových imunoglobulínov (Cig), močoviny (U), neesterifikovaných mastných kyselín (NEFA), vápnik (Ca), fosfor (P), železo (Fe), meď (Cu), zinok (Zn). Vyšetrenie na protilátky proti vírusu BT (vp 7 proteín) prebiehalo v Referenčnom laboratóriu pre BT v Štátnom veterinárnom ústave vo Zvolene ELISA metódou (ID VET Kit for detection of anti-VP7 antibodies by competitive ELISA).

## VÝSLEDKY

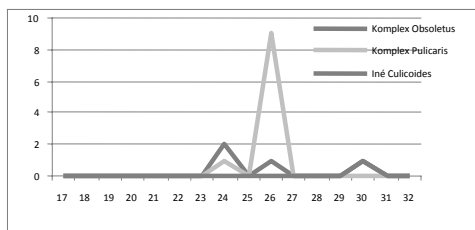
Na farme Zemplínska Teplica bolo v roku 2008 odchytených 141 ks pakomárikov (1,4 % Komplex Pulicaris, 1,4 % Komplex Schultzei, 7,1 % Komplex Obsoletus, 90,1% iné *Culicoides*)(obr.2). Predpokladáme, že vrchol sezóny sa pohyboval v období od 16.6. do 15.7.2008, avšak tieto zistenia nie sú vzhľadom na nízky počet odchytených pakomárikov relevantné (obr. 1). V roku 2009 bolo odchytených len 19 ks pakomárikov (26,3% Komplex Obsoletus, 52,6% Komplex Pulicaris 21,1% iné *Culicoides*)(obr.4). Sezónna dynamika výskytu vektora počas roku 2009 je znázornená na obr. 3.



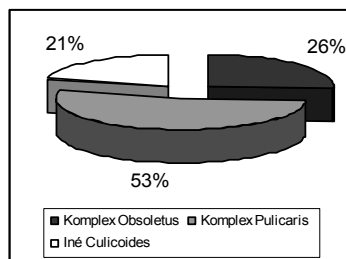
Obr. 1. Sezónna dynamika pakomárikov na sledovanej farme v roku 2008



Obr. 2. Druhovú skladbu pakomárikov na sledovanej farme v roku 2008



Obr. 3. Sezónna dynamika pakomárikov na sledovanej farme v roku 2009



Obr. 4. Druhovú skladbu pakomárikov na sledovanej farme v roku 2009

Pri klinickom sledovaní hovädzieho dobytku sme počas dvojročného sledovania nepozorovali klinické symptómy charakteristické pre zhubnú katarálnu horúčku. Klinické zmeny súviseli s popôrodným obdobím (mastitída, metritída, syndróm uľahnutia, syndróm negatívnej energetickej bilancie, syndróm stučnenia, acidózy, atď.). V prvom roku sledovania sme pri laboratórnych testoch zistili nárast NEMK, CBI a CIg (čo je viazané na popôrodné obdobie), okrajovú sideropéniu, hypokuprémiu a hypozinkémiu v priebehu celého sledovania (tab. 1).

Mesiac odberu		NEMK mmol/l	CBI μmol/l	CIg UZST	Fe μmol/l	Cu μmol/l	Zn μmol/l
Máj n=15	x	5,053	5,053	25,23	27,17	9,087	11,25
	sd	1,085	1,085	4,558	3,468	2,542	2,269
Jún n=15	x	5,397	5,397	30,41	25,69	8,473	10,09
	sd	1,583	1,583	3,064	4,680	1,123	1,250
Júl n=15	x	5,491	5,491	27,23	23,51	9,333	12,60
	sd	2,967	2,967	5,032	4,304	0,748	3,053
August n=15	x	9,903	9,903	30,25	20,01	9,553	9,733
	sd	4,462	4,462	4,654	2,572	1,803	1,406
September n=15	x	8,165	8,165	30,84	18,80	11,27	9,867
	sd	3,461	3,461	5,074	4,487	1,892	0,6976
Október n=15	x	0,1257	7,133	31,16	18,03	11,65	10,12
	sd	0,06155	2,329	4,226	2,632	2,676	3,089
November n=15	x	0,09933	3,939	33,06	20,42	12,85	14,43
	sd	0,06387	1,467	3,338	2,870	1,833	3,830

Tab. 1. Výsledky vybraných biochemických parametrov počas roku 2008 u dojnic

V druhom roku sledovania analyzované indexy energetického metabolizmu poukazujú zvýšenie hodnôt TL a pokles TG (tab. 2). Pri parametroch hepatálneho metabolizmu sa tendencia nárastu priemerných koncentrácií zisťovala u sérovej aktivity enzýmov AST, GGT a CPK, taktiež aj pri CBI a U. Pokles hodnôt sa zaznamenal pri CIg. Pri posudzovaní minerálneho profilu sa zistila v priebehu celého pozorovania okrajová sideropéniu, hypozinkémiu a hypokuprémiu.



Mesiac odberu		TL g/l	TG mmol/l	AST μkat/l	GGT μkat/l	CPK μkat/l	CBi μmol/l	U mmol/l	Clg UZST
Január n=15	x	5,759	0,0920	1,675	0,5253	3,710	2,042	4,276	33,03
	sd	1,000	0,06868	0,5172	0,1920	1,149	0,9655	0,9669	3,807
Marec n=15	x	5,962	0,08533	2,589	0,6320	4,177	2,888	3,887	33,26
	sd	1,444	0,07482	0,09602	0,1783	1,192	1,357	0,5826	3,603
Apríl n=15	x	4,881	0,1153	1,857	0,5647	3,953	3,765	4,195	30,78
	sd	2,162	0,04224	0,3746	0,1407	1,186	0,8100	0,7066	5,019
Máj n=15	x	6,342	0,2267	1,908	0,5260	4,875	5,009	3,593	33,26
	sd	1,630	0,07584	0,3964	0,1358	1,591	2,157	0,6341	4,442
Jún n=15	x	5,130	0,2347	2,189	0,5060	6,791	4,921	3,758	32,05
	sd	1,322	0,1108	0,7216	0,4085	5,774	1,212	0,4606	2,479
Júl n=15	x	4,985	0,1567	2,210	0,5007	8,215	6,229	3,451	35,08
	sd	1,207	0,07575	0,5640	0,1074	5,892	0,8825	0,7822	2,243
August n=15	x	4,872	0,2600	1,981	0,4593	5,08	4,615	3,422	32,65
	sd	1,248	0,08192	0,4977	0,1198	2,0513	0,8088	0,8663	5,374
September n=15	x	4,539	0,1913	1,656	0,4727	5,195	5,182	2,545	28,66
	sd	1,297	0,06346	0,2926	0,1088	2,325	1,154	0,6269	5,064
Október n=15	x	4,241	0,2240	1,976	0,4960	4,023	4,552	3,355	32,15
	sd	1,269	0,07169	0,5407	0,1483	1,613	1,276	0,8336	4,645
November n=15	x	4,484	0,2320	1,872	0,5233	3,919	3,963	3,971	33,15
	sd	1,264	0,09096	0,3811	0,1397	1,009	0,9325	0,9348	3,441

**Tab. 2.** Výsledky vybraných biochemických parametrov počas roku 2009 u dojnic  
Pri sérologickom vyšetrení sme nezistili prítomnosť protilátok voči vírusu modrého jazyka. Na základe negatívnych sérologických výsledkov sme nepokračovali vo virologickom vyšetrení.

## DISKUSIA

Počas dvojiročného sledovania na farme dobytká sme potvrdili prítomnosť pakomárikov rodu *Culicoides* považovaných za vektorov choroby modrého jazyka, pričom v prvom roku sledovania dominoval Komplex *Obsoletus* a v druhom Komplex *Pulicaris*. 90,1% odchytených pakomárikov v roku 2008 a 21,1 % v roku 2009 patrí do skupiny tzv. iných pakomárikov, ktoré sa podľa Goffredo, M. a Meiswinkel, R., (2004) nepodieľajú na prenose vírusu BT. Najviac pakomárikov bolo odchytených v období najpriaznivejších klimatických podmienok pre život vektora, v roku 2008 to bolo v druhej polovici júna a začiatkom júla a v roku 2009 počas júla. Z tohto dôvodu pre stanovenie transmisívnej periódy vektora je potrebné sledovať aj meteorologické údaje.

Pri klinickom vyšetrení hovädzieho dobytká a oviec sme nediagnostikovali symptómy choroby modrého jazyka (Backx a i., 2007). V prípade výskytu klinických symptómov, tieto boli u hovädzieho dobytká viazané väčšinou na produkčné choroby v peripartálnom období a nedostatky vo výžive. Vzhľadom na výskyt vektorov vírusu BT sa potvrdila potreba klinického sledovania zvierat v chovateľských podmienkach ako neodmysliteľná súčasť surveillancie choroby modrého jazyka v rámci včasnej diagnostiky, čo je aj v súlade so Smernicou Rady č. 2000/75/ES a kódexom zdravia OIE pre suchozemské zvieratá (2004).

Pri laboratórnej analýze neboli pozorované zmeny charakteristické pre chorobu modrého jazyka. Diagnostikované odchýlky poukazovali na narušenie celkového metabolizmu v súvislosti s výskytom iných chorôb (produkčné choroby, nedostatky vo výžive, atď.). Vyšetované biochemické markery odrážajú narušenie tých orgánových systémov, ktoré sú postihnuté v priebehu infekcie vírusom BT, preto je potrebná ich diagnostika pre posúdenie celkového zdravotného stavu infikovaných zvierat alebo v rámci včasnej diagnostiky. Pri sérologickom vyšetrení nebola potvrdená počas celého sledovania prítomnosť protilátok voči žiadnemu sérotypu vírusu BT. Kontinuálne sérologické analýzy zvierat ako neodmysliteľný prvok surveillancie choroby modrého jazyka sú opodstatnené, nakoľko sa zistila prítomnosť vektora počas transmisívnej sezóny. Virologické vyšetrenia zvierat resp. vektora sa odporúča využiť len v prípade podozrenia na nákazu.

## POĎAKOVANIE

Práca vznikla za podpory projektov AV 4/2041/08 a VEGA 1/0940/11.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Backx A., Heutink R.G., Van Rooj E.M.A., Van Rijn P.A. Clinical signs of bluetongue virus serotype 8 infection in sheep and goats. *Vet. Rec.* 2007; 161:1-3.
- Goffredo M., Meiswinkel R. Entomological surveillance of bluetongue in Italy: methods of capture, catch analysis and identification of *Culicoides* biting midges. *Vet. Ital.* 2004; 40:260-265.
- Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, bird and bees). Chapter 2.1.9. Fifth Edition. 2004; OIE. Paris. 195-210.
- Rawlings P. A key, based on wing patterns of biting midges (genus *Culicoides* Latreille – *Diptera: Ceratopogonidae*) in the Iberian Peninsula, for use in epidemiological studies. *Graellsia.* 1996; 52:57-71.
- Smernica Rady č. 2000/75/ES z 20. novembra 2000 stanovujúca špecifické ustanovenia pre kontrolu a likvidáciu katarálnej horúčky oviec – modrého jazyka (Úradný vestník Európskych spoločenstiev L327, 22.12.2000, s. 74-83).

# VPLYV JAČMEŇA A RAŽNÝCH OTRÚB OBOHATENÝCH $\gamma$ -LINOLÉNOVOU KYSELINOU NA LIPIDOVÝ METABOLIZMUS V UMELOM BACHORE (RUSITEC)

Laho T.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

## ABSTRAKT

V experimentoch sme skúmali vplyv substrátov pozostávajúcich z lúčneho sena (LS; 12,8 g sušiny (DM)/deň) a mletého jačmeňa (MJ; 3,2 g DM/deň) a LS a ražných otrúb (RO; 3,2 g DM/deň) na bachorový lipidový metabolizmus *in vitro*. Na *in vitro* pokusy sme použili bachor-simulujúce fermentačné zariadenie RUSITEC a bachorovú tekutinu fistulovaných oviec. V experimentálnych skupinách boli použité cereálie obohatené o nižšiu hubu *Thamnidium elegans* (LS+MJ-TE; LS+RO-TE), zástupcu radu *Zygomycetes*, produkujúcu  $\gamma$ -linolénovú kyselinu. Ako kontrola boli použité cereálie neobohatené hubou (LS+MJ; LS+RO). LS+MJ-TE substrát signifikantne nezvýšil denný výstup žiadnej mastnej kyseliny (MK) v efluente, avšak oproti kontrole znížil denné výstupy kyseliny linolovej (C18:2;  $P < 0,05$ ) a konjugovanej kyseliny linolovej (CLA; *cis*9 *trans*11 C18:2). LS+RO-TE substrát zvýšil denný výstup kyseliny  $\gamma$ -linolénovej (C18:3n-6, GLA;  $P < 0,05$ ) a kyseliny *cis*9 olejovej (C18:1;  $P < 0,01$ ) v efluente oproti kontrole. LS+RO-TE substrát zároveň znížil koncentráciu CLA ( $P < 0,001$ ) a kyseliny  $\alpha$ -linolénovej (C18:3n-3, ALA;  $P < 0,05$ ) v efluente. Výsledky ukázali, že ražné otruby obohatené hubou *Thamnidium elegans* pozitívne ovplyvnili denné výstupy GLA *in vitro*, avšak ani obohatený jačmeň ani ražné otruby signifikantne neovplyvnili biohydrogenáciu C18 nenasýtených mastných kyselín.

## ÚVOD

V súčasnosti sa kladú požiadavky na potraviny živočíšneho pôvodu, aby zabezpečovali nielen výživu ľudskej populácie, ale aby boli stále kvalitnejšie. Jednou z možností ovplyvňovania ich kvality, je znižovanie obsahu nasýtených a zvyšovanie obsahu zdraviu prospešných mono- a polynenasýtených mastných kyselín. Súčasný trend sa zameriava na diéty obohatené o esenciálne polynenasýtené mastné kyseliny, medzi ktoré patrí aj kyselina  $\gamma$ -linolénová (GLA). GLA je intermediárny metabolit premeny kyseliny linolénovej na kyselinu arachidonovú. Je známe, že jej deficit v ľudskom organizme vedie k poruchám kože, nervového, imunitného systému a iných orgánových systémov (Fan and Chapkin, 1998). Primárnym zdrojom GLA sú rastlinné oleje, ale aktívne v tvorbe mikrobiálneho oleja s obsahom GLA sú aj huby patriace do radu *Zygomycetes* (Certik a Adamechova, 2009). Cieľom našej práce bolo zistiť vplyv niektorých cereálií (mletý jačmeň a ražné otruby) obohatených hubou *Thamnidium elegans* produkujúcou GLA na lipidový metabolizmus a biohydrogenáciu (BH) jednotlivých mastných kyselín *in vitro* v umelom bachore.

## MATERIÁL A METÓDY

Jačmeň mletý (MJ) a ražné otruby (RO) inokulované hubou *Thamnidium elegans* (TE) CCF 1456 (Karlova Univerzita, Praha, CZ) doplnené lúčnym senom (LS) v množstve 12,8 g lúčneho sena (12,8 g sušiny (DM)/deň) a 3,2 g cereálie (LS+MJ-TE; LS+RO-TE) boli použité ako substráty v experimentoch *in vitro*. Kontrola nebola obohatená hubou (LS+MJ; LS+RO). Aby diéty mali 12% hrubého proteínu (CP; 1,92 g) dodali sme prídavok močoviny. Ako fermentačný *in vitro* systém bol použitý umelý bachor (RUSITEC). Bachorové inokulum bolo odobraté fistulovaným ovciam pred ranným kŕmením. V RUSITECu bol zabezpečený kontinuálny prívod McDougallovho pufru s pH 8.4 obohateného o mikroelementy (Jalč a kol., 2010). Adaptačná fáza trvala 5 dní a merania sa uskutočnili na 6. a 12. deň. V lyofilizovaných vzorkách efluentu sme stanovili koncentrácie vyšších mastných kyselín na plynovom chromatografe Perkin-Elmer Clarus 500 (Perkin-Elmer, Inc. Shelton, CN, USA). Hodnota biohydrogenácie jednotlivých MK

bola vypočítaná podľa vzorca (Loor a kol., 2003). Štatistická analýza bola urobená analýzou variancie (GraphPad Instat, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Lipidy v diétach podliehajú hydrolýze a sú biohydrogenované bachorovými mikroorganizmami na viac saturevané produkty s tvorbou intermediárnych metabolitov ako kyselina *trans*-vackénová (TVA) a konjugovaná kyselina linolová (CLA). Z našich výsledkov v Tabuľke č.1 je zrejmé, že LS+MJ-TE substrát signifikantne nezvýšil výstup žiadnej mastnej kyseliny, avšak oproti kontrole znížil výstupy kyseliny linolovej ( $P<0,05$ ) a CLA.

### Tabuľka č.1

Denný výstup mastných kyselín (mg/deň) a biohydrogenácia (%) jačmenného substrátu *in vitro*

	LS+MJ	LS+MJ-TE	SEM	P - hodnoty
C18:1 <i>trans</i> 9	0,021	0,03	0,006	Ns
TVA	11,5	10,3	2,07	Ns
C18:1 <i>cis</i> 9	8,30	9,03	1,23	Ns
CLA	0,52	0,16	0,11	*
C18:2	4,05	2,36	0,48	*
C18:3n-3 (ALA)	0,78	0,49	0,12	Ns
C18:3n-6 (GLA)	0,01	0,02	0,006	Ns
Biohydrogenácia mastných kyselín				
C18:1 <i>cis</i> 9	91,8	91,3	0,642	Ns
C18:2	94,8	95,1	0,321	Ns
C18:3n-3 (ALA)	91,5	91,0	0,682	Ns
TVA: <i>trans</i> 11 olejová; CLA: <i>cis</i> 9 <i>trans</i> 11 linolová; C18:3n-3 $\alpha$ -linolénová; C18:3n-6 $\gamma$ -linolénová; LS: lúčne seno; MJ: mletý jačmeň; TE: <i>Thamnidium elegans</i> ; NS: nesignifikantné; * $P<0,05$				

### Tabuľka č.2

Denný výstup mastných kyselín (mg/deň) and biohydrogenácia (%) ražného substrátu *in vitro*

	LS+RO	LS+RO-TE	SEM	P – hodnoty
C18:1 <i>trans</i> 9	0,008	0,04	0,013	Ns
TVA	16,0	14,2	2,1	Ns
C18:1 <i>cis</i> 9	5,70	10,2	1,06	**
CLA	0,59	0,23	0,06	***
C18:2	3,63	3,44	0,35	Ns
C18:3n-3 (ALA)	1,27	0,97	0,09	*
C18:3n-6 (GLA)	0,007	0,037	0,008	*
Biohydrogenácia mastných kyselín				
C18:1 <i>cis</i> 9	92,0	91,5	0,702	Ns
C18:2	94,6	94,5	0,546	Ns
C18:3n-3 (ALA)	82,8	83,4	0,682	Ns
TVA: <i>trans</i> 11 olejová; CLA: <i>cis</i> 9 <i>trans</i> 11 linolová; C18:3n-3 $\alpha$ -linolénová; C18:3n-6 $\gamma$ -linolénová; LS: lúčne seno; RO: ražné otruby; TE: <i>Thamnidium elegans</i> ; NS: nesignifikantné; * $P<0,05$ ; ** $P<0,01$ ; *** $P<0,001$				

Z našich výsledkov z Tabuľky č.2 vyplýva, že LS+RO-TE substrát zvýšil koncentráciu kyseliny  $\gamma$ -linolénovej ( $P<0,05$ ) a kyseliny *cis*9 olejovej ( $P<0,01$ ) oproti kontrole. LS+RO-TE substrát znížil koncentráciu CLA ( $P<0,001$ ) a kyseliny  $\alpha$ -linolénovej ( $P<0,05$ ).

Použitie cereálií obohatených hubami produkujúcimi mikrobiálny olej v našom experimente neovplyvnilo hodnoty BH na rozdiel od iných prác skúmajúcich priamy vplyv mikrobiálneho oleja na BH *in vitro* (Jalč a kol., 2009). Naše predchádzajúce výsledky (Laho a kol., 2010) ukázali, že podobne pšeničné substráty obohatené hubou *Thamnidium elegans* nemali vplyv na zvýšenie koncentrácií TVA a CLA *in vitro* a neovplyvnili hodnotu BH, avšak na druhej strane kukuričný substrát ovplyvnil denné výstupy mastných kyselín, ale neovplyvnil BH. Hubou obohatené ražné otruby v našom experimente zvýšili denné výstupy GLA podobne ako pšeničné a kukuričné substráty obohatené o mikrobiálnu GLA v našich predchádzajúcich pokusoch (Laho a kol., 2010).

Všetky doteraz získané výsledky so substrátmi obohatenými hubou *Thamnidium elegans* by mohli poukazovať na to, že cereálie obohatené o mikrobiálnu GLA môžu pozitívne ovplyvniť výstupy GLA *in vitro*, ale nemusia mať vplyv na BH mastných kyselín.

#### POĎAKOVANIE

Práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja (APVV 0043-07) a Vedeckou grantovou agentúrou Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied (VEGA 2/0009/08 a VEGA 2/0021/09). Ďakujeme doc. Ing. M. Čertíkovi PhD. a Ing. Z. Adamechovej z Fakulty potravinárskej a chemickej technológie STU v Bratislave za poskytnutie hubou *Thamnidium elegans* obohatených substrátov.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Certik M., Adamechova Z. Cereal-based bioproducts containing polyunsaturated fatty acids. *Lipid Technol.* 2009; 21:250-3.
- Fan Y.Y., Chapkin R.S. Importance of dietary gamma-linolenic acid in human health and nutrition. *J. Nutr.* 1998; 128:1411-4.
- Jalč D., Váradyová Z., Lauková A. Effect of inoculated corn silage enriched with sunflower oil on rumen fermentation and lipid metabolism in an artificial rumen (RUSITEC). *J. Sci. Food Agric.* 2010; 90:78-84.
- Jalč D., Čertík M., Kundříková K., Kubelková P. Effect of microbial oil and fish oil on rumen fermentation and metabolism of fatty acids in artificial rumen. *Czech J. Anim. Sci.* 2009; 54:229-37.
- Laho T., Váradyová Z., Mihaliková K., Kišidayová S., Adamechová Z., Čertík M., Jalč D. Effect of  $\gamma$ -linolenic acid enriched substrates on lipid metabolism *in vitro*. In *Animal Physiology 2010. Proceedings of International Conference, May 27-28 th. 2010, ISBN 978-80-7375-403-7, Valtice, Czech Republic*, s. 46.
- Loor J.J., Hoover W.H., Miller-Webster T.K., Herbein J.H., Polan C.E. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids in continuous culture fermenters during digestion of orchard grass or red clover with three levels of ground corn supplementation. *J. Anim. Sci.* 2003; 81: 1611-27.

# POLYMORFIZMUS DGAT-1 V CHOVE DOJNÍC SLOVENSKEHO STRAKATÉHO DOBYTKA

Lešková L.<sup>1</sup>, Bauer M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Klinika prežúvavcov UVLF, Košice, <sup>2</sup>Ústav genetiky a reprodukcie HZ, Centrum výskumu živočíšnej výroby, Nitra

## ABSTRAKT

V našej práci sme sa zaoberali polymorfizmom K232A v géne DGAT-1, jeho identifikáciou v súbore 42 dojníc plemena SSD a jeho krížencov a zhodnotením jeho vplyvu na vybrané biochemické parametre v krvnom sére v popôrodnom období. Bolo identifikovaných 38 homozygotov genotypu AA, 4 heterozygoti (AK) a ani jeden homozygot genotypu KK. U dojníc oboch skupín bola zaznamenaná zvýšená koncentrácia neesterifikovaných mastných kyselín, celkového bilirubínu a celkových imunoglobulínov a u skupiny s variantom AA aj pokles hodnôt triglyceridov. Zistené rozdiely medzi oboma skupinami neboli štatisticky významné. Vzhľadom na zistený nízky počet zvierat s genotypom AK nie sú dané zistenia smerodajné a je preto potrebné v štúdiu tejto problematiky pokračovať.

## ÚVOD

Väčšina biologických ciest je zložitým komplexom, t. j. je pod kontrolou siete navzájom spolupracujúcich génov, z ktorých každý osamote má len malý efekt a takisto je pod vplyvom environmentálnych faktorov, ako je napríklad výživa (Wu a Lin, 2006). V poslednom desaťročí lepšia dostupnosť molekulárno-biologických techník pridala pri chove a šľachtení dobytku ďalšie výberové kritérium – genomické údaje, ktoré môžu byť použité na selekciu založenú na génoch, či markeroch. Tento druh selekcie má základ v identifikácii génov/markerov, ktoré môžu ovplyvňovať ekonomicky významné znaky u dojníc (Oikonomou a kol., 2008).

O géne *DGATI*, ktorý sa nachádza na centromérovom konci bovinného chromozómu 14 (BTA14) (Boichard a kol., 2003) je známe, že kóduje acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferázu, enzým katalyzujúci posledný krok pri syntéze triglyceridov. Nekonzervatívna substitúcia lyzínu na alanín (p.Lys232Ala) v tomto géne má dokázateľne vplyv na metabolické cesty súvisiace s produkciou mlieka a zvlášť na obsah tuku v mlieku (Grisart a kol., 2002; Gautier a kol., 2007). Ashwell a kol. (2004) takisto popisuje možné pleiotropné efekty tohto polymorfizmu aj na reprodukčné parametre, čo je v súlade aj so zisteniami Kaupeho a kol. (2007). Aj podľa štúdie Oikonomou a kol. (2008) nimi skúmané polymorfizmy génov *DGATI* a receptora pre rastový hormón (*GHR*) môžu významne ovplyvniť určité energetické metabolické cesty, krvné ukazovatele a reprodukčné parametre dojníc.

Cieľom práce bolo zaoberať sa polymorfizmom K232A v géne DGAT-1, jeho identifikáciou v súbore 42 dojníc plemena SSD a jeho krížencov a zhodnotením jeho vplyvu na vybrané biochemické parametre v krvnom sére v popôrodnom období.

## MATERIÁL A METODIKA

V práci boli využité vzorky krvi odoberané punkciou v. *jugularis* od 42 dojníc plemena slovenský strakatý dobytok a ich krížencov na farme PD Nová Bodva. Priemerné produkcia mlieka bola 5 600 kg mlieka s priemernou tukovosťou 4% a obsahom bielkovín 3,5%. Dojnice boli v štádiu ranej laktácie (do 3 týždňov po otelení). Vybrané biochemické parametre boli stanovované v krvnom sére. Koncentrácia celkových bielkovín (CB), albumínu, kreatinínu, močoviny, glukózy,  $\beta$ -hydroxybutyrátu (BHB), neesterifikovaných mastných kyselín (NEFA), triglyceridov (TG) boli stanovované komerčne dostupnými kitmi spoločnosti Randox na automatickom analyzéri Alizé (sp. Lisabio); celkové imunoglobulíny (CIg) boli stanovované spektrofotometricky využitím zink-sulfátového testu; stanovenie hladiny bilirubínu a TL bolo realizované klasickou metódou. DNA bola izolovaná z celej krvi konzervovanej EDTA

komerčným kitom QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). DNA bola genotypizovaná pomocou RFLP na identifikáciu polymorfizmu K232A (Winter, 2002). Primery na amplifikáciu fragmentov DNA boli navrhnuté na základe štúdie Thallera a kol. (2003). Na štiepenie PCR produktu veľkosti 352 bp bola použitá *Cfr1* (MBI Fermentas); lyzínový variant zostal neštiepený, pri alanínovom variante boli výsledkom fragmenty s veľkosťou 198 a 154 bp. Na separáciu bol použitý gél s 2% agarózou a vizualizáciu SYBR Green (Invitrogen Life Technologies).

V oboch skupinách, t. j. v skupine homozygotov (AA) aj heterozygotov (AK) boli vypočítané priemerné hodnoty ( $\bar{x}$ ) a smerodajné odchýlky (sd). Na vyhodnotenie výsledkov bol použitý Studentov t-test pri hladine významnosti  $p < 0,05$ .

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Zo 42 dojníc iba 4 boli heterozygotné pre variant K232A, pričom neboli detekovaní homozygoti pre lyzínový variant KK. Ostatné dojnice boli homozygotné pre alanínový variant (AA). Tento genotyp výrazne prevažuje aj podľa zistenia Gautiera a kol. (2007) u býkov plemien montbeliarde a normandského dobytká, kde takisto nebol detekovaný genotyp KK. U holsteinského dobytká zaznamenali rovnomernejšiu distribúciu alel, kde 43% zvierat bolo heterozygotných a u 10% bol zistený variant KK.

U oboch skupín bola zaznamenaná zvýšená koncentrácia neesterifikovaných mastných kyselín, celkového bilirubínu a celkových imunoglobulínov a u skupiny s variantom AA aj pokles hodnôt triglyceridov. Sérová koncentrácia NEFA a BHB po otelení odráža stupeň lipomobilizácie (Pullen, 1990). Djokovic a kol. (2007) popisujú pozitívnu koreláciu medzi hladinou lipidov v pečeni a NEFA v krvi a negatívnu koreláciu medzi obsahom lipidov v pečeni a koncentráciou glukózy, TG a celkového cholesterolu v krvi. Oikawa a kol. (1997) popisujú zvýšenú koncentráciu NEFA a zníženú koncentráciu TG a celkového cholesterolu spolu s ďalšími zmenami pri výskyte syndrómu uľahnutia kráv a pri mliečnej horúčke. Koncentrácie vybraných parametrov vnútorného prostredia spolu s referenčnými hodnotami sú uvedené v Tab.1.

Podľa Studentovho t-testu neboli rozdiely medzi oboma skupinami pri hladine významnosti  $p < 0,05$  štatisticky významné, čo nepotvrdzuje zistenia Oikonomou a kol. (2008), ktorí popisali vplyv daného polymorfizmu o. i. aj na koncentráciu glukózy v sére dojníc po otelení. Avšak vzhľadom na malý počet zvierat v skupine heterozygotov nie je možné nami zistené výsledky hodnotiť ako smerodajné.

<i>parameter</i>	<b>Glu</b>	<b>TL</b>	<b>TG</b>	<b>NEMK</b>	<b>BHB</b>	<b>Bi</b>	<b>Clg</b>	<b>CB</b>	<b>Alb</b>	<b>Kreat</b>	<b>Ur</b>	
<i>ref.h.</i>	2,5- 4,2	1,5- 5,2	0,17- 0,51	0,10-0,35	do 1,0	do 5,13	18-26	70-90	30-45	88-177	3,6- 10,7	
<i>jednotky</i>	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	μmol/l	USZT	g/l	g/l	μmol/l	mmol/l	
<b>AA</b>	<b>x</b>	4,09	3,42	<b>0,16</b>	<b>0,42</b>	0,62	<b>8,8</b>	<b>26,7</b>	74,7	40,0	115,8	3,78
	<b>sd</b>	0,758	1,631	0,116	0,292	0,269	5,441	4,769	6,353	3,774	17,173	1,089
<b>AK</b>	<b>x</b>	3,79	2,92	0,17	<b>0,44</b>	0,60	<b>10,1</b>	<b>27,2</b>	74,3	37,6	98,0	4,05
	<b>sd</b>	0,210	1,004	0,184	0,132	0,297	2,764	3,912	3,729	2,674	10,756	1,380

**Tab.1.** Koncentrácie vybraných parametrov vnútorného prostredia;

AA – homozygoti, AK - heterozygoti, x – priemerná hodnota, sd – smerodajná odchýlka

Markermi asistovaná selekcia je trendom v selekcii zvierat na produkčné a reprodukčné znaky. Je však dôležité zamerať sa takisto na znaky zdravotné (negatívna energetická bilancia po pôrode, ketóza, steatóza pečene, a pod.). Je potrebné identifikovať jednotlivé kľúčové gény regulujúce procesy, ktoré sa podieľajú na vzniku a vývoji daných zdravotných porúch. V našej práci sa nepotvrdil súvis polymorfizmu K232A v géne DGAT-1 na biochemické ukazovatele, avšak dané výsledky nie sú relevantné vzhľadom na malý súbor zvierat. Takisto bolo takmer nemožné porovnať naše výsledky so závermi iných autorov, nakoľko je daná problematika len

okrajovo riešená v minime štúdií. Preto je podľa nášho názoru potrebné ďalej sa tejto téme venovať a tým rozširovať poznatky v tejto oblasti.

## POĎAKOVANIE

Táto práca bola riešená za podpory VEGA grantu č. 1/0614/09.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ashwell M S, Heyen D W, Sonstegard T S, Van Tassell C P, Da Y, Van Raden P M, Ron M, Weller J I, Lewin H A. Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. *J Dairy Sci.* 2004; 87:468–75.
- Boichard D, Grohs C, Bourgeois F, Cerqueira F, Faugeras R, Neau A, Rupp R, Amigues Y, Boscher M Y, Leveziel H. Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. *Genet Sel Evol.* 2003; 35:77–101.
- Djokovic R, Samanc H, Jovanovic M, Nicolic Z. Blood concentrations of thyroid hormones and lipids and content of lipids in the liver in dairy cows in transition period. *Acta Vet Brno.* 2007; 76 (4):525 – 532.
- Gautier M, Capitan A, Fritz S, Eggen A, Boichard D, Druet T. Characterization of the DGAT1 K232A and variable number of tandem repeat polymorphisms in French dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2007; 90:2980–2988.
- Grisart B, Coppieters W, Farnir F, Karim L, Ford C, Berzi P, Cambisano N, Mni M, Reid S, Simon P, Spelman R, Georges M, Snell R. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res.* 2002; 12:222–31.
- Kaupe B, Brandt H, Prinzenberg E M, Erhardt G. Joint analysis of the influence of CYP11B1 and DGAT1 genetic variation on milk production, somatic cell score, conformation, reproduction and productive lifespan in German Holstein cattle. *J Anim Sci.* 2007; 85:11–21.
- Oikawa S, Katoh H. Reduced concentrations of apolipoproteins B-100 and A-I serum from cows with retained placenta. *Can J Vet Res.* 1997; 61(4):312 – 314.
- Oikonomou G, Angelopoulou K, Arsenos G, Zygoiannis D, Banos G. The effects of polymorphisms in the DGAT1, leptin and growth hormone receptor gene loci on body energy, blood metabolic and reproductive traits of Holstein cows. The Authors Journal compilation, International Society for Animal Genetics, *Anim Genet.* 2008; 40:10–17.
- Pullen D L, Liesman J S, Emery R S. A species comparison of liver slice synthesis and secretion of triacylglycerol from nonesterified fatty acids in media. *J Anim Sci.* 1990; 68:1395–1399.
- Thaller G, Krämer W, Winter A, Kaupe B, Erhardt G, Fries R. Effects of DGAT1 variants on milk production traits in German cattle breeds. *J Anim Sci.* 2003; 81:1911-1918.
- Winter A, Kramer W, Werner F A, Kollers S, Kata S, Durstewitz G, Buitkamp J, Womack J E, Thaller G, Fries R. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2002; 99:9300–9305.
- Wu R, Lin M. Functional mapping – how to map and study the genetic architecture of dynamic complex traits. *Nat Rev Genet.* 2006; 7(3):229-237.



## IDENTIFIKÁCIA A GENETICKÁ CHARAKTERIZÁCIA PRVÉHO PESTIVÍRUSU Z OVIEC NA SLOVENSKU

Lešková V., Vlasáková M., Jacková A., Vilček Š.

*Ústav epizootológie a preventívnej veterinárskej medicíny*

### ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bolo identifikovať a na molekulovo-genetickej úrovni charakterizovať prvý slovenský pestivírusový izolát z oviec. Osekvenovaný bol 5480 nukleotidov dlhý fragment, ktorý predstavuje kompletnú sekvenciu 5'NTR–NS2 oblasti pestivírusového genómu. Analyzovaná bola 5' nekódujúca oblasť, gén pre autoproteázu N<sup>pro</sup>, štruktúrne gény (C, E<sup>ms</sup>, E1, E2) a neštruktúrny NS2 proteín. Genetická analýza neodhalila žiadne inzercie/delécie v oblasti NS2, ani vo zvyšnej časti osekvenovaného genómu. Dĺžka sekvencií jednotlivých génov sa zhodovala s dĺžkou sekvencií u referenčného BDV kmeňa X818. Analýza aminokyselinových sekvencií v oblasti štiepných miest medzi jednotlivými proteínmi, ktoré sú u pestivírusov pomerne konzervované, aj u slovenského izolátu odhalila len niekoľko mutácií. Na základe fylogenetických analýz 5'NTR, N<sup>pro</sup> a E2 oblastí bol slovenský izolát zaradený do genotypu BDV-3, kam spadajú aj izoláty zo Švajčiarska, Rakúska, Francúzska a izolát Gifhorn z Nemecka.

### ÚVOD

Do rodu *Pestivirus* z čeľade *Flaviviridae* sú zaradované 4 schválené druhy: vírus hnačky hovädzieho dobytku typu 1 (BVDV-1) a typu 2 (BVDV-2), vírus klasického moru ošípaných (CSFV) a vírus border choroby oviec (BDV) a jeden predbežný druh „Giraffe“ (Fauquet a kol., 2005). Pestivírusy nie sú striktné druhovo špecifické (Paton, 1995) a infikujú hospodárske ako aj divo žijúce zvieratá (Vilček a Nettleton, 2006). Všetky pestivírusy sú ekonomicky významné patogény, ktoré spôsobujú značné straty v chovoch hovädzieho dobytku, ošípaných a oviec (Moennig a Plagemann, 1992).

BDV spôsobuje border chorobu u oviec a kôz. Klinické príznaky u oviec zahŕňajú aborty, narodenie mŕtvych alebo málo životaschopných jahniat, neurologické príznaky, poruchy ovlnenia, netypickú pigmentáciu kože, abnormálne anatomické znaky a perzistentnú infekciu potomkov (Nettleton a kol., 1998).

Genóm pestivírusov tvorí jednovláknová RNA pozitívnej polarita s dĺžkou v rozmedzí 12,3 – 12,5 kb. Jediný otvorený čítací rámec kóduje polyproteín okolo 4000 aminokyselín dlhý, ohraničený 5' a 3' nekódujúcou oblasťou (NTR). Polyproteín je štiepený vírusovými a bunkovými proteázami na 11–12 štruktúrnych a neštruktúrnych proteínov (N<sup>pro</sup>, C, E<sup>ms</sup>, E1, E2, p7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A a NS5B) (Meyers a Thiel, 1996).

Na základe súčasných poznatkov boli BDV izoláty rozdelené najmenej do šiestich genotypov (Arnal a kol., 2004; Becher a kol., 2003; Dubois a kol., 2008). Osobitné fylogenetické skupiny tvoria izoláty z Talianska (De Mia a kol., 2005), Tuniska (Thabti a kol., 2005) a z Turecka (Oguzoglu a kol., 2009). Rozšírenie jednotlivých BDV genotypov je z geografického hľadiska pomerne dobre preskúmané v západnej Európe. Málo informácií je však zo štátov strednej a východnej Európy. V rámci strednej Európy sú informácie zatiaľ dostupné len z Nemecka, Švajčiarska a Rakúska, zatiaľ čo zo Slovenska a jeho okolitých štátov neboli na genetickej úrovni analyzované žiadne BDV izoláty.

Cieľom tejto práce bolo na genetickej úrovni charakterizovať prvý slovenský pestivírusový izolát z oviec a zistiť jeho fylogenetický vzťah k ostatným pestivírusom, ktoré boli doteraz izolované z rôznych druhov zvierat po celom svete.

## MATERIÁL A METODIKA

Pôvod vzorky: Vírusový kmeň (izolát č. 297) analyzovaný v tejto štúdií, bol izolovaný zo séra ovce zo stredného Slovenska v roku 2007 ŠVÚ vo Zvolene. Po predchádzajúcej detekcii pestivírusu sérologickými a molekulovo-genetickými metódami nám bol vírusový kmeň poskytnutý za účelom podrobnejšej analýzy na genetickej úrovni.

Izolácia celkovej RNA a syntéza cDNA: Celková RNA bola izolovaná TRIzol™ reagensiou (Invitrogen, San Diego, CA, USA) podľa pokynov výrobcu. Na syntézu cDNA boli použité náhodné hexaméry a transkriptáza SuperScript II RT (Invitrogen).

Amplifikačná stratégia: 5'NTR – NS2 oblasť bola amplifikovaná pomocou klasickej, nested alebo semi-nested PCR s využitím pestivírus-špecifických a BDV-špecifických primerov, vybraných na základe údajov získaných z parciálnych sekvencií izolátu 297 a zo sekvencií pestivírusových kmeňov dostupných v databáze GenBank.

Podmienky amplifikácie: Mix (50 µl) pre prvú PCR obsahoval 10 µl reakčného pufru (Finnzymes), 0,2 nM dNTP, 300 nM z každého primeru, 0,5 U Phusion High-Fidelity DNA polymerázy (Finnzymes, Finland) a 4 µl cDNA. Prvá PCR prebehla v 35 cykloch v teplotnom režime: 98 °C 30 s – 2 min (v závislosti od dĺžky amplifikovaného fragmentu), 98 °C 10 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s – 2 min a finálna extenzia 72 °C 10 min. V druhej PCR boli v 40 cykloch za rovnakých podmienok amplifikované 2 µl produktu z prvej PCR.

Sekvenovanie PCR produktov: PCR produkty boli sekvenované Sangerovou metódou komerčnou firmou. Nukleotidové sekvencie boli editované programom SeqMan II (DNASTAR, Lasergene, USA) a porovnávané s inými sekvenciami získanými z GenBanku s využitím programu MegAlign (DNASTAR).

Fylogenetická analýza: Fylogenetické stromy boli skonštruované s použitím programu NEIGHBOR (PHYLIP) založeného na základe neighbor-joining algoritmu, s použitím Kimura-2 parametra (Kimura, 1980). Štatistické analýzy fylogenetických stromov boli prevedené s 1000 replikátmi s použitím programov SEQBOOT a CONSENCE (PHYLIP) (Felsenstein, 1985). Do fylogenetických analýz boli zahrnuté sekvencie reprezentatívnych pestivírusových kmeňov, ktoré sú dostupné v databáze GenBank.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V tejto práci bol identifikovaný a na molekulovo-genetickej úrovni charakterizovaný prvý slovenský pestivírusový izolát z oviec. Osekvenovaný bol 5480 nukleotidov dlhý fragment pestivírusového genómu. Analyzovaná bola 5' nekódujúca oblasť, gén pre autoproteázu N<sup>pro</sup>, štruktúrne gény (C, E<sup>ms</sup>, E1, E2) a neštruktúrny proteín NS2.

Pri porovnaní sekvencií jednotlivých génov na nukleotidovej a aminokyselinovej úrovni neboli v osekvenovanej časti genómu pozorované žiadne inzercie/delécie, ktoré sa najčastejšie nachádzajú v oblasti NS2 (Meyers a Thiel, 1996). Dĺžka jednotlivých génov slovenského izolátu bola rovnaká ako dĺžka génov referenčného BDV kmeňa X818 (N<sup>pro</sup> = 168 aa, C = 100 aa, E<sup>ms</sup> = 227 aa, E1 = 195 aa, E2 = 373 aa, p7 = 70 aa, NS2 = 453 aa) (Becher a kol., 1998). Pri analýze aminokyselinových sekvencií v oblasti štiepných miest medzi jednotlivými proteínmi slovenského izolátu, bolo pozorovaných niekoľko mutácií. Najvariabilnejší bol N-koniec oblastí kódujúcich proteíny NS2 a p7 a C-koniec oblastí kódujúcich proteíny C a E2. Pozorované výsledky sú v zhode so všeobecne známym poznatkom, že aminokyselinové sekvencie v oblasti štiepných miest medzi pestivírusovými proteínmi sú konzervované (Becher a kol., 1998).

Na základe genetickej a fylogenetической analýzy 5'NTR, N<sup>pro</sup> a E2 oblasti bol slovenský izolát zaradený k BDV, do genotypu BDV-3. Vzhľadom na to, že pestivírusy nie sú druhovo špecifické, nie vždy je u oviec detegovaný len BDV. V niektorých prípadoch bol pestivírus izolovaný z oviec typizovaný ako BVDV-1 prípadne BVDV-2 (Vilček a kol., 1997). Navyše, ak sú ovce chované spolu s hovädzím dobytkom, môže dôjsť k medzidruhovému prenosu vírusu. V krajinách, kde sú zavedené štátne programy na eradikáciu BVDV u hovädzieho dobytku (napr.

Nemecko, Rakúsko, Škandinávia), Krametter-Froetscher a kol. (2008) odporúča monitorovanie pestivírusov aj u oviec. Na Slovensku BVDV eradikačný program zatiaľ nebol zavedený.

V rámci Európy genotyp BDV-3 cirkuluje vo Francúzsku, Nemecku, Švajčiarsku a Rakúsku (Becher a kol., 2003; Dubois a kol., 2008; Krametter-Froetscher a kol., 2007; Stalder a kol., 2004). Čo sa týka Slovenska a väčšiny jeho susedných štátov, izolát 297 predstavuje jediný BDV kmeň, ktorý bol detegovaný a analyzovaný na genetickej úrovni.

Genetické údaje prezentované v tejto práci rozšíria spektrum informácií o genóme pestivírusov, obzvlášť o BDV cirkulujúcich v strednej Európe. Tieto poznatky môžu byť využité pri vývoji nových diagnostických metód na detekciu, ako aj pre pochopenie molekulárnej epidemiológie pestivírusov.

## POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla s podporou projektu „INFEKTZOON – centrum excelentnosti pre nákazy zvierat a zoonózy“, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Arnal MC, Fernandez-de-Luco D, Riba L, Maley M, Gilray J, Willoughby K, Vilček Š, Nettleton PF. A novel pestivirus associated with deaths in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*). *J Gen Virol.* 2004; 85:3653-3657.
- Becher P, Orlich M, Thiel HJ. Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *J Virol.* 1998; 72:5165-5173.
- Becher P, Ramirez RA, Orlich M, Rosales SC, Konig M, Schweizer M, Stalder H, Schirrmeyer H, Thiel HJ. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology.* 2003; 311:96-104.
- De Mia GM, Greiser-Wilke I, Feliziani F, Giammarioli M, De Giuseppe A. Genetic characterization of a caprine Pestivirus as the first member of a putative novel pestivirus subgroup. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2005; 52:206-210.
- Dubois E, Russo P, Prigent M, Thiery R. Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006. *Vet Microbiol.* 2008; 130:69-79.
- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. 8th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press. 2005; s. 1162.
- Felsenstein J. Confidence-limits on phylogenies - an approach using the bootstrap. *Evolution.* 1985; 39:783-791.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980; 16:111-20.
- Krametter-Froetscher R, Kohler H, Benetka V, Moestl K, Golja F, Vilček Š, Baumgartner W. Influence of communal alpine pasturing on the spread of pestiviruses among sheep and goats in Austria: First identification of border disease virus in Austria. *Zoonoses Public Health.* 2007; 54:209-213.
- Krametter-Froetscher R, Schmitz C, Benetka V, Bago Z, Moestl K, Vanek E, Baumgartner W. First descriptive study of an outbreak of Border disease in a sheep flock in Austria - a high risk factor for Bovine viral diarrhoea virus free cattle herds: a case report. *Vet Med (Praha).* 2008; 53:625-628.
- Meyers G, Thiel HJ. Molecular characterization of pestiviruses. *Adv Virus Res.* 1996; 47:53-118.
- Moennig V, Plagemann PGW. The Pestiviruses. *Adv Virus Res.* 1992; 41:53-98.
- Nettleton PF, Gilray JA, Russo P, Dliissi E. Border disease of sheep and goats. *Vet Res.* 1998; 29:327-340.
- Oguzoglu TC, Tan MT, Toplu N, Demir AB, Bilge-Dagalp S, Karaoglu T, Ozkul A, Alkan F, Burgu I, Haas L, Greiser-Wilke I. Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: A new BDV subgroup? *Vet Microbiol.* 2009; 135:374-379.
- Paton DJ. Pestivirus diversity. *J Comp Pathol.* 1995; 112:215-236.
- Stalder HP, Meier P, Pfaffen G, Wageck-Canal C, Rufenacht J, Schaller P, Bachofen C, Marti S, Vogt HR, Peterhans E. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. 2<sup>nd</sup> European Symposium on Bovine Virus Diarrhoea Virus (BVDV) Control. 2004; 37-41.

Thabti F, Letellier C, Hammami S, Pepin M, Ribiere M, Mesplede A, Kerkhofs P, Russo P. Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep. *Arch Virol.* 2005; 150:215-229.

Vilček Š, Nettleton PF. Pestiviruses in wild animals. *Vet Microbiol.* 2006; 116:1-12.

Vilček Š, Nettleton PF, Paton DJ, Belák S. Molecular characterization of ovine pestiviruses. *J Gen Virol.* 1997; 78:725-735.

## VPLYV TRANSPORTNÉHO STRESU NA PRIEBEH ZRENIA SVALOVINY KRÁLIKOV DIVÝCH (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*)

Mačanga J., Koréneková B.

*Katedra hygieny a technológie potravín, Ústav hygieny a technológie mäsa, UVL, Košice*

### ABSTRAKT

Cieľom našej práce bolo zistiť, či stres vyvolaný transportom má vplyv na priebeh zrecieho procesu svaloviny králikov divých (*Oryctolagus cuniculus*). Po zabití a ošetrení boli telá králikov skladované pri teplote 4 °C. V prvý deň (12 hodín po zabití), následne na 7. a na 14. deň sme odobrali vzorky svaloviny z oblasti stehna, chrbta a lopatky. Vo svalovine sme sledovali pH a elektroforetickou analýzou koncentráciu kyseliny mliečnej a kyseliny fosforečnej. Hodnota pH sa počas 14-dňového obdobia pohybovala nad hodnotou 6. Do značnej miery to bolo spôsobené nízkou koncentráciou kyseliny mliečnej a kyseliny fosforečnej. Dvanásť hodín po zabití sa koncentrácia laktátu pohybovala na úrovni od 0,72 (lopatková svalovina) do 0,91 g.100g<sup>-1</sup> (stehenná svalovina). Na 7. deň pokusu sme zaznamenali vzostup koncentrácie laktátu na úroveň maximálne 1,23 g.100g<sup>-1</sup> (chrbtová svalovina). Na 14. deň zrecieho procesu množstvo kyseliny mliečnej pokleslo a najnižšiu hodnotu sme namerali v lopatkovej svalovine (0,74 g.100g<sup>-1</sup>). Koncentrácia kyseliny fosforečnej klesala počas celého zrecieho procesu z maximálnych 0,73 g.100g<sup>-1</sup> (stehenná svalovina) na hodnotu 0,38 g.100g<sup>-1</sup> (lopatková svalovina). Z našich výsledkov vyplýva, že transportný stres má nepriaznivý vplyv na koncentráciu kyseliny mliečnej a kyseliny fosforečnej, ktoré vznikajú počas zrecieho procesu. S tým úzko súvisí vysoká hodnota pH svaloviny králikov divých, na základe čoho môžeme predpokladať zhoršené kvalitatívne vlastnosti mäsa a taktiež zníženú údržnosť.

### ÚVOD

Jedným z najkritickejších faktorov, ktoré ovplyvňujú kvalitu mäsa po zabití je priebeh jeho zrenia (Atanassova a kol., 2008). Pod pojmom zrenie rozumieme dlhodobý biochemický proces, výsledkom ktorého je premena svaloviny na mäso. Takmer všetky hlavné zložky svaloviny podliehajú biochemickým zmenám a vznikajúce metabolické produkty prispievajú k typickým senzoričným vlastnostiam mäsa (Čuboň a kol., 2004). Ako významný faktor, ktorý vplyva na priebeh zrecieho procesu svaloviny a na nutričnú hodnotu mäsa vystupuje stres počas prepravy zvierat, či manipulácie pred porážkou (Sopková a kol., 2002; Sopková, 2008). Stresové situácie môžu ovplyvniť jednotlivé metabolické parametre ako je napríklad množstvo svalového glykogénu (Poráčová a kol. 2007), čo má vplyv na výslednú kvalitu mäsa. Množstvo glykogénu prítomného vo svaloch v čase zabíjania má veľký značný vplyv na hodnotu pH. Nízka koncentrácia glykogénu má za následok vyššie hodnoty pH, čo sa v konečnom dôsledku prejaví zhoršenou senzoričnou kvalitou a údržnosťou mäsa.

Cieľom našej práce bolo sledovať vplyv transportu na vybrané fyzikálno-chemické zmeny vo svalovine králikov divých počas 14-dňového zrecieho procesu.

### MATERIÁL A METODIKA

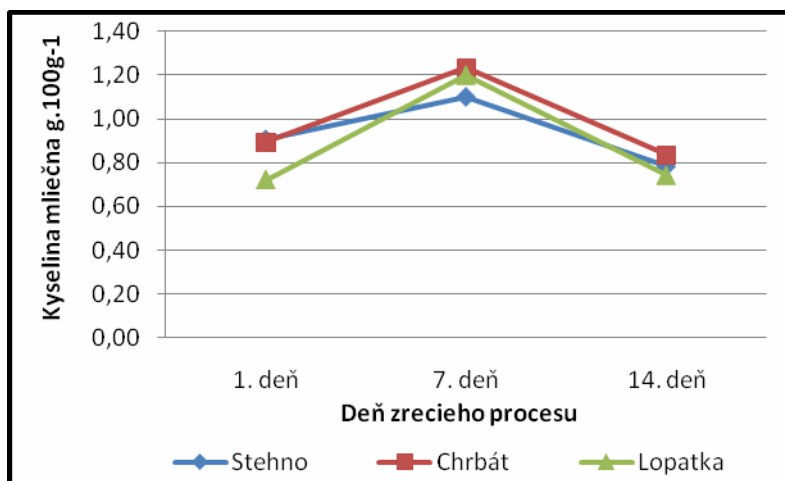
Králiky divé (*Oryctolagus cuniculus*) v počte 12 kusov boli pred zabitím prepravené z Nítry do Košíc. Transport trval 7 hodín a konal sa začiatkom júla v ranných hodinách. Králiky boli počas prepravy umiestnené v drevených prepravných boxoch (70 cm x 70 cm x 30 cm) po 4 ks. Králiky boli po omráčení zabité vykrcením. Po ošetrení boli telá králikov skladované v chladničke pri 4 °C. Teplota počas experimentu bola monitorovaná prístrojom Testo 175. Vzorky stehennej, lopatkovej a chrbtovej svaloviny boli odoberané v deň analýzy (12 hodín po zabití, na 7. a na 14. deň po zabití). Vzorky sme zhomogenizovali a na analýzu sme navážili 10 g svaloviny. Sledované analyty sme získali extrakciou z vodného výluhu. Po zmeraní pH (pH-meter - InoLab WTW 720) sme výluh 100 násobne zriedili. Takto nariadené vzorky sme

aplikovali do Elektroforetického analyzátoru EA102 (Villa Labeco, SR) s vodivostným detektorom. Ako vodiaci elektrolyt bol použitý roztok 10 mM HCL,  $\beta$ -alanín a 0,1 % mHEC a zakončujúci elektrolyt roztok 5 mM kyselina kaprónová a 5 mM TRIS. Výsledky z elektroforetického analyzátoru boli vyhodnotené v programe ITPPro 32 a štatisticky analyzované v programe Microsoft Excel 2007 použitím Studentovho *t*-testu a ďalších variačno-štatistických charakteristík (aritmetický priemer, smerodajná odchýlka).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V prvých dňoch zrecieho procesu dochádzalo k enzymatickej premene glykogénu na kyselinu mliečnu, ktorej množstvo počas prvých siedmych dní vo svalovine králikov stúpalo, ako sa uvádza v grafe 1. Po 12 hodinách skladovania pri teplote 4°C dosiahla koncentrácia kyseliny mliečnej v stehennej svalovine hodnotu  $0,91 \pm 0,15 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  vzorky, v chrbtovej svalovine hodnotu  $0,89 \pm 0,17 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  a vo svalovine lopatky  $0,72 \pm 0,15 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ . Na siedmy deň sme zaznamenali vzostup v koncentrácii na úroveň  $1,10 \pm 0,20 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  v stehennej svalovine,  $1,23 \pm 0,16 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  v chrbtovej svalovine ( $p \leq 0,05$ ) a vo svalovine lopatky na úroveň  $1,20 \pm 0,17 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  ( $p \leq 0,001$ ). Následne na 14. deň zrecieho procesu došlo vo všetkých svalovinách k zníženiu koncentrácie laktátu. V stehennej svalovine sme zaznamenali pokles na úroveň  $0,78 \pm 0,13 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  ( $p \leq 0,05$ ), v chrbtovej svalovine na úroveň  $0,83 \pm 0,09 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  ( $p \leq 0,01$ ) a v lopatkovej svalovine klesla koncentrácia kyseliny mliečnej na  $0,74 \pm 0,18 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  ( $p \leq 0,01$ ).

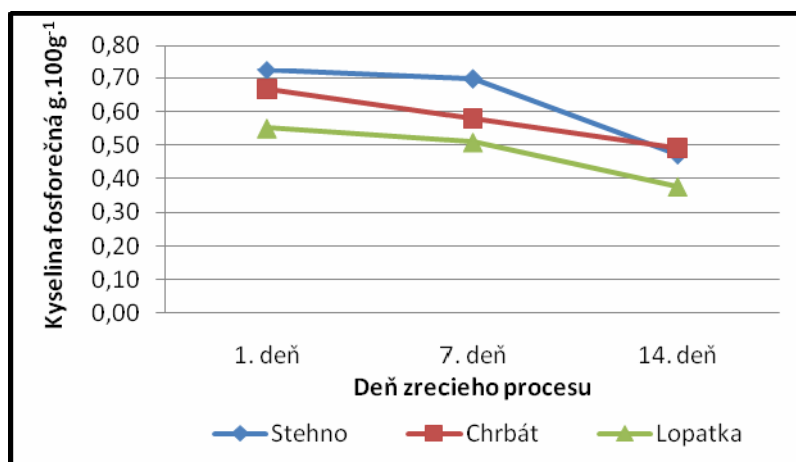
Graf 1 Dynamika kyseliny mliečnej ( $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) počas zrecieho procesu vo svalovine králikov divých (*Oryctolagus cuniculus*)



Koncentrácia konečného produktu glykogenolýzy (kyseliny mliečnej) sa zvyšuje simultánne s poklesom koncentrácie glykogénu vo svalovine (Schäfer a kol., 2002). Relatívne nízku koncentráciu laktátu vo svalovine počas zrecieho procesu si vysvetľujeme malým množstvom prítomného glykogénu, ktorého časť mohla byť odbúraná dôsledkom transportného stresu.

Koncentrácia kyseliny fosforečnej klesala počas celého monitorovaného obdobia (graf 2). V prvý deň experimentu (12 hodín po zabití) sme v stehennej svalovine namerali hodnotu  $0,73 \pm 0,08 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ , v chrbtovej svalovine  $0,67 \pm 0,08 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  a vo svalovine lopatky  $0,55 \pm 0,08 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ . Na 7. deň zrecieho procesu sme zaznamenali pokles koncentrácie kyseliny fosforečnej na úroveň  $0,70 \pm 0,11 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  v stehennej svalovine,  $0,58 \pm 0,08 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  v chrbtovej svalovine a  $0,51 \pm 0,06 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  v lopatkovej svalovine. Zníženie koncentrácie kyseliny fosforečnej sme pozorovali aj na 14. deň pokusu. V stehennej svalovine sme zaznamenali hodnotu  $0,47 \pm 0,11 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  ( $p \leq 0,05$ ), v chrbtovej svalovine  $0,49 \pm 0,04 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  a v lopatkovej svalovine  $0,38 \pm 0,02 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  ( $p \leq 0,05$ ).

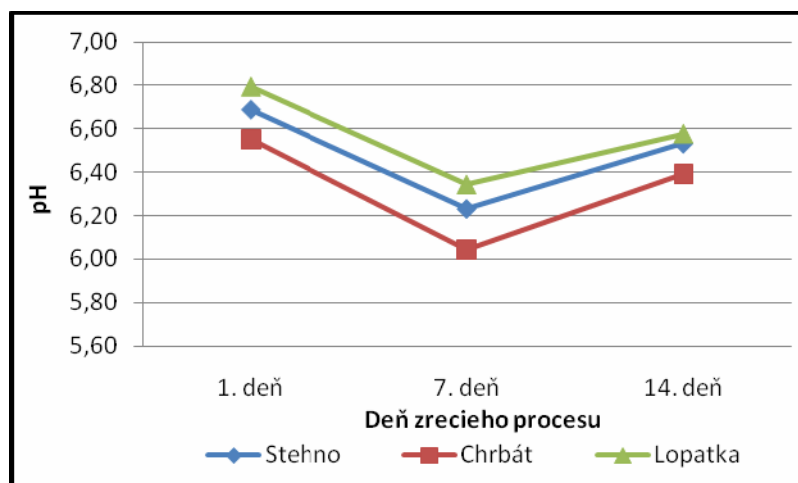
Graf 2 Dynamika kyseliny fosforečnej (g.100g<sup>-1</sup>) počas zrecieho procesu vo svalovine králikov divých (*Oryctolagus cuniculus*)



Kyselina fosforečná vzniká vo svalovine pri odbúravaní energeticky bohatých fosfátov (ako je ATP), ktoré pôsobia ako regulátory vápnikovej pumpy a tak udržiavajú aktín a myozín v disociovanom stave. Po zabití koncentrácia energeticky bohatých fosfátov klesá, výsledkom čoho je nástup *rigor mortis* (Šimek a kol., 2002). Koncentrácia ATP sa po 24 hodinách od zabitia približuje 0. Na druhej strane, sa počas prvých 24 hodín zrecieho procesu zvyšuje množstvo produktov, ktoré vznikajú odbúravaním ATP, ako je kyselina fosforečná (Schäfer a kol., 2002). Predpokladáme, že kontinuálny pokles koncentrácie kyseliny fosforečnej vo svalovine králikov divých počas zrecieho procesu bol v našom pokuse spôsobený vyčerpaním všetkých zásob energeticky bohatých fosfátov vo svalovine.

Koncentrácia kyseliny mliečnej a kyseliny fosforečnej do značnej miery ovplyvňuje hodnotu pH (Šimek a kol., 2002), ktorá patrí medzi významné ukazovatele kvality mäsa. Dynamiku hodnoty pH počas zrecieho procesu svaloviny králikov divých znázorňuje graf 3.

Graf 3 Hodnota pH počas zrecieho procesu vo svalovine králikov divých (*Oryctolagus cuniculus*)



Dvanásť hodín po zabití bola hodnota pH v stehennej svalovine  $6,69 \pm 0,03$ ; v chrbtovej svalovine  $6,55 \pm 0,38$  a v lopatkovej svalovine  $6,79 \pm 0,05$ . Na siedmy deň pokusu sme zaznamenali štatisticky významný pokles pH v lopatkovej svalovine ( $6,34 \pm 0,21$ ;  $p \leq 0,01$ ) a v stehennej svalovine ( $6,23 \pm 0,24$ ;  $p \leq 0,05$ ). V chrbtovej svalovine poklesla hodnota pH na úroveň  $6,04 \pm 0,32$ . S klesajúcou koncentráciou kyseliny mliečnej a fosforečnej hodnota pH stúpala až do 14. dňa zrecieho procesu. Najvyššiu hodnotu pH sme zaznamenali na 14. deň

v lopatkovej ( $6,57 \pm 0,12$ ) a v stehennej svalovine ( $6,53 \pm 0,16$ ). Hodnota pH svaloviny chrbta bola mierne nižšia ( $6,39 \pm 0,10$ ). Vplyv transportu na výslednú kvalitu mäsa králikov potvrdzuje aj práca Lambertini a kol., (2006), ktorí sledovali jednotlivé ukazovatele kvality mäsa po 1, 2 a 4 hodinovom transporte. Hodnoty pH sú v porovnaní s našimi nižšie, čo môže byť spôsobené mesiacom, kedy sa transport konal (apríl), ako aj kratšou dobou transportu králikov.

Kvalita mäsa králikov divých vo veľkej miere závisí od množstva prítomných energetických zásob vo svalovine. Stres spôsobuje, že tieto energetické zásoby (glykogén a energeticky bohaté fosfáty) sú odbúravané už pred zabitím, čo má nepriaznivý dopad na priebeh zrecieho procesu a následne aj na výslednú kvalitu mäsa. Z našich výsledkov vyplýva, že transportný stres znižuje množstvo glykogénu a energeticky bohatých fosfátov, nakoľko nami zistená koncentrácia metabolitov vznikajúcich pri ich odbúravaní *post mortem* bola počas zrecieho procesu relatívne nízka. Nízke hodnoty koncentrácie kyseliny mliečnej a fosforečnej sa nepriaznivo odzrkadlili aj na relatívne vysokej hodnote pH. Na základe zistených výsledkov môžeme predpokladať, že údržnosť mäsa bude v dôsledku vyšších hodnôt pH znížená. Práve preto je potrebné pred zabitím eliminovať situácie vyvolávajúce u králikov stres, čím sa zabezpečí produkcia kvalitného mäsa.

#### POĎAKOVANIE

Spracovanie príspevku bolo podporené projektom VEGA 1/0403/08.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

Atanassova V, Apelt J, Reich F, Klein G. Microbiological quality of freshly shot game in Germany. *Meat Science*, 2008; 78: 414–419.

Čuboň J, Haščík P, Mojto J, Kačániová M, Vagač V, Košťalová D, Pavličová S. Vplyv mliečnanu sodného na mikrobiologické, fyzikálne a zmyslové vlastnosti hovädzieho mäsa. *Acta fytotechnica et zootechnica*, 2004; 3: 62–66.

Lambertini L, Vingola G, Badiani A, Zaghini G, Formigoni A. The effect of journey and stocking density during transport on carcass and meat quality in rabbits. *Meat Science* 2006; 72: 641-646.

Poráčová J, Šutiaková I, Zahatňanská M, Blaščáková M, Taylorová B. Ochrana zvierat a welfare. VFU Brno, 2007; 126-129.

Schäfer A, Rosenvold K, Purslow P, Andersen H, Henckel P. Physiological and structural events post mortem of importance for drip loss in pork. *Meat Science* 2002; 61: 355-366.

Sopková D, Várady J, Pástorová B, Staníková A, Kožárová I. Stress and amino-acid values of poultry meat. *Folia Veterinaria* 2002; 46: 53-54.

Sopková D. Vplyv stresu na nutričnú hodnotu bravčového mäsa. Smolenice, 2008, 23. Dni živočíšnej fyziológie, 22-24. 10. 2008, Smolenice, s.18.

Šimek J, Vorlová L, Steinhauser L. Jakostní odchylky masa a jejich identifikace. *Maso* 2002; 4: 24–27.



# INVERZNÁ PCR VS. VECTORETTE PCR V „GENOME WALKING“ EXPERIMENTE ŠTUDUJÚCOM ENTEROLYZÍNŮVÝ OPERÓN U *E. FAECALIS*

Maliničová L., Nigutová K.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

## ABSTRAKT

Enterolyzín A (EnlA) patrí do skupiny peptidoglykánových hydroláz, enzýmov rozkladajúcich najdôležitejšiu zložku bakteriálnych bunkových stien, peptidoglykán. Je zaraďovaný medzi bakteriocíny, aj keď svojou štruktúrou skôr pripomína bakteriofágové endolyzíny. V našej práci sme sa zamerali na štúdium bezprostredného okolia génu *enlA*, s cieľom nájsť gény typické pre bakteriofágy, alebo na druhej strane vyskytujúce sa v bakteriocínových operónoch. Využili sme dve „genome walking“ techniky, inverznú PCR a vectorette PCR. Sekvencie získaných PCR amplikónov sme porovnali so sekvenciami dostupnými v databáze NCBI. V blízkosti génu *enlA* sme našli gén kódujúci proteín, ktorý sa uplatňuje v procese dozrievania bakteriocínov, no nenašli sme žiadne gény kódujúce bakteriofágové, alebo im podobné proteíny. Výsledky naznačujú, že enterolyzín A nemá fágový pôvod, ale pravdepodobne patrí medzi pravé bakteriocíny. Z hľadiska časovej náročnosti a úspešnosti dosiahnutia výsledkov sa v porovnaní s inverznou PCR, vectorette PCR ukázala ako výhodnejšia a dômyselnejšia metóda.

## ÚVOD

Genome walking predstavuje základnú molekulárno-biologickú techniku, založenú na postupnom stanovení neznámych nukleotidových sekvencií, susediacich so známymi oblasťami DNA. Na tento účel bolo vyvinutých niekoľko metód založených na PCR, pričom väčšina z nich vyžaduje niekoľko prípravných krokov, vrátane opracovania DNA restriktívnymi enzýmami a následnej ligácie (Guo a Xiong, 2006).

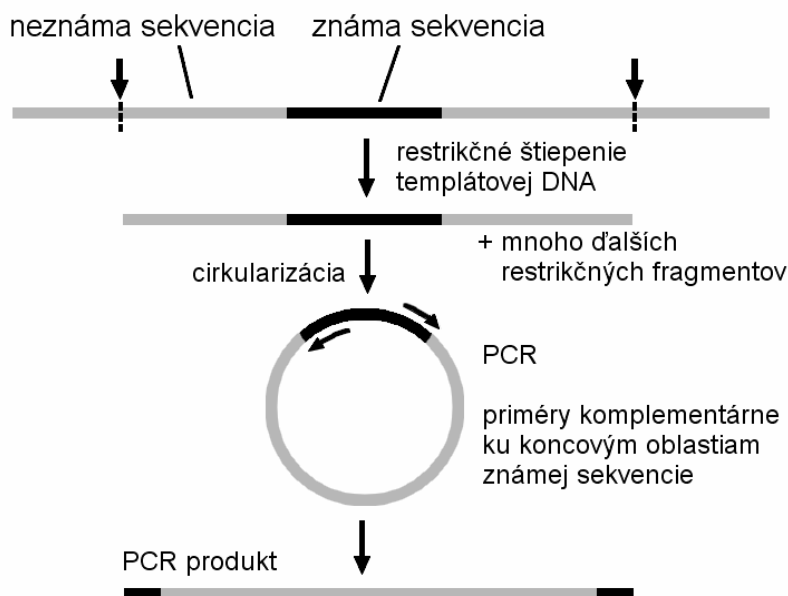
V našej práci sme sa zamerali na štúdium sekvencií susediacich s génom *enlA* v génome *Enterococcus faecalis* II/1 (Nigutová a kol., 2007). Tento gén kóduje enterolyzín A, enzým patriaci do skupiny peptidoglykánových hydroláz, ktoré usmrcujú bakteriálne bunky štiepením chemických väzieb v najdôležitejšej zložke ich bunkových stien. Enterolyzín A je zaraďovaný do podskupiny bakteriocínov (Morovský a kol., 2001; Nilsen a kol., 2003), porovnania sekvencií však naznačujú, že svojou doménovou štruktúrou sa podobá aj inej podskupine - fágovým endolyzínom.

Naším cieľom bolo študovať genetickú organizáciu *enlA* operónu a nájsť susediace gény, typické buď pre fágové lytické moduly (holínové gény) alebo bežne sa vyskytujúce v bakteriocínových operónoch (napr. ABC transportéry a i.).

## MATERIÁL A METODIKA

V našej práci sme ako templát použili totálnu DNA z kmeňa *E. faecalis* II/1. Na základe známej sekvencie génu pre enterolyzín A sme navrhli špecifické priméry z koncových oblastí génu (Tab. 1). V práci sme využili dve metódy – inverznú PCR a vectorette PCR (Universal Vectorette™ System; Sigma-Aldrich®). Oba tieto prístupy umožňujú amplifikovať úseky susediace so známou DNA sekvenciou a následne tieto amplikóny sekvenovať.

Inverzná PCR je modifikáciou klasickej PCR, ktorej predchádza náhodné restriktívne štiepenie DNA a následná cirkularizácia DNA fragmentov. Pri samotnej PCR sa používajú priméry komplementárne ku koncovým oblastiam známej sekvencie, avšak opačnej orientácie, ako priméry vymedzujúce túto sekvenciu (Obr. 1).



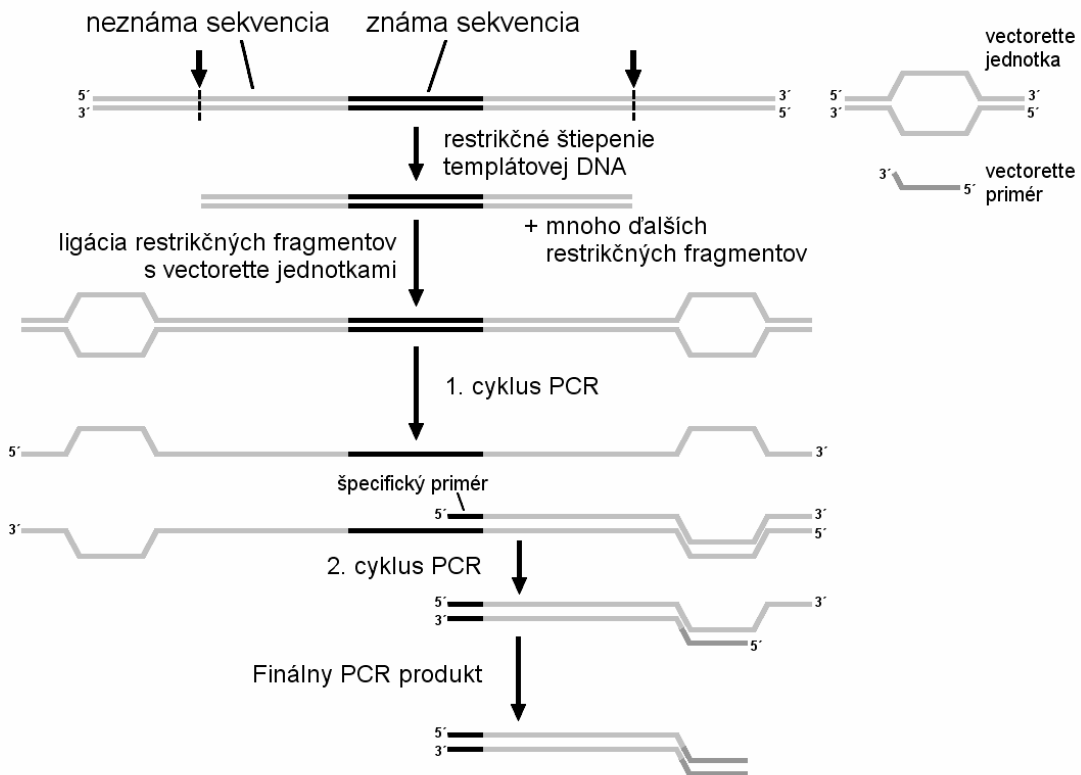
Obrázok 1: Princíp inverznej PCR.

Vectorette PCR (Obr. 2) je metóda, ktorá umožňuje amplifikovať oblasti DNA susediace so známou sekvenciou buď z oboch, alebo len z jednej strany. Podobne ako pri inverznej PCR, DNA sa musí najskôr poštíepiť restriktívnymi enzýmami. Následne sa vzniknuté restriktívne fragmenty zligujú so špeciálnymi dsDNA adaptormi (tzv. vectorette jednotkami), ktoré majú podobu akejsi „bubliny“, vo vnútri ktorej úseky jednotlivých vlákien DNA nie sú komplementárne. Toto usporiadanie vectorette jednotiek umožňuje vyhnúť sa vzniku nešpecifických PCR produktov. Samotná PCR vyžaduje prítomnosť jedného špecifického priméru (komplementárneho k jednému koncu známej sekvencie) a jedného vectorette priméru, ktorého sekvencia je rovnaká ako úsek nespárovaných báz v „spodnom“ vlákne vectorette jednotky a teda nemá zodpovedajúci komplementárny úsek DNA, ku ktorému by sa mohol primér v prvom cykle PCR naviazať. Počas prvého cyklu teda dochádza len k syntéze vlákna začínajúceho špecifickým primérom, čiže aj k vytvoreniu úseku komplementárneho k „spodnému“ vláknu vectorette jednotky. V ďalších cykloch už PCR prebieha za účasti oboch primérov a amplifikujú sa tak úseky od konca známej sekvencie po naviazanú vectorette jednotku (Arnold a Hodgson, 1991).

Získané PCR amplikóny sme prečistili, sekvenovali a získané sekvencie sme pomocou algoritmu blastx porovnali s ostatnými sekvenciami dostupnými v GenBank databáze <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

použitá metóda	označenie priméru	sekvencia
inverzná PCR	P004-F	5' GCAGTGTTCCTCGAATTGTTGTCC 3'
	P004-R	5' AGAACCGTTGGATCGCTTGCA 3'
vectorette PCR	P033-R (upstream)	5' TCCCGCATATGGTTTGCCCAGTGGC 3'
	P033-F (downstream)	5' TCAACCGGCACGATGGGGAATATGGG 3'
	vectorette primér	súčasť komerčného kitu Vectorette™ System

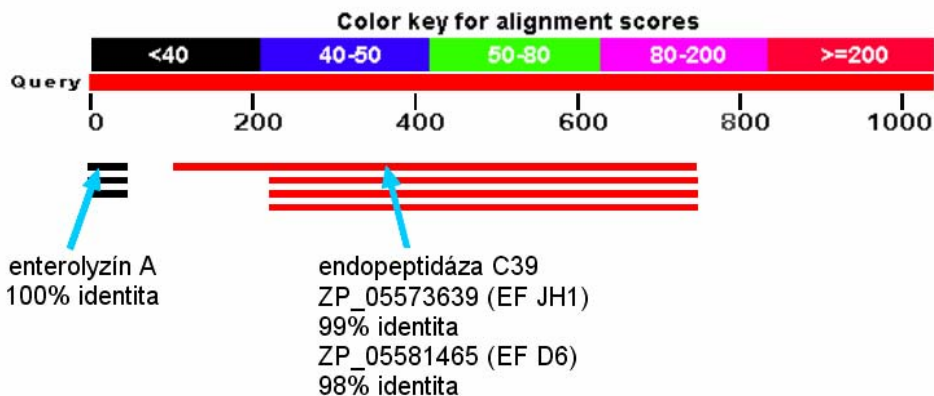
Tabuľka 1: Priméry použité pri inverznej a vectorette PCR.



Obrázok 2: Princíp vectorette PCR.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

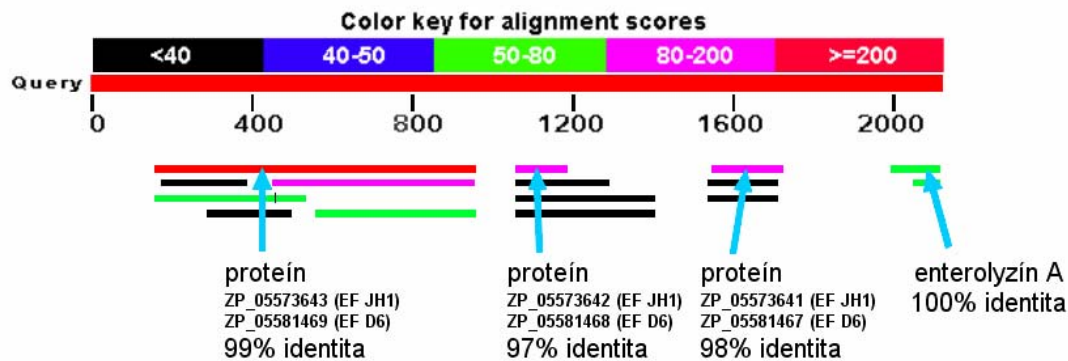
V našom „genome walking“ experimente sme ako prvú použili inverznú PCR, pomocou ktorej sme získali amplicón o veľkosti približne 1 kb. Sekvenovaním tohto amplicónu sme v bezprostrednej blízkosti v smere „downstream“ od génu *enlA* našli gén, ktorý vykazuje podobnosť s endopeptidázami z rodiny C39 (Obr. 3). Tieto enzýmy hydrolytickým štiepením upravujú prebakteriocíny na bakteriocíny, pričom zároveň sú súčasťou transportérov v procese sekrécie hotových bakteriocínov z bunky.



Obrázok 3: Analýza DNA sekvencií „downstream“ od génu pre enterolysin A u *E. faecalis* II/1.

Keďže inverzná PCR sa ukázala ako časovo veľmi náročná a navyše často neúspešná metóda, na ďalšie štúdium okolia *enlA* sme využili vectorette PCR. Získali sme amplicóny o veľkosti približne 600 bp a 2 kb. Analýzou výsledkov sekvenovania sme zistili, že sekvencia 600 bp

amplikónu sa prekrýva so sekvenciou získanou inverznou PCR (teda kóduje oblasť downstream“ od génu *enlA*). 2 kb amplikón však odhalil tri gény „upstream“ od *enlA* (Obr. 4). Porovnaním sekvencie so sekvenciami v databáze sme zistili, že tieto gény, rovnako ako ich usporiadanie sú takmer úplne identické s génmi pre hypotetické proteíny v genóme *E. faecalis* JH1 a *E. faecalis* D6, ktorých funkcia však dosiaľ nie je známa a nepozorovali sme žiadnu podobnosť s bakteriofágovými proteínmi.



Obrázok 4: Analýza DNA sekvencií „upstream“ od génu pre enterolyzín A u *E. faecalis* II/1.

Keďže sme v okolí génu pre enterolyzín A nenašli žiadny gén kódujúci holín, alebo iný proteín typický pre bakteriofágy, no na druhej strane sme našli gén pre enzým uplatňujúci sa pri maturácii bakteriocínov, usudzujeme, že enterolyzín A napriek svojej doménovej štruktúre typickej pre fágové endolýzíny, s najväčšou pravdepodobnosťou patrí medzi pravé bakteriocíny. Aj keď sme pomocou oboch použitých „genome walking“ metód získali sekvenovateľné amplikóny, vectorette PCR poskytuje v porovnaní s inverznou PCR dômyselné a časovo menej náročné riešenie aplikovateľné v širokej škále „genome walking“ experimentov.

## POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0586-07 a Vedeckou grantovou agentúrou VEGA - grant č. 2/0006/08.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Arnold C, Hodgson IJ. Vectorette PCR: a novel approach to genomic walking. *Genome Res.* 1991; 1: 39-42.
- Guo H, Xiong J. A specific and versatile genome walking technique. *Gene* 2006; 381: 18-23.
- Morovský M, Pristas P, Javorský P. Bacteriocins of ruminal bacteria. *Folia Microbiol (Praha)*. 2001; 46: 61-2.
- Nigutová K, Morovský M, Pristaš P, Teather RM, Holo H, Javorský P. Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of *enlA* homologues among ruminal Gram-positive cocci. *J. Appl. Microbiol.* 2007; 102: 563-9.
- Nilsen T, Nes IF, Holo H. Enterolysin A, a Cell Wall-Degrading Bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69: 2975-84.

## ANTIFUNGÁLNA ÚČINNOSŤ VYBRANÝCH ESENCIÁLNYCH OLEJOV NA KVASINKY RODU CANDIDA

Marciová, A., Čonková, E., Vantrubová, J.

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Ústav farmácie a farmakológie

### ABSTRAKT

Kvasinky rodu *Candida* ako komenzálna mikroflóra zdravých ľudí a zvierat nespôsobujú ochorenia hostiteľského organizmu. Patogenita kvasiniek sa spája najčastejšie s fyzikálnymi či chemickými zmenami na povrchu kože, resp. so znížením imunitných obranných mechanizmov (Brito a kol., 2009).

Cieľom štúdie bolo vyhodnotiť účinnosť 4 esenciálnych olejov (pamajoránového, grapefruitového, šalviového, čajovníkového) v rôznych koncentráciách voči izolátom *C. albicans* a *C. glabrata* získaných od zvierat s mykotickou infekciou použitím NCCLS mikrodilučnej metódy M27-A-2. Pamajoránový esenciálny olej inhiboval rast iba jedného izolátu *C. albicans* a *C. glabrata* vo všetkých testovaných koncentráciách (0, 0,625 – 32 µg/ml). Čajovníkový esenciálny olej mal antifungálny efekt na 6 izolátov (54,54 %) *C. albicans* iba v najvyššej koncentrácii (32 µg/ml). Kontrola kvality testovania bola overovaná na referenčnom kmeni *C. albicans* (CCM 8320) voči ketokonazolu a itrakonazolu.

### ÚVOD

Kvasinky rodu *Candida* a *Malassezia* sú pomerne často izolované z kože a slizníc zdravých psov a mačiek. *Otitis externa* a dermatitída domácich mäsožravcov sú zvyčajne spojené s týmito kvasinkami ako primárnymi pôvodcami ochorenia alebo sa tieto vyskytujú v kombinácii s baktériami (Prado a kol., 2008). Pôvodcami kandidóz sú najmä *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* a *C. parapsilosis* (Brito a kol., 2009; Čonková a kol., 2005). Infekcie majú akútne, subakútne až chronický priebeh (Čonková a kol., 2005). Na zvládnutie mykotických infekcií je k dispozícii rad liečivých látok s fungistatickým alebo fungicídny účinkom (Čonková a kol., 2008). V posledných rokoch sa prejavil zvýšený záujem o využitie rastlinných silíc (Bobko a kol., 2009), ktoré sú skúmané pre ich potenciálne antivirotické, antibakteriálne, antifungálne či antiinflamatorné účinky.

### MATERIÁL A METODIKA

Mikrodilučnou metódou M27-A-2 (NCCLS, 2002) bola overená účinnosť 4 esenciálnych olejov (pamajoránový (*Origanum vulgare*), šalviový (*Salvia officinalis*), grapefruitový (*Citrus paradisi*), čajovníkový (*Thea sinensis*), Calendula, SR) voči 19 kvasinkám rodu *Candida* (*C. albicans* – 11, *C. glabrata* – 8) získaných od zvierat s diagnostikovanou mykotickou infekciou. Na kontrolu kvality testovania citlivosti bol použitý referenčný kmeň *C. albicans* (CCM 8320, Brno, ČR).

Suspenzia kvasiniek zodpovedajúca stupnici McFarlanda 0,5 (cca  $1 \cdot 10^6$  h.j. /ml) bola pripravená z čistých 2 dňových kultúr. Inokulum o objeme 100 µl bolo aplikované do jamiek mikrotitračnej platne s obsahom jednotlivých esenciálnych olejov v koncentráciách od 32 µg/ml do 0,0625 µg/ml. Mikrotitračné platne boli inkubované 48 hodín pri teplote 37° C. Kontrola kvality testovania citlivosti bola overovaná použitím referenčného kmeň voči syntetickým antifungálnym látkam – itrakonazolu a ketokonazolu.

Citlivosť kvasiniek na esenciálne oleje a antimykotiká bola hodnotená vizuálne. Rast patogénov v každej jamke bol porovnávaný s rastom pozitívnej kontroly a na základe zákalu boli pridelené každej jamke číselné hodnoty 0 – 4 (0 – opticky čisté, 1 – slabý zákal, 2 – výrazný zákal, 3 – slabá redukcia zákalu, 4 – žiadna redukcia zákalu).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Tabuľka 1 uvádza hodnoty minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC), pri ktorých bola zaznamenaná inhibícia rastu kvasiniek (t. j. s hodnotou zákalu 0), počet a percento citlivých kmeňov.

Na referenčný kmeň *C. albicans* pôsobil itrakonazol v koncentráciách  $>0,125$   $\mu\text{g/ml}$ . MIC ketokonazolu bola  $0,0625$   $\mu\text{g/ml}$ .

Inhibícia rastu *C. albicans* a *C. glabrata* pamajoránovým olejom bola zaznamenaná v 1 prípade pri *C. albicans* (9,09 %), a *C. glabrata* (12,5 %) s MIC  $0,0625$   $\mu\text{g/ml}$ . V koncentráciách 4 – 32  $\mu\text{g/ml}$  boli citlivé 3 izoláty *C. albicans* (27,27 %). Rast ďalších 7 izolátov *C. glabrata* bol inhibovaný až v koncentrácii 32  $\mu\text{g/ml}$  (87,5 %).

Šalviový esenciálny olej v koncentráciách 16 – 32  $\mu\text{g/ml}$  pôsobil na tri izoláty *C. albicans* (27,27 %) a v najvyššej koncentrácii na 50 % kmeňov *C. glabrata* (4 izoláty). Grapefruitový a čajovníkový esenciálny olej nevykazovali dostatočný antifungálny efekt.

O overovaní citlivosti kvasiniek a účinnosti esenciálnych olejov mikrodilučnou metódou nie je dostupných veľa štúdií. Manohar a kol. (2001) overovali antifungálnu účinnosť pamajoránového oleja voči kvasinkám (*C. albicans*) *in vitro* a *in vivo*. Tento esenciálny olej inhiboval rast kultúry kvasiniek v koncentrácii 0,25 mg/ml. Pri našom testovaní boli použité nižšie koncentrácie a preto je pravdepodobne aj citlivosť mikroorganizmov nižšia.

Tab. 1 Minimálna inhibičná koncentrácia MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ), počet a % citlivých kmeňov

Esenciálny olej	<i>C. albicans</i> MIC $\mu\text{g/ml}$ min – max.	n	% citlivých kmeňov	<i>C. glabrata</i> MIC $\mu\text{g/ml}$ min – max.	n	% citlivých kmeňov
Pamajoránový	0,0625 – 32	1	9,09	0,0625 – 32	1	12,5
	4 – 32	3	27,27	$>32$	7	87,5
Šalviový	16 – $> 32$	3	27,27	$>32$	4	50
Grapefruitový	16 – $> 32$	1	9,09	$>32$	4	50
	$> 32$	1	9,09			
Čajovníkový	$> 32$	6	54,54	4 – 32	1	12,5
				16 – 32	1	12,5

min – minimálne, max – maximálne

Testované esenciálne oleje boli najviac účinné len vo vysokých koncentráciách. Citlivosť kvasiniek bola vyššia na syntetické štandardné antimykotiká. Z tohto dôvodu je potrebné naďalej overovať antifungálny potenciál esenciálnych olejov, prípadne extraktov získaných aj z iných rastlín pri rôznych koncentráciách, ktoré by mohli byť využité v rámci podpornej terapie mykotických infekcií.

## POĎAKOVANIE

Práca bola podporovaná projektom VEGA 1/0736/08.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bobko M, Lagin L, Angelovičová M, Haščík P. Analýza vplyvu rozdielneho prídavku škoricevej silice na kvalitu mäsa kurčiat. Acta fytotechnica et zootechnica, Mimoriadne číslo, 2009; 47 – 51.
- Brito E H S, Fontenelle R O S, Brilhante R S N, Cordeiro R A, Sidrim J J C, Marcos M F G. Candidose na medicina veterinária: um enfoque micológico, clínico e terapêutico. Ciência Rural, Santa Maria 2009; 39: 9: 2655 – 64.
- Čonková E, Bílek J, Sesztáková E. Mykotické infekcie psov a mačiek. Veterinářství 2005; 55: 744 – 49.
- Čonková E. a kol. Veterinárska farmakológia. Špeciálna časť. Prvé vydanie. Košice, Univerzita veterinárskeho lekárstva, 2008; 225 s.

Manohar V, Ingram C, Gray J, Talpur N A, Echard B W, Bagchi D, Preuss H G. Antifungal activities of organum oil against *Candida albicans*. *Mol Cellular Biochem* 2001; 228: 1 – 2: 111 – 117.

Prado M R, Brilhante R S N, Cordeiro R A, Monteiro A J, Sidrim J J C, Rocha M F G. Frequency of yeasts and dermatophytes from healthy and diseased dogs. *J Vet Diagn Invest* 2008; 20: 197 – 202.

## ENDOHELMINTY HRÚZOVCA SIEŤOVANÉHO (*PSEUDORASBORA PARVA*)

T. Mihok<sup>1</sup>, P. Košuth<sup>1</sup>, A. Kočišová<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra výživy, dietetiky a chovu zvierat, Ústav pre chov a choroby zveri a rýb, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, <sup>2</sup>Katedra epizootológie a parazitológie, Ústav parazitológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie

### ABSTRAKT

Na jeseň v roku 2007 sme uskutočnili odlov zameraný na sledovanie patogénneho pôsobenia parazitických helmintov hrúzovca sieťovaného, ktorý patrí medzi invázne druhy rýb z Perínskych rybníkov na východnom Slovensku. Helmintologickou pitvou sme vyšetrili 164 jedincov a izolovali 159 kusov endohelmintov. Na základe uskutočnených meraní a prítomnosti typických znakov prislúchajúcich danému druhu, boli nájdené v zadnej časti tráviacej rúry dospelé nematódy identifikované ako *Pseudocapillaria tomentosa* (čľaď *Capillaridae*) s prevalenciou 44,51 %, s priemernou intenzitou infekcie 2,17 (maximálna 9) a abundanciou 0,96. Intenzita infekcie parazitov ovplyvňovala kondičný stav rýb ( $p < 0.05$ ). Nepotvrdili sme, že so zvyšujúcou sa dĺžkou tela rýb narastá aj intenzita infekcie ( $p > 0.05$ ) a so zvyšujúcou sa hmotnosťou rýb klesá intenzita infekcie ( $p > 0.05$ ). Významný rozdiel ( $p < 0.05$ ) bol zaznamenaný v koeficiente kondície medzi pozitívnou a negatívnou skupinou rýb.

### ÚVOD

Hrúzovec sieťovaný *Pseudorasbora parva* (Temminck a Schlegel, 1846) je malá ryбка z čľaďe kaprovitých (*Cyprinidae*). Jeho pôvodným areálom je východná Ázia. V Európe patrí medzi vysoko invázne druhy rýb (Gozlan a kol., 2002). Na území Slovenska bol prvýkrát ulovený v roku 1974 v Tise (Žitňan a Holčík 1975), kde sa spontánne rozšíril z Maďarska. Do Európy (Rumunsko – 1960) bol zavlečený z Ďalekého východu, ako nechcená prísada s dovozom mladých rastlinožravých druhov rýb (Wohlgemuth a Šebela, 1987). Prenos nečistých násad rýb prispel k jeho ďalšiemu šíreniu aj na našom území. Pri zanedbanom hospodárení sa dokáže masovo premnožiť najmä na rybných hospodárstvach a nádržiach v teplejších oblastiach. Invázie nepôvodných druhov boli uznané ako druhá najvýznamnejšia hrozba pre globálnu biodiverzitu po strate biotopov a fragmentácii krajiny (Allendorf a Lundquist, 2003; Park, 2004). Zavedenie nepôvodných druhov do ekosystémov môže mať vplyv na spoločenstvo zmenou druhovej rozmanitosti (Mack a kol., 2000). Parazity inváznych druhov môžu mať negatívny dopad na pôvodné druhy živočíchov (Galli a kol., 2005; Taraschewski, 2006).

Údaje o mnohobunkových parazitoch rýb v Českej a Slovenskej republike boli zostavené Moravcom (2001), avšak je tu stále nedostatok informácií o parazitofaune introdukovaných druhov rýb v ich nových prostrediach, vrátane hrúzovca sieťovaného.

### MATERIÁL A METODIKA

Na jeseň v roku 2007 sme odlovili odlov 164 jedincov hrúzovca sieťovaného z lokality Perínske rybníky na východnom Slovensku. Odchytené jedince sme transportovali v 15 litrových vedrách s vodou z miesta odlovu. Počas transportu bola voda prevzdušňovaná. Po prevoze sme ryby uskladnili v prevzdušňovanej nádrži. Jedince hrúzovca sieťovaného sme usmrtili prerušením miechy a podrobili parazitologickej pitve, ktorá bola zameraná na črevné helminty. Nematódy izolované z čreva hostiteľa sme očistili a ponechali niekoľko minút vo fyziologickom roztoku relaxovať a následne sme ich fixovali horúcim (70-80 °C) 4% formalínom. Po troch týždňoch sme ich preniesli do 70% etylalkoholu. Nematódy sme pred identifikáciou nefarbili, iba presvetľovali (glycerín) a vyšetrovali ako dočasné glycerínové preparáty. Pred mikroskopickým určením sme ich postupne prekladali do glycerínových roztokov so vzrastajúcou koncentráciou glycerínu (glycerín riedený vodou v pomere 1:10 – 1:2) a po ukončení štúdia sme parazity uložili späť do 70% etylalkoholu. Na identifikáciu sme použili kľúč na určovanie



helmintov podľa Moravca (1994). Epidemiologické parametre (prevalencia, abundancia a intenzita infekcie) sme vypočítali podľa Busha a kol. (1997). Vzťahy medzi intenzitou infekcie a kondičným faktorom (K), medzi intenzitou infekcie a dĺžkou tela (SL) a medzi intenzitou infekcie a hmotnosťou jedincov sme testovali pomocou lineárnej regresie. Kondičný faktor sme vypočítali zo vzťahu medzi hmotnosťou a dĺžkou tela rýb  $K = W / L \times 100\,000$ , kde K je kondičný faktor, W je hmotnosť a L je dĺžka tela rýb (Schreck a Moyle, 1990). Rozdiely v kondičnom faktore medzi negatívnou a pozitívnou skupinou sme testovali pomocou t-testu. Na výpočet všetkých štatistických analýz sme použili program PAST 1.99 (Hammer a kol., 2001).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe uskutočnených meraní a prítomnosti typických znakov prislúchajúcich danému druhu, boli nájdené v zadnej časti tráviacej rúry dospelé nematódy identifikované ako *Pseudocapillaria tomentosa* (Dujardin, 1843), čeľaď Capillaridae (obr. 1). Dĺžka tela 164 jedincov bola v rozpätí od 32,0 do 74,0 mm (priemer 48,6 mm) a hmotnosť tela od 1,0 do 6,0 g (priemer 1.96 g). Z celkového počtu 164 jedincov bolo infikovaných 73, čo predstavovalo 44,51 % prevalenciu. Priemerná intenzita infekcie bola 2,17 s maximálnym počtom do 9 nematód a abundanciou 0,96. Potvrdili sme významný vplyv intenzity infekcie na koeficient kondície ( $r = -0.24$ ;  $n = 164$ ;  $p < 0.05$ ). Naopak, nepodarilo sa nám potvrdiť predpoklady, že so zvyšujúcou sa dĺžkou tela rýb (SL) rástla aj intenzita infekcie ( $r = 0.12$ ;  $n = 164$ ;  $p > 0.05$ ) a so zvyšujúcou sa hmotnosťou rýb klesala intenzita infekcie ( $r = -0.05$ ;  $n = 164$ ;  $p > 0.05$ ). Pri porovnaní koeficientu kondície medzi pozitívnou a negatívnou skupinou sme potvrdili štatisticky významný rozdiel ( $t = 3.14$ ;  $n = 164$ ;  $p < 0.05$ ).



Obr. 1 *Pseudocapillaria tomentosa* (Dujardin, 1843). a – chvostový koniec samice; b - chvostový koniec samca

*P. tomentosa* je holarktický typ rozšírený v palearktiskej časti Euroázie a Severnej Amerike parazitujúci v čreve. Definitívny hostitelia sú hlavne z čeľade *Cyprinidae* a *Cobitidae*. Ale aj *Percidae*, *Gadidae*, *Anguillidae*, *Esocidae* a *Siluridae*. Taktiež u akváriových rýb *Lebistes reticulatus* a *Puntius tetrazona*, *Ancistrus* spp. a iných. Parazity z tejto čeľade sú vo všeobecnosti vysoko patogénne a ťažké infekcie môžu spôsobiť značné ekonomické straty v intenzívnych rybníckych hospodárstvach, obzvlášť na plôdikoch kapra. Predstavujú isté riziko pre hospodársky významné druhy rýb, ktoré sa môže prejaviť zhoršeným zdravotným stavom, zníženými prírastkami a môžu viesť aj k úhynom.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Allendorf F.W. & Lundquist L.L. 2003. Introduction: Population biology, evolution, and control of invasive species. *Conserv. Biol.* 17: 24–30.
- Bush A. O., Lafferty K. D., Lotz J. M., Shostak A. W. (1997): Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. Revisited. *The Journal of Parasitology*, 83: 575-583.
- Galli P., Stefani F., Benzoni F., Zullini A. (2005): Introduction of alien host-parasite complexes in a natural environment and the symbiota concept. *Hydrobiologia* 548: 293–299.
- Gozlan, R. E., Pinder, A. C., Shelley, J. (2002): Occurrence of the Asiatic cyprinid *Pseudorasbora parva* in England. *J. Fish Biol.* 61: 298–300.
- Hammer R., Harper D. A. T., Ryan P. D. (2001): PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontologia Electronica*, 4 (1): 9 pp.
- Mack R. N., Simberloff D., Lonsdale W. M., Evans H., Clout M., Bazzaz F.A. (2000): Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecol. Appl.* 3: 689–710.
- Moravec F. (1994): Parasitic nematodes of freshwater fishes of Europe. *Academia, Praha*, 473 s.
- Moravec F. 2001. Checklist of the Metazoan Parasites of Fishes of the Czech Republic and the Slovak Republic (1873–2000). *Academia, Prague*, 168 s.
- Park K. 2004. Assessment and management of invasive alien predators. *Ecology and Society* 9: 12.
- Schreck C. B., Moyle P. B. (1990): *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society Bethesda, Maryland, USA, 684 pp.
- Taraschewski H. (2006): Hosts and parasites as aliens. *J. Helminth.* 80: 99–128.
- Wohlgemuth E. and Šebela M. (1987). *Střevlička východní, nový prvek evropské ichtyofauny*. *Živa* 35: 25-27.
- Žitňan R., Holčík J. (1975): On the first find of *Pseudorasbora parva* in Czechoslovakia. *Zoologické listy*, 25, 1: 91 – 95.

# KONFORMAČNÉ PRECHODY CYTOCHRÓMU C V IÓNOVÝCH KVAPALINÁCH

Parnica J.<sup>1</sup>, Kandráč L.<sup>1</sup>, Antalík M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Ústav chemických vied, Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Košice

<sup>2</sup>Ústav experimentálnej fyziky, SAV, Košice

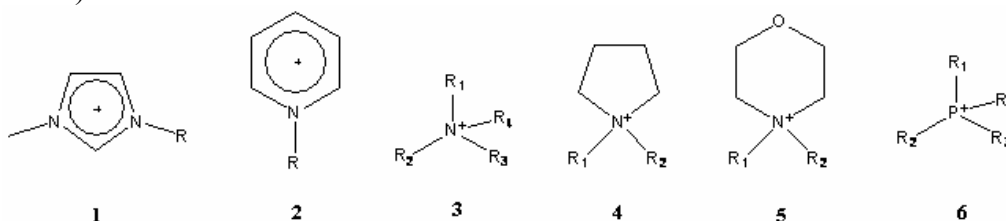
## ABSTRAKT

Informácie o štruktúre proteínov, dynamika a solvatácia sú zásadné pre pochopenie ich funkcie v špeciálnych podmienkach. Cieľom tohoto projektu je preskúmať vplyv špeciálnej skupiny iónových kvapalín, deep eutectic solvents (DES) na konformačné prechody a stabilitu modelového proteínu cytochrómu c, pomocou metód UV-absorpčnej spektroskopie a kruhového dichroizmu. Z výsledkov CD spektroskopie vyplýva, že najväčší stabilizačný účinok na cytochróm c ma zmes ChCl+sorbitol a najmenší ChCl+kys.malónová vďaka kys.malonovej, ktorá spôsobila extrémne zníženie pH k hodnotám blízkyh 0. Keď sa povrchovo aktívna látka naviaže na proteín, intramolekulové sily, ktoré udržiavali sekundárnu štruktúru sú porušené a nastávajú konformačné zmeny v proteínoch, často vedúce k zmene polaroty a funkčných vlastnosti proteínov. Preto ďalším prínosom nášho skúmania je odhalenie presných interakcií medzi DES a proteínmi na molekulovej úrovni.

## ÚVOD

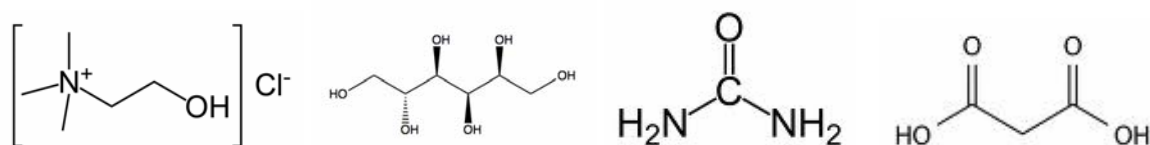
V posledných rokoch sa záujem o iónové kvapaliny (IL) rapídne zvýšil a priťahujú veľa pozornosti, ako "zelená" alternatíva konvenčných organických rozpúšťadiel v rôznych oblastiach, vrátane biochémie a separačných procesov, vďaka svojim jedinečným vlastnostiam, ako je vysoká tepelná stabilita, zanedbateľný tlak pár a nehorľavosť (Shimojo a kol., 2004, 2006; Kubota a kol., 2006). Prvá („room-temperature ionic liquid (RTIL)“) iónova kvapalina pri izbovej teplote [EtNH<sub>3</sub>][NO<sub>3</sub>] (t<sub>f</sub> 12 ° C) bola objavená v roku 1914 (Walden, 1914), ale záujem o ne bol malý až do objavenia binárnej iónovej kvapaliny vyrobenej zo zmesi chlorid hlinitý(III) a N-alkylpyridinium (Chum a kol., 1975), alebo 1,3-dialkylimidazolium chlorid (Wilkes a kol., 1982). Všeobecne možno povedať, že IL pozostávajú zo soli, kedy jeden alebo oba ióny sú veľké a kation má nízky stupeň symetrie. Tieto faktory majú tendenciu znižovať energiu mriežky kryštalickej formy soli a tým aj znížiť bod topenia (Seddon, 1998).

Najbežnejšie IL obsahujú ako kation (obr.1.) imidazolium, fosfónium, pyridinium alebo kvartérnu amónnu soľ (DES) a ako anión Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, (CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N<sup>-</sup>, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Wasserscheid a kol., 2003).



Obr.1: Najbežnejšie kationy tvoriace IL: (1) 1-alkyl-3-metylimidazolium; (2) 1-alkylpyridínium; (3) kvartérny amóniový; (4) 1,1'-dialkylpyrrolidinium; (5) 1,1'-dialkylmorfolínium; (6) fosfóniový kation.

„Deep eutectic solvents“ (DES) tvoria skupinu iónovým kvapalinám podobných rozpúšťadiel, tvorených zo zmesi polárnych zložiek (kvapaliny alebo pevné látky), ktoré tvoria komplexy, kde sa výslednej zmesi drasticky znížil bod topenia.



Obr.2.: Štruktúrne vzorce: cholín chlorid (ChCl), sorbitol, močovina a kys.malonová

DES sa ľahko pripravia v čistej podobe z lacných východiskových materiálov, zvyčajne tým, že zmiešame kvartérnu amónnu soľ s organickým donorom vodíka, napr. amín, amid, alkohol, alebo karboxylové kyseliny (Abbott a kol., 2003, 2004). Sú alternatívou konvenčných organických rozpúšťadiel a preto sme náš výskum sústredili na štúdium IL na báze cholín (2-hydroxyetyl-trimetylamónium) chloridu (obr.2.), ako netoxickú, bioodburateľnú a často používanú zložku v biotechnologických procesoch.

### MATERIÁL A METODIKA

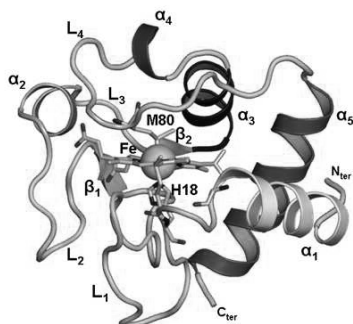
Cholín chlorid (2-hydroxyetyltrimetylamónium chlorid  $\geq 98\%$ ), močovina ( $\geq 98\%$ ), kyselina malonová (99%), D-sorbitol ( $\geq 98\%$ ) a cytochróm c (95%) z konského srdca boli zakúpené od firmy Sigma-Aldrich a boli používané bez ďalšej purifikácie.

Originálna eutektická zmes bola formovaná vzájomným zmiešavaním dvoch zložiek pri teplote 40-80°C na elektrickom variči značky Heidolph (Nemecko) v rôznych molárnych pomeroch (m.p.). V závislosti od kombinácie týchto zložiek bola doba ohrevu v trvaní 30-180 minút, do vzniku homogénnej, bezfarebnej kvapaliny. Neskôr sme vyvinuli metódu vzniku eutektickej zmesi pomocou mikrovlnného ohrevu v rozmedzí výkonu 100-250 W v trvaní od 2-5 minút, čo nám značne ušetrilo čas priprav jednotlivých eutektických zmesí. Jednotlivé zmesi pozostávali vždy z hlavnej nemeňnej zložky cholín chloridu v kombinácii s druhou zložkou ako donorom vodíkovej väzby, v našom prípade (obr. 2) to bola močovina (amín), kyselina malonová (karboxylová kyselina) a sorbitol (alkoholový cukor).

Vlastnosti zmesi močovina/cholín chlorid (m.p. 2:1), kyselina malonová/cholín chlorid (m.p. 1:1) a sorbitol/cholín chlorid (m.p. 1:1) boli charakterizované pomocou UV-Vis absorpčnej spektroskopie v rozsahu 200-800 nm pri teplote 25°C pomocou Jasco V-630 spektrofotometra v 10 mm kyvete. Kruhový dichroizmus (CD) a magnetický kruhový dichroizmus (MCD) boli monitorované v rozsahu 200-800 nm pomocou Jasco J-815 spektropolarimetra v 10 mm kyvete. Spektrá oxidovaného (10 $\mu$ M) cytochrómu c (ferricyt c) v DES boli merané v čistej eutektickej zmesi a zmesi eutektika s vodou (30-50 obj.% H<sub>2</sub>O).

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Informácie o štruktúre proteínov, dynamika a solvátácia sú zásadné pre pochopenie funkcie proteínu v IL. Naše výsledky ukazujú, že deep eutectic rozpúšťadlá sú zaujímavé systémy, ktoré umožňujú charakterizovať rôzne typy konformačných stavov ferricyt c (obr.3).



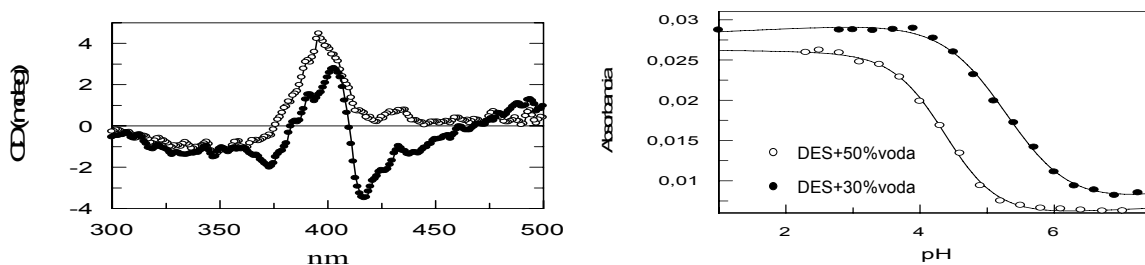
Obr.3.: Štruktúra cytochrómu c

Zatiaľ čo pH hodnota konformačného prechodu ferricyt c v H<sub>2</sub>O s nízkou koncentráciou soli je 2.5, táto hodnota (obr.4b) sa v iónových kvapalinách posunie k vyšším hodnotám pH (Tab.1). Tento typ zmeny konformácie je spojený s prechodom z nízko-spinového stavu {His18-Fe-Met80} Fe v ferricyt c do zmesi stavov vysoko a nízko spinového stavu {His18-Fe-Met80, His18-Fe-His, His18-Fe-H<sub>2</sub>O} (Stupák a kol., 2006)

V prípade ChCl+močovina koncentrácia jednotlivých zložiek bola 5M ChCl a 10M močovina, v ChCl+sorbitol koncentrácia jednotlivých zložiek bola 5.7M ChCl a 5.7M sorbitol a v ChCl+kys.malonová koncentrácia jednotlivých zložiek bola 5.5M ChCl a 5.5M kys.malonová.

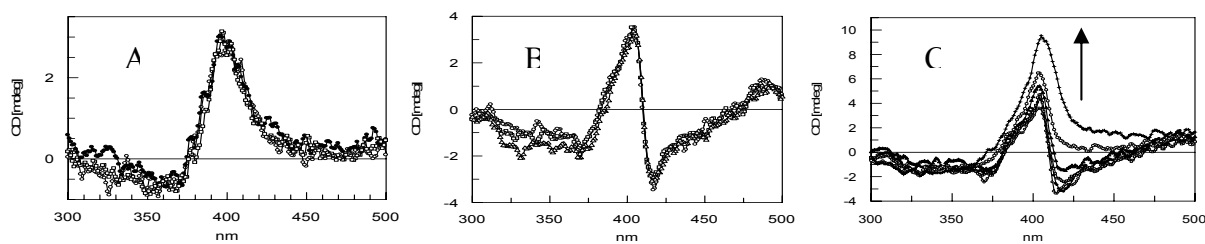
Tab.1: pK konštanty ferricyt c v jednotlivých zložkách DES + obj.%H<sub>2</sub>O

		pK (ferricyt c)	
cholín chlorid		3,16 ± 0,14 (1M)	5,65 ± 0,10 (6M)
○ pH 2.02 močovina	A	2,76 ± 0,12 (1M)	4,68 ± 0,09 (€ B
● pH 7.02 NaCl		3,39 ± 0,18 (1M)	3,87 ± 0,16 (5,2M)
Fosfátový pufr		2,5 ± 0,15	
DES(ChCl+močovina) +50obj.%H <sub>2</sub> O		4,38 ± 0,15	
DES(ChCl+močovina) +30obj.%H <sub>2</sub> O		5,31 ± 0,14	



Obr.4.: a) CD spektra ferricyt c v fosf.pufry, b) pH titrácia ChCl+močovina+obj.% H<sub>2</sub>O

V zmesi ChCl+kys.malonová (obr.5a) v Soretovej oblasti (odrkadľuje zmenu terciárnej štruktúry proteínov) vykazuje ferricyt c vo všetkých kombináciach s vodou (30, 40 a 50obj.%) jeden pozitívny pík pri 400 nm (natívny ferricyt c ma pozitívny pík pri 404 nm a negatívny pík pri 417 nm, vid' obr.4a), čo indikuje narušenia spojenia medzi  $\pi \rightarrow \pi^*$  prechodmi hémovej skupiny a tiež aromat. aminokyselinových zvyškov v jeho blízkosti. Rápidným znížením pH zmesi v maxime Soretovej oblasti nastal posun zo 404 nm na 400 nm. Príčinou je zloženie DES, kde prítomnosť kys.malonovej spôsobila extrémne zníženie pH k hodnotám blízkych 0.

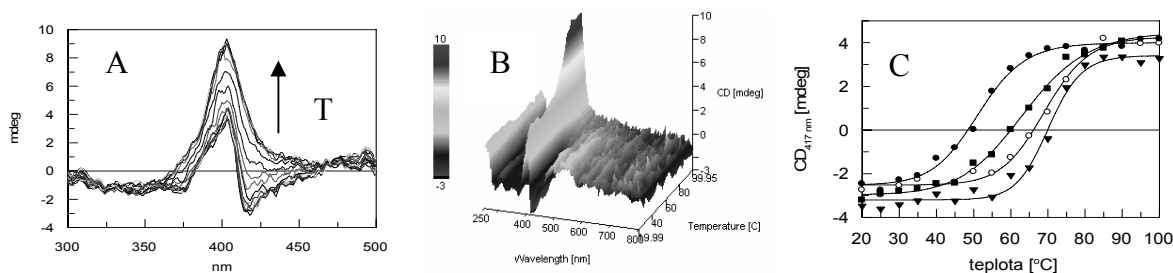


Obr.5.: CD spektra ferricyt c v a) ChCl+kys. malonová, b) ChCl+sorbitol, c) ChCl+močovina

Na rozdiel od zmesi ChCl+kys.malonová (obr.5a) v prípade ChCl+sorbitol (obr.5b) pozorujeme vo všetkých kombináciach s vodou (30, 40 a 50obj.%) stabilizačný účinok a táto zmes ChCl+sorbitol nespôsobuje ako v predošlom prípade destabilizáciu terciárnej štruktúry. V zmesi ChCl+močovina (obr.5c) s prírastkom vody 10, 30, 40, 50, 70 a 90 obj.% pozorujeme postupne destabilizovanie a narušenie terciárnej štruktúry ferricyt c. Pri obsahu 50 a 40obj.% vody začína destabilizácia a pri obsahu menšom ako 30obj.% vody nastáva úplna deštrukcia terciárnej štruktúry s úplným zánikom negatívneho píku pri 417 nm a nárastu intenzity pozitívneho píku pri 400 nm.

Teplotná denaturácia (obr.6) naznačuje, že so zvyšovaním objemu vody sa zvyšovala aj teplota prechodu ferricyt c v DES (ChCl + sorbitol).

Pre porovnanie ukazujeme aj zmes cholín chlorid + močovina, kde sa teplota prechodu nachádzala výrazne nižšie, ako v zmesi cholín chloridu so sorbitolom, čo prisudzujeme vyššej stabilite ferricyt c v tejto DES.



Obr.6.: Teplotná denaturácia ferricyt c a) ferricyt c v cholín chlorid+ sorbitol+50 obj.% H<sub>2</sub>O, b) 3D graf pre ferricyt c v cholín chlorid+ sorbitol+50 obj.% H<sub>2</sub>O, c) Závislosť zmeny elipticity pri 417 nm od teploty DES ( • ChCl+ močovina+50 obj.% H<sub>2</sub>O ■ ChCl+sorbitol +30 obj.% H<sub>2</sub>O ° ChCl+sorbitol+50 obj.% H<sub>2</sub>O ▼ ChCl+sorbitol+70 obj.% H<sub>2</sub>O)

MCD spektra ferricyt c v ChCl+sorbitol a ChCl+močovina s prírastkom vody 30-50 obj.% H<sub>2</sub>O boli totožné bez náznaku zmeny štruktúry. Na rozdiel od ChCl+ kys.malonová, kde pozorujeme výraznu zmenu v poklese intenzity negatívneho píku pri 417 nm a výraznom poklese pozitívneho píku pri 400 nm, spôsobené deštrukciou terciárnej štruktúry ferricyt c. Toto spektrum je charakteristické pre vysoko spinový stav, kde ligandy hémového železa sú His18 a H<sub>2</sub>O pri veľmi nízkom pH (grafy neuvedené). Poznatky o interakciách medzi povrchovo aktívnymi látkami a proteínmi sú nutné pre pochopenie, čím tieto aktívne látky pôsobia ako denaturanty pre proteíny. Preto ďalším prínosom nášho skúmania je odhalenie presných interakcií medzi DES a proteínmi na molekulovej úrovni.

#### POĎAKOVANIE

Príspevok bol vypracovaný v rámci projektov č. 26220120001, 26220220005, 2622022033 z ŠF EU, Centra excelentnosti SAV nanokvapalín a VEGA 0056, 0038 a 0079, VVGS/PF 7/2010/Ch, VVGS/UPJS 18/10-11

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Abbott A.P., Boothby D., Capper G., Davies D.L., Rasheed R.K., J. Am. Chem. Soc., 126:9142–9147, 2004
- Abbott, A.P., Capper, G., Davies, L.L., Rasheed, R.K., Tambyrajah, V., Chem. Commun., 70–71, 2003
- Chum H. L., Koch V. R., Miller L. L., Osteryoung R. A., J. Am. Chem. Soc., 97:3264–3267, 1975
- Kubota F., Goto M., Solv. Extr. Res. Dev. Jpn, 13:23, 2006
- Seddon K. R.. In Molten Salt Forum: Proceedings of 5th International Conference on Molten Salt Chemistry and Technology; Vol. 5–6, H. Wendt (Ed.), 53–62, 1998
- Shimojo K., Goto M., Anal. Chem., 76:5039, 2004
- Shimojo K., Nakashima K., Kamiya N., Goto M., Biomacromolecules, 7:2, 2006
- Stupák M., Bageřová J., Fedunová D., Antalík M., Collect. Czech. Chem. Commun., Vol. 71; 11-12, pp.1627-1641, 2006
- Walden P.. Bull. Acad. Imper. Sci., (St. Petersburg) 1800, 1914
- Wasserscheid P., Welton T., Wiley-VCH: Weinheim, 2003
- Wilkes J. S., Levisky J. A., Wilson R. A., Hussey C. L., Inorg. Chem., 21:1236–1264, 1982

# ŠTÚDIUM NOVÝCH DIGUANIDÍNOVÝCH DERIVÁTOV AKRIDÍNU: DNA VÄZBOVÉ VLASTNOSTI A BIOLOGICKÁ AKTIVITA

Plšíková J.<sup>1</sup>, Kovaľ J.<sup>2</sup>, Mikeš J.<sup>2</sup>, Janovec L.<sup>3</sup>, Ungvarský J.<sup>3</sup>, Fedoročko P.<sup>2</sup>, Kožurková M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra biochémie, ÚCHV, PF UPJŠ v Košiciach, Košice

<sup>2</sup> Katedra bunkovej biológie, ÚBEV, PF UPJŠ v Košiciach, Košice

<sup>3</sup> Katedra organickej chémie, ÚCHV, PF UPJŠ v Košiciach, Košice

## ABSTRAKT

Práca je zameraná na štúdium DNA väzbových vlastností nových 1',1''-(akridín-3,6-diyl)-3',3''-dialkylguanidínových derivátov akridínu a ich biologickú aktivitu študovanú na leukemickej bunkovej línii HL-60. Interakcie týchto zlúčenín s DNA boli sledované pomocou spektroskopických metód. Z výsledkov vyplýva, že deriváty sa interkalujú medzi bázoové páry DNA, ich väzobná konštanta  $K$  je  $1,25 - 5,26 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  a počet väzobných miest  $n$  je 2,1 - 4,1. Najväčšiu väzobnú konštantu mal etylový derivát. Biologická účinnosť testovaných látok bola stanovená analýzou zmien mitochondriálneho membránového potenciálu, aktiváciou kaspázy 3 analýzou bunkového cyklu v *in vitro* podienkach po 48 a 72h inkubácii. Najväčší cytotoxický efekt mal pentylový a hexylový derivát študovaných látok, pri ktorých došlo k nárastu počtu buniek s depolarizovaným mitochondriálnym potenciálom, zvýšeniu aktivácii kaspázy 3 a k nárastu populácie buniek v G<sub>1</sub> fáze bunkového cyklu.

## ÚVOD

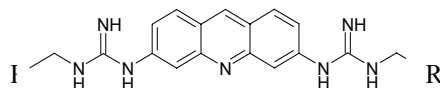
Farmakofóry založené na báze akridínov majú široké uplatnenie v antimikrobiálnej a protinádorovej terapii. Sú špeciálnou triedou zlúčenín nielen pre ich chemické a fyzikálne vlastnosti, ale sú tiež využívané ako prekursori vo farmaceutickom priemysle (Zittoun, 1985). Akridíny boli prvé chromofóry, ktoré boli detailne študované kvôli ich nekovalentným interakciám s DNA (Joseph a kol., 2003). Biologická aktivita akridínov je pripisovaná najmä ich planárnej aromatickej štruktúre, vďaka ktorej sú schopné interkalovať sa medzi bázoové páry dvojzávitnice DNA, v dôsledku čoho dochádza k interferencii s bunkovými procesmi. Protinádorové vlastnosti akridínov sa začali klinicky testovať v sedemdesiatych rokoch minulého storočia. Avšak len málo zlúčenín prešlo klinickými skúškami a iba niektoré z nich boli schválené pre chemoterapeutické využitie. Cytotoxicita pravdepodobne súvisí s enzýmovou inhibíciou, pričom tieto látky môžu silne ovplyvniť topoizomerázovú a telomerázovú aktivitu (Webb a kol., 2004).

Cieľom mojej práce bolo študovať pomocou spektroskopických metód interakcie nových diguanidínových akridínových derivátov s DNA, určiť spôsob ich interakcie, väzbové konštanty a tiež študovať ich biologickú aktivitu na leukemickej bunkovej línii HL 60.

## MATERIÁL A METODIKA

### Použité syntetizované látky

Pri štúdiu boli použité diguanidínové akridínové deriváty syntetizované na Katedre organickej chémie, PF UPJŠ v Košiciach. Na obr. 1 je znázornená ich všeobecná 2D štruktúra:



**Obr. 1:** Štruktúrny vzorec diguanidínových akridínových derivátov:  
R – etyl (1), - propyl (2), - butyl (3), - pentyl (4), - hexyl (5)

### UV – vis absorpčná spektroskopia, väzbové charakteristiky DNA – komplexov 1 - 5

UV – vis spektroskopické merania boli vykonané na Varian Cary 100 UV – Vis spektrofotometri (Varian) v 0,01 M Tris (Roth) (pH = 7,4), pri teplote 24°C. Vzorky diguanidínových

akridínových derivátov (**1** - **5**) boli rozpustené v DMSO (koncentrácia 5 mM), výsledná koncentrácia vzorky v kyvete bola 20  $\mu$ M. Spektrá boli merané v rozmedzí 300 - 500 nm. Pri spektrofotometrickej titrácii bolo ku konštantnej koncentrácii vzorky pridávané ekvivalentné množstvo teľacej DNA (ctDNA)

Výsledky zo spektrofotometrických titrácií boli vyhodnotené pomocou McGhee a von Hippelovej rovnice (Jenkins, 1997) a grafickým programom GRAFIT 4.

#### CD spektroskopia

CD spektrá boli namerané na spektropolarimetri Jasco J – 810 (Jasco). Merania sme uskutočnili v rozsahu vlnových dĺžok 220 - 300 nm. Do kyvety sme pridali 0,2 ml 0,01 M Tris (pH = 7,4). Koncentrácia vzorky v kyvete bola 1,9  $\mu$ M a koncentrácia ctDNA 80 nM.

#### Bunková línia a kultivačné podmienky

V experimente bola použitá bunková línia ľudskej promyelocytickej leukémie HL-60. Bunky boli kultivované v kompletnom médiu RPMI 1640 (GIBCO, USA) doplnenom o 10 % fetálne teľacie sérum (PAA Laboratories, Rakúsko) a antibiotiká (penicilín 100 U/ml, streptomycín 100  $\mu$ g/ml, amfotericín 25  $\mu$ g/ml; GIBCO) v inkubátore s 5 % CO<sub>2</sub> pri 37°C.

#### Analýza zmien mitochondriálneho potenciálu (MMP)

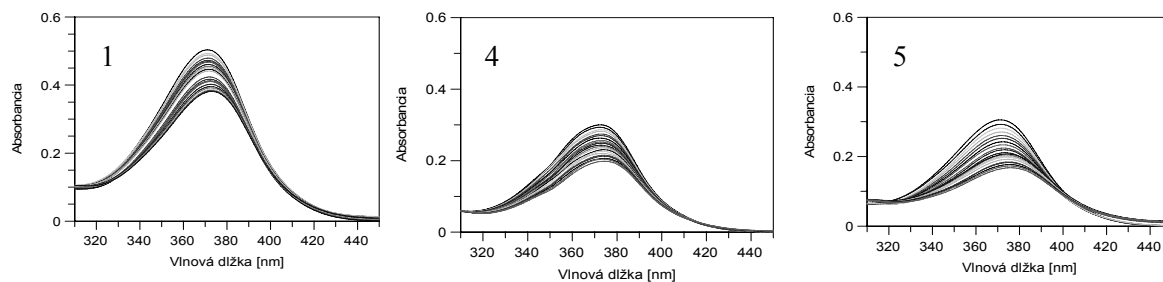
Zmeny v MMP boli analyzované pomocou prietokovej cytometrie (FACSCalibur, Becton Dickinson (BD), USA) s využitím TMRE (tetrametylénrodamín etyl ester; Molecular Probes, USA). Bunky boli zozbierané, opláchnuté s HBSS, scentrifugované, resuspendované v HBSS s obsahom 0,1  $\mu$ M TMRE a inkubované 20 min v tme pri 37°C.

#### Aktivácia kaspázy 3

Bunky boli zozbierané po 48 a 72 h inkubácii s derivátmi **1**, **4** a **5**, scentrifugované, resuspendované v BD cytofix/cytoperm Fixation and Permeabilization Solution (BD) a umiestnené 20 min. na ľade. Po inkubácii boli dvakrát premyté s Perm/Wash roztokom (BD) a označené protilátkou pre kaspázu 3 po dobu 30 min. Zmeny boli analyzované pomocou prietokového cytometra.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Diguanidínové akridínové deriváty s ctDNA vykazujú absorbanciu v rozsahu vlnových dĺžok 300 - 500 nm. Látky **1** - **5** majú intenzívne absorpčné pásy v oblasti 320 - 450 nm, ktoré sú charakteristické pre  $\pi - \pi$  elektrónové prechody konjugovaných väzieb akridínového skeletu.



**Obr. 2:** UV – vis titračné spektrum zlúčenín **1**, **4** a **5** (0,128  $\mu$ M), so zvyšujúcou sa koncentráciou ctDNA, (zhora – nadol: od 0 do 0,244 mM) v 0,01 M Tris ( pH 7,4) pri teplote 24°C.

Na obr. 2 sú zaznamenané zmeny v absorbancii po pridaní ekvivalentného množstva ctDNA. Vrchná krivka predstavuje samotné zlúčeniny, ktorých najintenzívnejšie absorpčné pásy sa nachádzajú v oblasti 320 – 450 nm. Po pridaní ctDNA absorpčné maximá pásov klesajú (hypochromizmus) a posúvajú sa k vyšším vlnovým dĺžkam (červený posun) (tab.1). Tieto významné zmeny sprevádzané batochrómnyim efektom a značným hypochromizmom potvrdzujú hypotézu interkalačného viazania sa látok do DNA (Silvestri, 2007).



**Tab. 1:** Spektrálne charakteristiky ligandov 1 – 5

Ligand	$\lambda_{\max}$ VOĽNÝ(nm)	$\lambda_{\max}$ VIAZANÝ(nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hypochromizmus (%)
1	473	472	1	56,8
2	473	470	3	86,8
3	473	472	1	68,4
4	473	471	2	85,6
5	473	471	2	89,8

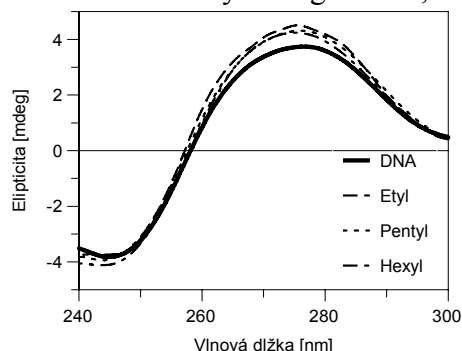
V tab. 2 sú uvedené väzobné konštanty látok 1 - 5 s ctDNA, vypočítané na základe absorpčných spektier (McGhee a von Hippel, 1974).

**Tab.2:** Väzobné charakteristiky ligandov 1 – 5 s DNA

zlúčenina	1	2	3	4	5
$K \cdot 10^5 (M^{-1})$	5,26	5,01	4,25	2,36	1,25
n	2,1	2,9	3,5	3,9	4,1

**K** – väzbová konštant,  
**n** – počet väzbových miest

CD spektroskopia sa využíva na štúdium konformačných zmien DNA. Bázové páry v B forme sú kolmé na os dvojzávitnice, čo spôsobuje slabú chiralitu molekuly. CD spektrá B formy závisia od primárnej sekvencie. Všetky B konformácie DNA sú charakterizované pozitívnym pásom pri vlnovej dĺžke 260 – 280 nm (stohovanie báz) a negatívnym pri 245 nm (polynukleotidová helicity). Cirkulárny dichroizmus je vhodnou metódou aj pri štúdiu DNA s achirálnymi nízkomolekulovými ligandami, ktoré vykazujú indukované CD spektrum. Väčšina týchto



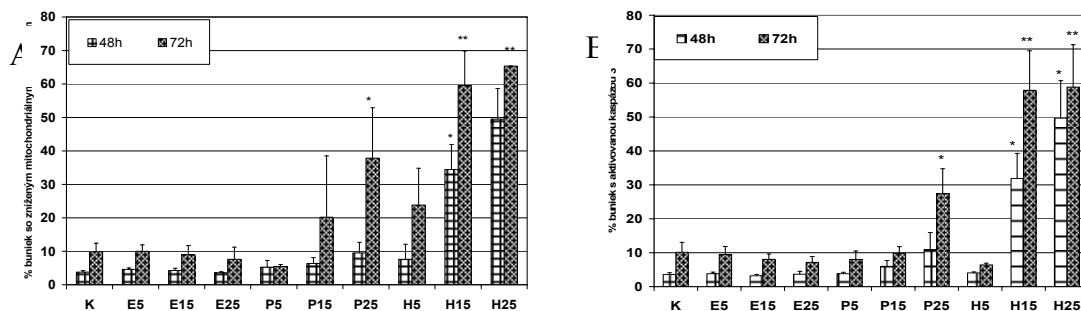
ligandov má absorpčný pás v oblasti vyšších vlnových dĺžok než DNA a intenzita indukovaných CD pásov v tejto oblasti je mierou ich viazania sa s DNA. (Wang a kol., 2001). Na obr. 3 sú uvedené CD spektroskopické štúdie látok 1, 4 a 5. Pridávaním látok k ctDNA sme pozorovali zmenu v elipticite pozitívneho pásu. Jeho zvýšenie potvrdzuje interkaláciu látky do ctDNA a stabilizáciu B formy DNA, pri negatívnom páse došlo iba k malej zmene.

**Obr. 3:** CD spektrum ctDNA (plná čiara) a s prídavkom látok 1, 4 a 5 (prerušované čiary) v 10 mM Tris (pH = 7,4, 24°C)

Biologická účinnosť testovaných látok bola stanovená analýzou zmien MMP, distribúcie bunkového cyklu a aktiváciou kaspázy 3 pomocou prietokového cytometra u buniek ľudskej promyeloidnej leukémie HL-60 v podmienkach *in vitro* po 48 a 72h inkubácii. Koncentračný rozsah testovaných derivátov bol 5, 15 a 25  $\mu$ M.

DNA je považovaná za jeden z hlavných cieľov pre protinádorové liečivá. Planárna štruktúra akridínov im umožňuje interagovať s DNA interkaláciou a tým ovplyvňovať metabolické procesy v bunke. Veľa prírodných alkaloidov a syntetických akridínových derivátov bolo testovaných ako potencionálne protinádorové liečivá, ale iba niekoľko z nich prešlo klinickými testami a boli schválené pre chemoterapiu. Afinita akridínov k DNA je využívaná na dizajn nových aktívnych zlúčenín, u ktorých boli k akridínovému jadru naviazané DNA modifikujúce skupiny (Demeunynck a kol., 2001). V našej experimentálnej práci sme testovali takéto novosyntetizované deriváty, u ktorých boli na akridínovom jadre naviazané dve guanidínové skupiny s alkylovým reťazcom o rôznej dĺžke (etyl - hexyl). Študované akridínové zlúčeniny sa taktiež interkalovali do DNA. V porovnaní s akridínovými zlúčeninami obsahujúcimi v molekule iný atóm ako dusík (napr. síru) u proflavínových ditiazolidinónov (Janovec , 2007), majú

študované diguanidínové deriváty vyššiu afinitu k DNA a ich väzobné konštanty sú rádovo 10krát vyššie. Najväčšiu väzobnú afinitu k DNA mal etylový derivát, ktorý je najmenší a najľahšie sa vloží medzi bázoové páry v porovnaní s ostatnými derivátmi, ale naopak má najnižšiu biologickú aktivitu. Je to pravdepodobne spôsobené tým, že s narastajúcim alkylovým reťazcom sa zvyšuje lipofilita zlúčeniny a tá potom ľahšie preniká do bunky. Deriváty s dlhšími reťazcami (pentyľ, hexyľ) boli pri dlhších časových intervaloch oveľa účinnejšie vo všetkých sledovaných parametroch ako etylový derivát.



**Obr. 4:** Percento buniek so zníženým mitochondriálnym potenciálom (A) a s aktivovanou kaspázou 3 (B) po 48 a 72h inkubácii so zlúčeninami **1**, **4** a **5** s koncentráciou 5, 15 a 25 µM. K – kontrola, E – etyl, P – pentyľ, H – hexyľ

Deriváty **4** a **5** spôsobili výraznú depolarizáciu MMP, avšak v prípade derivátu **1** nebola zaznamenaná žiadna zmena (obr. 4 A). V oboch sledovaných časových intervaloch taktiež došlo pri použití derivátov **4** a **5** k masívnej aktivácii kaspázy 3. Analýzou bunkového cyklu sme zaznamenali hromadenie sa buniek v G<sub>1</sub> fáze bunkového cyklu (dáta neuvedené).

## POĎAKOVANIE

Táto práca bola finančne podporená grantami VVGS PF 9/2010/Ch a VVCE-0001-07.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Zittoun R. A review of clinical data, m-AMSA. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1985; 21: 649-653
- Joseph J, Eldho NV, Ramaiah D. Control of electron-transfer and DNA binding properties by the tolyl spacer group in viologen linked acridines. *J. Phys. Chem. B.* 2003; 107:4444-4450
- Webb MR, Ebeler SE. Comparative analysis of topoisomerase IB inhibition and DNA intercalation by flavonoids and similar compounds: structural determinates of activity. *Biochem J.* 2004; 384:527 – 541
- Jenkins CJ. *Methods in Molecular Biology.* Fox K. R. Human Press. Totova. 1997; 195-218
- Silvestri A, Barone G, Ruisi G, Anselmo D, Priolo S, Liveri VT. The Interaction of native DNA with Zn (II) and Cu (II) complexes of 5-triethylammonium methyl salycidene orto-phenilendiimine. *J. Inorg. Biochem.* 2007; 101: 841-848
- Wang ZM, Lin HK, Zhou ZF, Xu M, Liu TF, Zhu SR, Chen YT. Copper(II) complexes with N,N'-dialkyl-1,10-phenanthroline-2,9-dimethanamine: synthesis, characterization, DNA-binding thermodynamical and kinetic studies. *Bioorg. Med. Chem.* 2001; 9: 2849–2855
- Demeunynck M, Charmantray F, Martelli A. Interest of acridine derivatives in the anticancer chemotherapy. *Curr. Pharm. Des.* 2001; 7:1703–1724
- Janovec L, Sabolová D, Kožurková M, Paulíková H, Kristian P, Ungvarský J, Moravčíkova E, Bajdichová M, Podhradský D, Imrich J. Synthesis, DNA interaction, and cytotoxic activity of a novel proflavine-dithiazolidinone pharmacophore. *Bioconjunct.chem.* 2007; 18: 93 – 100

## DRUHOVÁ IDENTIFIKÁCIA STAFYLOKOKOVÝCH IZOLÁTOV IZOLOVANÝCH Z MÄSA ATLANTICKEJ MAKRELY (*SCOMBER SCOMBRUS*) A STANOVENIE ICH REZISTENCIE VOČI VYBRANÝM ANTIBIOTIKÁM

Regecová I., Jevinová P., Pipová M., Marušková K., Popelka P.

Katedra hygieny potravín, Ústav hygieny a technológie mäsa, UVLF, Košice

### ABSTRAKT

Cieľom práce bolo stanoviť citlivosť u druhovo identifikovaných, koagulázo-negatívnych stafylokokových izolátov z mäsa atlantickej makrely (*Scomber scombrus*) voči siedmim antibiotikám (penicilín, cefoxitín, erytromycín, tetracyklín, ampicilín, gentamicín, vankomycín), a to s použitím agarovej dilučnej metódy.

Všetky izoláty stafylokokov boli podrobené klasifikácií rodu *Staphylococcus* založenej na analýze PCR produktu získaného z DNA cieľu 16S ribozomálnej DNA a druhovej identifikácií na základe biochemických reakcií vyhodnocovaných semi-automatickým systémom MICRONAUT. Pri stanovení minimálnych inhibičných koncentrácií (MIC) boli použité testovacie platne s nasledovnými výslednými koncentraciami penicilínu 0,06; 0,125; 0,25; 0,5 mg.l<sup>-1</sup>; cefoxitínu 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 mg.l<sup>-1</sup>, erytromycínu 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; mg.l<sup>-1</sup>; tetracyklínu 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 mg.l<sup>-1</sup>; ampicilínu 0,25; 0,5; 1,0 mg.l<sup>-1</sup>, gentamicínu 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 mg.l<sup>-1</sup> a vankomycínu 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 mg.l<sup>-1</sup>. Získané výsledky boli vyhodnotené podľa kritérií stanovených CLSI (NCCLS) pre diskový difúzny test a pre mikrodilučnú metódu (CLSI, 2006).

Zo sumarizácie dosiahnutých výsledkov vyplýva, že kultivačným mikrobiologickým vyšetrením vzoriek mrazených filiet atlantickej makrely sa získalo 14 izolátov stafylokokov, u ktorých pomocou semi-automatického systému MICRONAUT bola vykonaná druhová identifikácia na základe, ktorej sme určili 9 kmeňov *S. epidermidis*, 2 kmene *S. saprophyticus*, 2 kmene *S. hominis* a 1 kmeň *S. warneri*. U stafylokokových izolátov bola agarovou dilučnou metódou najčastejšie potvrdená rezistencia voči penicilínu, ampicilínu a erytromycínu a naopak najväčšia citlivosť bola zaznamenaná voči gentamicínu a vankomycínu. Takmer u všetkých stafylokokových izolátov bola agarovou dilučnou metódou preukázaná súčasná rezistencia na viac ako jedno testované antibiotikum.

### ÚVOD

Bakteriálne druhy v rámci rodu *Staphylococcus* sú známe ako významné ľudské a zvieracie patogény. Okrem koagulázo-pozitívneho druhu *Staphylococcus aureus* majú klinický význam aj niektoré z koagulázo-negatívnych stafylokokov (KNS), najmä *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. sciure*, *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* a *S. capitis* (VOTAVA a kol., 2003).

U týchto spomínaných druhov v poslednom období dochádza k explozívnomu nárastu rezistencie na antibiotiká. Miera ich rezistencie k antibiotikám sa výrazne líši medzi jednotlivými druhmi stafylokokov. Vysoký podiel rezistentných kmeňov sa vyskytuje najmä u druhu *S. aureus* a u druhov a poddruhov, ktoré sú najčastejšími pôvodcami nozokomiálnych infekcií. Medzi týchto zástupcov patrí *S. epidermidis*, *S. hominis* a *S. saprophyticus* (DROZENOVA a PETRÁŠ 2000). Cieľom práce bolo stanoviť citlivosť u druhovo identifikovaných, koagulázo-negatívnych stafylokokových izolátov z mäsa atlantickej makrely (*Scomber scombrus*) voči siedmim antibiotikám (penicilín, cefoxitín, erytromycín, tetracyklín, ampicilín, gentamicín, vankomycín), a to s použitím agarovej dilučnej metódy.

## MATERIÁL A METODIKA

Vzorky na mikrobiologické vyšetrenie boli odobraté zo svaloviny 4 vzoriek z mrazenej atlantickej makrely (*Scomber scombrus*) pochádzajúcich z Mraziarní Poprad s.r.o. Odber vzoriek na mikrobiologické vyšetrenie sa vykonal v súlade s požiadavkami STN ISO 3100-2; základná suspenzia a ďalšie desaťnásobné riedenia sa pripravili podľa pokynov STN ISO 6887. Z odobratých vzoriek sa stafylokoky izolovali v zmysle pokynov STN ISO 6888-1. Všetky izoláty stafylokokokov sa podrobili skúmkavkovej plazmokoagulázovej skúške (STAFYLO PK, IMUNA, Šarišské Michaľany), klasifikácií rodu *Staphylococcus* založenej na analýze PCR produktu získaného z DNA cieľu 16S ribozomálnej DNA a druhovej identifikácií na základe biochemických reakcií vyhodnocovaných semi-automatickým systémom MICRONAUT.

Citlivosť jednotlivých izolátov stafylokokokov na vybrané antibiotiká sa zisťovala pomocou agarovej dilučnej metódy. Pri stanovení minimálnych inhibičných koncentrácií (MIC) boli použité testovacie platne s nasledovnými výslednými koncentraciami penicilínu 0,06; 0,125; 0,25; 0,5 mg.l<sup>-1</sup>; cefoxitínu 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 mg.l<sup>-1</sup>; erytromycínu 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; mg.l<sup>-1</sup>; tetracyklínu 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 mg.l<sup>-1</sup>; ampicilínu 0,25; 0,5; 1,0 mg.l<sup>-1</sup> a gentamicínu 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 mg.l<sup>-1</sup>; vankomycínu 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 mg.l<sup>-1</sup>. Výsledky boli vyhodnotené podľa interpretačných kritérií stanovených CLSI (NCCLS) pre mikrodilučnú metódu (CLSI, 2006), na základe ktorých boli jednotlivé izoláty zaradené medzi citlivé (C), intermediárne citlivé (I) alebo rezistentné (R).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kultivačným mikrobiologickým vyšetrením vzoriek mrazených filiet atlantickej makrely sa získalo 14 izolátov stafylokokokov. Všetky izoláty boli na základe výsledkov skúmkavkovej plazmokoagulázovej skúšky koagulázo-negatívne. Pomocou PCR metódy bola u všetkých izolátov potvrdená prítomnosť 16S rDNA sekvencie, ktorá je charakteristická pre rod *Staphylococcus*. Pomocou semi-automatického systému MICRONAUT bola ďalej u týchto izolátov vykonaná druhová identifikácia na základe, ktorej sme určili 9 kmeňov *S. epidermidis*, 2 kmene *S. saprophyticus*, 2 kmene *S. hominis* a 1 kmeň *S. warneri*. Spomínané kmene boli následne podrobené stanoveniu citlivosti pomocou agarovej dilučnej metódy voči 7 antibiotikám.

Tab. 1 Prehľad počtu citlivých (C), intermediárne citlivých (I) a rezistentných (R) izolátov stafylokokokov z mrazených filiet atlantickej makrely voči penicilínu, cefoxitínu a erytromycínu

Druh	Počet izolátov	Penicilín			Cefoxitín			Erytromycín		
		R	I	C	R	I	C	R	I	C
<i>S. epidermidis</i>	9	8	0	1	0	1	8	7	2	0
<i>S. saprophyticus</i>	2	2	0	0	0	1	1	2	0	0
<i>S. hominis</i>	2	2	0	0	0	0	2	2	0	0
<i>S. warneri</i>	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0

Ako vyplýva z tabuľky 1, u kmeňov *S. epidermidis* bola zistená rezistencia voči penicilínu (8 kmeňov) a erytromycínu (7 kmeňov) a u kmeňov *S. saprophyticus* a *S. hominis* bola potvrdená rezistencia voči penicilínu a erytromycínu (2 kmene). U kmeňa *S. warneri* nebola potvrdená rezistencia ani na jedno antibiotikum. Zároveň ani u jedného zo spomínaných kmeňov nebola potvrdená rezistencia voči cefoxitínu.

Vychádzajúc z dosiahnutých výsledkov (Tab. 2), pri hodnotení citlivosti 14 izolátov stafylokokokov zo svaloviny makrely atlantickej voči ďalším štyrom antibiotikám, bolo zaznamenaných u kmeňov *S. epidermidis* najväčší počet rezistentných kmeňov voči ampicilínu (8 kmeňov). U kmeňov druhu *S. saprophyticus*, *S. hominis* a *S. warneri* bola potvrdená

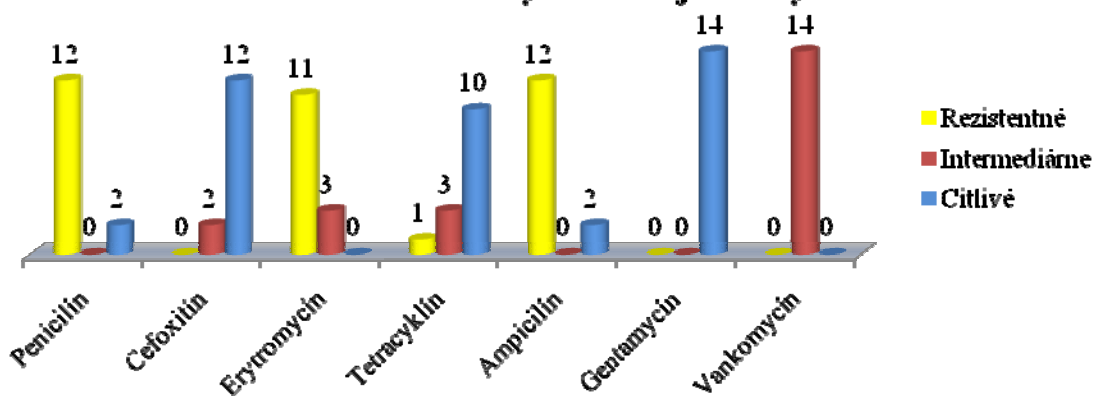
rezistencia len voči jednému antibiotiku, ampicilínu. Ani u jedného stafylokokového izolátu sa nepotvrdila rezistencia voči gentamicínu a vankomycínu.

Tab. 2 Prehľad počtu citlivých (C), intermediárne citlivých (I) a rezistentných (R) izolátov stafylokokov z mrazených filiet atlantickej makrely voči tetracyklínu, ampicilínu, gentamycínu a vankomycínu

Druh	Počet	Tetracyklín			Ampicilín			Gentamycín			Vankomycín		
		R	I	C	R	I	C	R	I	C	R	I	C
<i>S. epidermidis</i>	9	5	3	1	8	0	1	0	0	9	0	9	0
<i>S. saprophyticus</i>	2	0	0	2	2	0	0	0	0	2	0	2	0
<i>S. hominis</i>	2	0	0	2	1	0	1	0	2	0	0	0	2
<i>S. warneri</i>	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0

Vychádzajúc z dosiahnutých výsledkov (Graf 1) bola v zmysle interpretačných kritérií pre agarovú dilučnú metódu (CLSI, 2006) zo všetkých 14 kmeňov stafylokokov izolovaných zo svaloviny makrely atlantickej potvrdená najväčšia rezistencia voči penicilínu (12 kmeňov), ampicilínu (12 kmeňov) a erytromycínu (11 kmeňov). Najväčšia citlivosť bola potvrdená voči gentamicínu (14 kmeňov). U stafylokokových izolátov bola zistená aj intermediárna citlivosť, u 14 kmeňov voči vankomycínu, u 3 kmeňov voči erytromycínu a tetracyklínu, u 2 kmeňov voči cefoxitínu.

**Graf 1 Stanovenie citlivosti stafylokokových izolátov izolovaných zo svaloviny atlantickej makrely**



Z celkového počtu stafylokokových izolátov bolo u 13 kmeňov preukázaná súčasná rezistencia na 2 – 4 testované antibiotiká. Najčastejšie bola potvrdená rezistencia súčasne na viac antibiotík u kmeňov *S. epidermidis*, u 4 kmeňov bola zaznamenaná rezistencia na dve a tri antibiotiká súčasne a u 1 kmeňa na 4 antibiotiká súčasne. U kmeňov druhu *S. saprophyticus* bola zaznamenaná u 1 kmeňa rezistencia na dve antibiotiká a u 1 kmeňa na tri antibiotiká súčasne. U kmeňov rodu *S. hominis* bola potvrdená rezistencia súčasne na tri antibiotiká.

Ako vyplýva z dosiahnutých výsledkov, u stafylokokových izolátov zo svaloviny atlantickej makrely sa najčastejšie zaznamenala rezistencia na penicilín, ampicilín a erytromycín a bola tiež preukázaná rezistencia na viac ako jedno antibiotikum. Na podobné skutočnosti poukazujú aj viacerí autori, u ktorých percentuálny podiel výskytu rezistencie a multirezistencie na uvedené antibiotiká je na poprednom mieste, hoci testované stafylokokové izoláty pochádzajú z iných komodít. SHITANDI a MWANGI (2004) testovali 216 kmeňov *Staphylococcus aureus* izolovaných zo vzoriek mlieka odobratých z rôznych oblastí v Keni. Touto štúdiou bola

potvrdená rezistencia na penicilín (72,2 %), trimetoprim+sulfametazín (59,2 %), tetracyklín (57,9 %), erytromycín (21,3 %), chloramfenikol (46,8 %) a meticilín (7,8 %). EBRAHIMI a LOTFALIAN (2005) izolovali 22 koagulázo-pozitívnych stafylokokov zo vzoriek včelieho medu a následne u nich stanovili percentuálny podiel rezistencie na jednotlivé antibiotiká. Najväčšiu rezistenciu zaznamenali voči penicilínu (85,71 %) a erytromycínu (50,0 %).

Tieto výsledky dokazujú, že nárast rezistencie stafylokokových izolátov na niektoré antibiotiká v súčasnom období je alarmujúci. Preto dôležitou zbraňou proti šíreniu antibiotickej rezistencie je zabezpečenie zníženia spotreby antibiotík, zvýšenie kvality používania antimikrobiálnych prípravkov, vývoj nových antimikrobiálnych liečiv, zabezpečenie kontroly prítomnosti infekcie a rezistentných baktérií v celom potravinovom reťazci, dodržiavanie preventívnych opatrení v hygiene prostredia a monitorovanie existujúcej rezistencie na antibiotiká.

#### POĎAKOVANIE

Práca bola vykonaná vďaka finančnej podpore z grantovej úlohy VEGA 1/0661/08.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th Informational Supplement. CLSI document M100-S16. Wayne, PA, USA, 2006, 92
- Drozenová J, PETRÁŠ P. Vlastnosti koagulázo-negatívnych stafylokoků izolovaných z hemokultur. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 2000; 49: 51 – 8.
- Ebrahimi A, Lotfalian S. Isolation and antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* and coagulase positive *Staphylococcus aureus* from honey bees digestive tract. *Iranian Journal of Veterinary Research.* 2005; 6: 51 – 3.
- Shitandi A, Mwangi M. Occurrence of multiple antimicrobial resistance among *Staphylococcus aureus* isolates from Kenyan milk. *The Journal of Food Technology in Africa.* 2004; 9: 23 – 5.
- STN ISO 3100-2. Mäso a mäsové výrobky. Odber vzoriek a príprava analytických vzoriek. Časť 2: Príprava analytických vzoriek na mikrobiologické skúšanie. SÚTN Bratislava, 1999.
- STN ISO 6887. Mikrobiológia. Všeobecné pokyny na prípravu riedení pri mikrobiologickom skúšaní. SÚTN Bratislava, 1997.
- STN ISO 6888-1. Mikrobiológia potravín a krmív. Horizontálna metóda stanovenia počtu koagulázopozitívnych stafylokokov. Časť 1: Metóda s použitím Bairdovho-Parkerovho agarového média, SÚTN Bratislava, 2001.
- Votava M, Černokorská L, Herobdová M, Holá V, Mejzlíková L, Ondrovčík P, Ružička F, Dvořáčková M, Woznicová V, Zahradníček O. *Lékařská mikrobiologie speciální.* Brno, Neptún. 2003; 495 s.

# VPLYV ŠALVIOVEJ SILICE A SELENIČITANU SODNÉHO PRIJATÉHO KRMIVOM NA ANTIOXIDAČNÝ STATUS KURČIAT

Ryzner M.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Šoltésovej 4, Košice, Slovensko

## ABSTRAKT

Cieľom práce bolo sledovať vplyv éterického oleja *Salvia officinalis* a seleničitanu sodného prijatých z krmiva na niektoré parametre antioxidačného statusu, koncentrácie Se v mukóze tenkého čreva, obličky, pečeni, krvi, plazme a na fagocytárnu aktivitu v krvi kurčiat. Jednodňové brojlerky boli rozdelené do šiestich skupín po 10. Prvá pokusná skupina bola kŕmená štandardnou diétou, druhá diétou obohatenou o sľečnicový olej (1%). Tretia skupina dostávala diétu obohatenú o šalviu v koncentrácii 0,05%. Štvrtá mala diétu obohatenú o selén v množstve 0,4 mg.kg<sup>-1</sup> vo forme Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. Diéta pre piatu skupinu pozostávala z diéty obohatenej o selén v rovnakom množstve a sľečnicový olej. Šiesta skupina kurčiat dostávala diétu obohatenú o selén a šalviu. Koncentrácia Se v krvi a mukóze duodena bola signifikantne vyššia v skupinách obohatených o selén v porovnaní so skupinami bez prídavku Se. Vyšší obsah Se v 4., 5. a 6. skupine sme pozorovali aj v pečeni a obličkách. Aktivita glutathión peroxidázy (GPx) v pečeni a v mukóze duodena bola signifikantne vyššia v 4. a 6. pokusnej skupine oproti kontrole. V obličke bola GPx signifikantne zvýšená v 4. skupine oproti skupine 2 a 3. Fagocytárna aktivita bola signifikantne zvýšená v skupine s prídavkom samotného selénu, v skupine s prídavkom Se a sľečnicového oleja ako aj v skupine s prídavkom Se a šalviovej silice v porovnaní so skupinami bez prídavku Se. Celkový antioxidačný status v plazme kurčiat bol signifikantne zvýšený u kurčiat kŕmenými diétou obohatenou šalviou, u kurčiat s prídavkom Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> samotného ako aj v kombinácii so šalviou oproti kontrole. Výsledky ukazujú, že prídavok šalvie v 0,05% koncentrácii a prídavok Se 0,4 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny do krmiva zvyšujú antioxidačnú ochranu organizmu kurčiat a zároveň majú pozitívny vplyv na fagocytárnu aktivitu v krvi zvierat.

## ÚVOD

Éterické oleje sa nachádzajú v rôznych častiach rastlín a drevín. Najmä v kvetoch, plodoch, listoch, kôre a koreňoch. Pôsobia protizápalovo (Juhás a kol., 2008), antimikrobiálne (Fabian a kol., 2006), antioxidačne (Faix a kol., 2007) a majú schopnosť vychytávať voľné radikály (Hirasa & Takemasa, 1998).

Éterický olej získaný zo *Salvia officinalis* je bohatý na tujóny až 50%, cineol, salviol, borneol. V nemalej miere obsahuje aj horké diterpény, flavonoidy, fenolové kyseliny, triesloviny, horčiny, živicu a iné látky, pre ktoré je významný z aromatického a medicínskeho hľadiska. Šalvia má antimikrobiálne (Kalemba a Kunicka, 2003), antioxidačné (Bozin a kol., 2007), adstringenčné, antiflogistické, fungicídne a insekticídne vlastnosti (Pinto a kol., 2007).

Selén je esenciálny stopový prvok vyskytujúci sa v organickej a anorganickej forme. Ako súčasť selenoproteínov plní mnohé nepostrádateľné enzymatické funkcie v tele živočíchov a človeka. Najznámejším je glutathión peroxidáza (GPx), ktorá má významnú úlohu v antioxidačných reakciách pri odstraňovaní peroxidov vodíka, lipidových a fosfolipidových peroxidov a iných škodlivých hyperoxidov na membránach a v cytoplazme. Antioxidačná ochrana zabezpečuje aktívne odstraňovanie reaktívnych voľných radikálov pomocou antioxidantov (Faitweather-Tait a kol., 2010; Ďuráčková, 1997).

Cieľom práce bolo skúmať vplyv šalviovej silice a seleničitanu sodného na aktivitu GPx, antioxidačný status a fagocytárnu aktivitu u kurčiat.

## MATERIÁL A METÓDY

60 jednodňových kurčiat hybridného plemena ROSS (Párovské háje, Nitra) s priemernou živou hmotnosťou 45g bolo rozdelených do šiestich skupín po 10. Kurčatá boli umiestnené na podstielke z drevených hoblín, kde teplota a svetelný režim boli upravené pre požiadavky daného plemena a vekovej kategórie kurčiat. Voda a krmivo bolo k dispozícii pre všetky skupiny *ad libitum*. Prvá pokusná skupina bola kŕmená štandardnou diétou (BIOFEED- KKZ BR2, Kolárovo, Slovensko), druhá skupina diétou obohatenou o slnečnicový olej, pričom jeho výsledná koncentrácia v krmive bola 1%. Tretia skupina dostávala diétu obohatenú o šalviu (HANUS, Nitra) v koncentrácii 0,05%. Šalviová silica bola pred pridaním do krmiva zriedená so slnečnicovým olejom, ktorý slúžil ako vehikulum. Štvrtá skupina mala diétu obohatenú o selén v množstve 0,4 mg.kg<sup>-1</sup> vo forme Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. Diéta pre piatu skupinu pozostávala z diéty obohatenej o selén 0,4ppm a slnečnicový olej 1%. Posledná šiesta skupina kurčiat dostávala diétu obohatenú o selén 0,4 ppm a šalviu (0,05%). Kontrolnou analýzou selénu v diétach obohatených o Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> sme potvrdili obsah Se 0,56 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny a 0,21 mg.kg<sup>-1</sup> v diéte bez prídavku selénu, čo predstavovalo prirodzené pozadie Se v krmive. Po 5 týždňoch kŕmenia a eutanázii vyvolanej intraperitoneálnou aplikáciou xylazínu (Rometar 2%, SPOFA, ČR) a ketamínu (Narkamon 5%, SPOFA, ČR) v dávke 0,6 a 0,7 ml/kg živej hmotnosti, boli odobraté vzorky krvi a tkanív. Vzorky krvi, plazmy, tkanív pečene, obličiek a mukózy duodena boli uložené do mraziaceho boxu pri teplote -75 °C do doby ich analyzovania.

Aktivita glutatión peroxidázy (GPx) v pečeni, obličke, epiteli duodena a krvi bola meraná podľa Paglia a Valentine (1967). Celkový antioxidačný status (TAS) v plazme, hemoglobín (Hb) a aktivita GPx v krvi boli merané spektrofotometricky kitmi firmy Randox. Koncentráciu bielkovín v tkanivách sme stanovovali spektrofotometrickou metódou podľa Bradforda (1976). Fagocytárna aktivita bola meraná podľa Hrubíška (1981). Obsah selénu vo všetkých analyzovaných vzorkách sme stanovovali fluorometrickou metódou podľa Rodrigueza a kol. (1994). Na štatistické vyhodnotenie výsledkov bola použitá jednocestná ANOVA s Tukey post-testom a použitím GraphPad Software (USA). Výsledky sú uvedené ako priemerná hodnota ± SEM.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

**Tab.1** Koncentrácie Se v krvi a tkanivách

	Krv	Pečeň	Črevo	Oblička
	(μg.L <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> sušiny)		
1. kontrola	115.5±4.37 <sup>a</sup>	2.23±0.14	2.41±0.11 <sup>a</sup>	2.53±0.09 <sup>a</sup>
2. slneč. Olej	104.93±7.05 <sup>a</sup>	2.25±0.11	2.55±0.09 <sup>a</sup>	2.42±0.08 <sup>a</sup>
3. šalvia	104.70±4.53 <sup>a</sup>	2.11±0.13	2.46±0.06 <sup>a</sup>	2.55±0.11 <sup>a</sup>
4. selén	141.38±6.86 <sup>b</sup>	2.52±0.18	3.01±0.12 <sup>b</sup>	2.98±0.11 <sup>b</sup>
5. selén + slneč. olej	154.97±7.09 <sup>b</sup>	2.63±0.13	2.98±0.09 <sup>b</sup>	2.65±0.09
6. selén + šalvia	144.97±5.50 <sup>b</sup>	2.59±0.04	3.09±0.09 <sup>b</sup>	2.80±0.11

Výsledky sú udané ako priemer ± SEM, rozdielne písmená horného indexu predstavujú signifikantný rozdiel medzi skupinami.

Koncentrácia Se v krvi bola signifikantne vyššia v skupinách obohatených o selén v porovnaní so skupinami bez prídavku Se. Obsah selénu v mukóze duodena v skupinách dotovaných selénom bol taktiež signifikantne zvýšený oproti skupinám bez prídavku selénu. Anorganické formy selénu sú horšie utilizované a sú teda pridávané do komerčných krmív vo vyšších koncentráciách, čo spôsobuje vyššiu koncentráciu selénu v pečeni, obličkách, plazme a vo svaloch u hydiny (Echevarria a kol., 1988). Vyšší obsah Se v 4., 5. a 6. skupine sme pozorovali aj v pečeni a obličkách. Koncentrácie selénu v krvi a tkanivách sú uvedené v Tab.1.



Už predchádzajúce pokusy ukázali, že prídavok 0,4 ppm Se, či už organického alebo anorganického, zvýšili koncentráciu Se v krvi, tkanive pečeni, obličky a mukóze duodena (Kuricová a kol., 2003, Petrovič a kol., 2006).

**Tab. 2** Koncentrácia GPx v krvi a tkanivách

	Krv	Pečeň	Črevo	Oblička
	(U.g <sup>-1</sup> Hb)		(U. g <sup>-1</sup> bielkovín)	
1. kontrola	94.82±7.95	21.80±1.04 <sup>ac</sup>	13.40±1.42 <sup>a</sup>	8.26±0.98
2. slneč. olej	99.33±11.54	20.31±2.30 <sup>a</sup>	17.15±1.41 <sup>ac</sup>	5.86±0.98 <sup>a</sup>
3. šalvia	95.86±6.14	22.78±1.47 <sup>ac</sup>	16.79±1.46 <sup>ac</sup>	6.81±0.73 <sup>a</sup>
4. selén	126.21±8.46	35.88±1.63 <sup>bc</sup>	36.03±4.30 <sup>bc</sup>	14.68±3.36 <sup>b</sup>
5. selén + slneč. olej	128.75±11.71	28.44±0.99 <sup>c</sup>	21.42±3.44 <sup>ac</sup>	13.06±2.02
6. selén + šalvia	108.08±4.85	39.06±2.70 <sup>b</sup>	26.68±2.67 <sup>c</sup>	10.35±0.72

Výsledky sú udané ako priemer ± SEM, rozdielne písmená horného indexu predstavujú signifikantný rozdiel medzi skupinami

Aktivita GPx v krvi bola vyššia v skupinách s prídavkom Se, avšak jej rozdiel medzi skupinami nebol štatisticky významný. Koncentrácia GPx v obličke bola signifikantne zvýšená iba v 4. skupine oproti pokusnej skupine 2 a 3. GPx v mukóze duodena bola signifikantne vyššia v 4. a 6. skupine v porovnaní s kontrolou. Aktivita GPx v pečeni bola signifikantne najvyššia oproti kontrole v poslednej pokusnej skupine, kde zvýšenú aktivitu GPx spôsobil selén v kombinácii so šalviou (Tab.2). GPx katalyzuje redukciu peroxidu vodíka a organických hydroxiperoxidov, čím chráni bunky pred oxidatívnym poškodením. Koncentrácia glutatión peroxidázy (GPx), v krvi a tkanivách pečene, obličiek a duodenálnej sliznice boli výrazne zvýšené suplementáciou Se (Petrovič a kol., 2006).

**Tab.3** Celkový antioxidačný status (TAS) a fagocytárna aktivita

	TAS (mmol.L <sup>-1</sup> )	Fagocytárna aktivita (%)
1. kontrola	1.08±0.13 <sup>a</sup>	41.75±0.56
2. slneč. olej	1.51±0.11	40.50±0.42
3. šalvia	1.83±0.08 <sup>b</sup>	42.13±0.72
4. selén	1.98±0.21 <sup>b</sup>	48.75±0.65 <sup>a</sup>
5. selén + slneč. olej	1.68±0.21	48.75±0.53 <sup>a</sup>
6. selén + šalvia	1.88±0.24 <sup>b</sup>	49.00±0.42 <sup>a</sup>

Výsledky sú udané ako priemer ± SEM, rozdielne písmená horného indexu predstavujú signifikantný rozdiel medzi skupinami

Celkový antioxidačný status (TAS) v plazme kurčiat bol signifikantne zvýšený u kurčiat kŕmenými diétou obohatenou o šalviou silicu, tak isto aj u kurčiat 4. skupiny s prídavkom Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> ako aj u kurčiat, ktorých diéta pozostávala zo Se v kombinácii so šalviou silicou oproti kontrolnej skupine. Výsledky sú uvedené v tab.3. Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že šalviou silica sama o sebe, ako aj v kombinácii s Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> pridaného do krmiva v nami zvolenej koncentrácii, zvyšujú celkový antioxidačný status organizmu (TAS), čo zaručuje zvýšenú antioxidačnú ochranu kurčiat. Asadi a kol. (2010) analyzovali šesť druhov šalvie, kde u všetkých potvrdili antioxidačné vlastnosti, kde ich účinné látky inhibujú DNA poškodenie voľnými radikálmi.

Fagocytárna aktivita bola signifikantne zvýšená v skupine s prídavkom Se, v skupine s prídavkom Se a slnečnicového oleja ako aj v skupine s prídavkom Se, slnečnicového oleja a šalviou silice oproti kontrolnej skupine (Tab.3). Vo všeobecnosti je známe, že fagocytóza je proces typický pre bunky, ktoré označujeme ako fagocyty, medzi ktoré patria neutrofil, eozinofily, monocyty a tkanivové makrofágy. Makrofágy sú neoddeliteľnou súčasťou

imunitného systému, pôsobia ako mikrobicídne a tumoricídne efekto­ry buniek. Podávanie šalviového éterického oleja a Se stimulovalo fagocytárnu aktivitu leukocytov u nosníc. Keďže fagocytárna aktivita je len jedným z imunitných parametrov, môžeme iba predpokladať, že šalvia a selén môže zlepšovať imunitné funkcie organizmu.

Z našich výsledkov vyplýva, že šalviová silica v koncentrácii 0,05% pridaná do krmiva zvyšuje antioxidačnú ochranu brojlerov, či už sama o sebe ako aj v kombinácii so selénom. Zároveň výsledky fagocytárnej aktivity poukazujú na stimulačný vplyv prídavku samotného selénu a jeho kombinácie so šalviou na imunitný systém kurčiat ROSS.

#### POĎAKOVANIE

Tento výskum bol podporovaný grantovou agentúrou pre podporu vedy VEGA No. 2/0010/10, 1/0420/08 a APVV-0399-07.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Asadi S, Ahmadiani A, Ali Esmaeili M, Sonboli M, Ansari N. In vitro antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran. A comparative study. *Fariba Khodaghohi Food and Chemical Toxicology*. 48, 2010, 1341–1349
- Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *J Agric Food Chem* 55, 2007, p. 7879-7885
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.
- Ďuračková Z. Antioxidanty v dobrom aj zlom. *Klin. Bioch. Metab.* 1997; 5:194-199
- Echevarria M.G, Henry P.R, Ammerman C.B, Rao P.V, Miles R.D. Estimation of the relative bioavailability of inorganic selenium sources for poultry. 1. Effect of time and high dietary selenium on tissue selenium uptake. *Poult. Sci.* 67, 1988, 1295-1301
- Faitweather-Tait S.J, Collings R, Hurst R. Selénium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *Am J Clin Nutr* 2010; 91:1484-1491.
- Fabian D, Sabol M, Domaracka K, Bujnakova D. Essential oils-their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicology in vitro* 20, 2006, p. 1435-1445.
- Faix Š, Juhas Š, Faixova Z. The effect of essential oil intake on changes of plasma antioxidant status in mice. *Acta Vet. Brno.* 76, 2007, p. 357-361
- Hirasa K & Takemasa M. *Spice science and technology*. New York: Marcel Dekker. 1998
- Hrubiško M. *Hematológia a transfuziológia*. Ed. Osveta, Martin. 1981; 19
- Juhás Š, Bujňáková D, Reháč P, Čikoš Š, Czikková S, Veselá J, Il'ková G, Koppel J. Anti-Inflammatory Effects of Thyme essential Oil in Mice. *Acta Vet. Brno.* 2008; 77: 327-334.
- Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal Properties of Essential Oils. *Curr. Med. Chem.* 10, 2003, p. 813-829
- Kuricova S, Boldizarova K, Gresakova L, Levkut M, Leng L. Chicken Selenium Status When Fed a Diet Supplemented with Se-Yeast. *Acta Vet. Brno* 2003, 72: 339-346.
- Paglia D.E, Valentine W.N. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. and Clin. Med.* 1967; 70: 158-169
- Petrovič V, Boldižárová K, Faix Š, Mellen M, Arpášová H and Leng L. Antioxidant and selenium status of laying hens fed with diets supplemented with selenite or Se-yeast. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 15, 2006, 435–444
- Pinto E, Salgueiro L.R, Cavaleiro C, Palmeira A, Goncalves M.J. In vitro susceptibility of some species of yeast and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. *Industrial Crops and Products* 26, 2007, p. 135-141
- Rodriguez E.M, Sanz M.T, Romero C.D. Critical study of fluorometric determination of selenium in urine. *Talanta*, Vol. 41, 1994, p. 2025-2031

## VPLYV APLIKÁCIE MYKOTOXÍNOV A ADSORBENTU NA IMUNOKOMPETENTNÉ BUNKY U KURČIAT

Slaminková Z.<sup>1</sup>, Grešáková, Ľ.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra patologickej anatómie a patologickej fyziológie, UVLF, Košice

<sup>2</sup>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

### ABSTRAKT

Prietokovou cytometriou sme študovali vplyv nízkej a vysokej dávky mykotoxínov (DON a ZEA) a adsorbentu beta-D-glukánu na celkovú a lokálnu imunitnú odpoveď kurčiat. Do pokusu boli zahrnuté štyri skupiny – negatívna kontrola (NK), samotný adsorbent – 0,2% beta-D-glukán (A), adsorbent s nízkou dávkou mykotoxínov (NDM, DON+ZEA= 3,4+3,4mg.kg<sup>-1</sup>) a adsorbent s vysokou dávkou mykotoxínov (VDM, DON+ZEA=8,3+8,4 mg.kg<sup>-1</sup>). Prietoková cytometria, priama imunoflorescenčná metóda a značené primárne myšacie antikuracie protilátky CD3, CD4, CD8, CD44, IgG, IgM, IgA, MHC II (SouthernBiotech, USA) boli použité na meranie subpopulácií lymfocytov izolovaných z periférnej krvi a epitelu duodéna (IEL - intaeepitelové lymfocyty). Prietoková cytometria a komerčný kit Phagotest (OrfegenPharma, Nemecko) boli použité na zistenie fagocytárnej aktivity granulocytov. Hematologické vyšetrenie poukázalo na imunosupresiu v oboch skupinách NDM aj VDM. Tiež percento fagocytárnej aktivity bolo nižšie v týchto skupinách ako v NK a A. Imunofenotypizácia krvných lymfocytov preukázala tendenciu k zníženiu T buniek a populácie MHC II v skupine VDM, ale IgG bunky boli zvýšené. Fagocytárna funkcia polymorfojadrových buniek bola znížená v mykotoxínových skupinách. Duodenálne IEL populácie poukázali na zvýšenie CD8 a MHC II, ale IgA poklesli v skupinách s mykotoxínmi oproti NK a A. Priaznivý efekt beta-D-glukánu bol potvrdený v proximálnej časti duodéna, ale nebol schopný rekonštruovať zmeny spôsobené mykotoxínmi, ktoré môžeme zaradiť medzi imunotoxické látky.

### ÚVOD

Mykotoxíny sú vysoko toxické sekundárne metabolity plesní, patriace hlavne k rodom *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* a *Alternaria*. Významné sú ich toxické efekty a to karcinogenita, genotoxicita, teratogenicita, nefrotoxicita, hepatotoxicita, reprodukčné poruchy a imunosupresia, ako aj ekonomické straty (Dänicke, 2002). Deoxynivalenol, významný aj u nás, patrí medzi trichotecény typu B, produkované hlavne *Fusarium culmorum* a *F. graminearum*. Pôsobí imunostimulačne aj imunosupresívne (Pestka a kol., 2005). Mykotoxíny sa dajú odstrániť z krmív ešte predtým, než sa dostanú do gastrointestinálneho traktu, jednou z metód ich eliminácie sú adsorbenty (CAST, 2003). Medzi používané adsorbenty patrí aj beta-D-glukán, ktorý je študovaný pre jeho imunologické a farmakologické účinky. Tieto účinky boli pozorované na všetkých pokusných zvieracích druhoch, vrátane dážďoviek (Vetvička, 2004), kreviet (Duvic, 1990), rýb (Anderson, 1992), potkanov, myší (Feletti, 1992), zajacov (Ferencik, 1986), oviec, prasiat (Benkova, 1991), dobytky (Buddle, 1988) a ľudí (Hamuro, 2005). Beta-D-glukán je štruktúrally komplex homopolymérov glukózy. V minulosti sa predpokladalo, že sa vyskytuje len v trávach. Neskôr bol však zistený v stenách určitých húb, lišajníkov (Olafsdottir, 2001). Dnes je obvyčajne izolovaný z kvasníc, pšenice a chalúh (Vetvička a kol., 2004). Niektoré štúdie poukázali na možnosť využitia beta-D-glukánu pri prevencii mutagénnej aktivity (Lewin, 2001), bolo poukázané na jeho antivírusové vlastnosti. Vetvička (2004) uverejnil, že beta-D-glukán stimuluje fagocytózu, syntézu a uvoľňovanie cytokínov, ako IL-1, IL-6 a TNF-alfa. Cieľom práce bolo zistiť vplyv podania beta-D-glukánu samotného a v kombinácii s mykotoxínmi (DON, ZEA) do diéty na imunokompetentné bunky krvi a duodéna u kurčiat.

## MATERIÁL A METODIKA

Zvieratá a diéty. 60 brojlerových kurčiat plemena Ross bolo rozdelených do 4 skupín (n=15): NK, A, NDM a VDM. Všetky kurčatá boli kŕmené komerčnou kŕmnom zmesou HYD-02, ktorá bola v jednotlivých skupinách obohatená o mykotoxíny (DON+ZEA, vid' abstrakt) a adsorbent beta-D-glukán (2% v krmive).

Odber vzoriek. Vo veku 4 týždňov boli kurčatá usmrtené anestézou a intrakardiálnou punkciou krvi odobratej do heparínu. Črevo bolo odobraté do PBS.

Biely krvný obraz. Počítanie celkového počtu leukocytov bolo vykonané rutinnou laboratórnou metódou. DKO bol hodnotený svetelným mikroskopom po ofarbení krvných náterov Hemacolorom (Merck, Nemecko) a boli vypočítané absolútne hodnoty (Levkut a kol., 2009b).

Funkcia fagocytov. Pre stanovenie fagocytárnej aktivity prietokovou cytometriou (Levkut a kol., 2009a) bol použitý komerčný kit PHAGOTEST (fy ORPEGENPharma, Nemecko).

Fenotypizácia lymfocytov. Priama imunoflorescenčná metóda a prietoková cytometria boli použité pre meranie subpopulácií lymfocytov v periférnej krvi a čreve.

Pre imunoznačenie v periférnej krvi boli použité primárne myšacie antikuracie značené protilátky CD3, CD4, CD8, CD44, IgG, IgM a MHC II (SouthernBiotech, USA). Izolácia lymfocytov z periférnej krvi bola vykonaná podľa Boyuma (1974). Z duodéna boli izolované intraepitelové lymfocyty modifikáciou viacerých metód podrobnejšie uvedených v práci Levkut a kol. (2009b). Značenie duodenálnych lymfocytov bolo vykonané použitím CD3, CD4, CD8, CD44, IgA a MHC II protilátok (Levkut a kol., 2009b)

Štatistická analýza. Jednocestná ANOVA a Tukey Cramerov test v programe ArcusQuickStat boli použité pre hodnotenie priemerov, SD a signifikancie.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Biely krvný obraz (Tab. 1). Vyšetrenie celkového počtu leukocytov preukázalo najvyššie hodnoty v skupine A so signifikanciou oproti nižším hodnotám v skupinách NDM ( $P<0,05$ ) a VDM ( $P<0,0001$ ). Najnižšie hodnoty leukocytov boli zistené v skupine VDM, so signifikanciou oproti NK ( $P<0,05$ ). Rovnaká situácia bola zistená aj v absolútnych počtoch heterofilov. Pri stanovení počtu lymfocytov boli zistené najvyššie hodnoty v skupinách NK a A so signifikanciou oproti nižším počtom v skupine VDM ( $P<0,05$ ). Vyšetrenie absolútneho počtu monocytov preukázalo vyššie a rovnaké hodnoty v skupine NK a A so signifikanciou oproti skupine VDM.

Tab. 1 Absolútny počet bielych krviniek v periférnej krvi ( $G.l^{-1}=10^9.l^{-1}$ , priemer $\pm$ SD)

	NK	A	NDM	VDM
Lc	15,37 $\pm$ 4,21 <sup>a</sup>	17,40 $\pm$ 2,71 <sup>bc</sup>	10,78 $\pm$ 2,17 <sup>b</sup>	7,28 $\pm$ 2,08 <sup>ac</sup>
Ly	11,08 $\pm$ 3,66 <sup>a</sup>	10,80 $\pm$ 2,57 <sup>b</sup>	8,02 $\pm$ 1,97	5,24 $\pm$ 1,55 <sup>ab</sup>
He	4,27 $\pm$ 1,38 <sup>a</sup>	5,95 $\pm$ 1,89 <sup>bc</sup>	2,49 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup>	2,02 $\pm$ 0,73 <sup>ac</sup>
Mo	0,23 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	0,23 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	0,18 $\pm$ 0,09	0,08 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>

NK vs VDM  $P<0,05$  (Lc); A vs NDM  $P<0,05$  (Lc); A vs VDM  $P<0,0001$  (Lc)

NK vs VDM  $P<0,05$  (He); A vs NDM  $P<0,05$  (He); A vs VDM  $P<0,05$  (He)

NK vs VDM  $P<0,05$  (Ly); A vs VDM  $P<0,05$  (Ly); NK vs VDM  $P<0,05$  (Mo) A vs VDM  $P<0,05$  (Mo)

Funkcia fagocytov (Tab. 2). Stanovenie percenta fagocytárnej aktivity granulocytov preukázalo signifikantný pokles v mykotoxínových skupinách NDM a VDM v porovnaní s NK a A skupinou ( $P<0,05$ ).

Tab. 2 Percento fagocytárnej aktivity (% FA) granulocytov (priemer $\pm$ SD)

	NK	A	NDM	VDM
% FA	87 $\pm$ 5,09 <sup>ab</sup>	86 $\pm$ 4,68 <sup>cd</sup>	65 $\pm$ 13,19 <sup>ac</sup>	71 $\pm$ 3,06 <sup>bd</sup>

NK vs NDM  $P<0,05$ ; NK vs VDM  $P<0,05$ ; A vs NDM  $P<0,05$ ; A vs VDM  $P<0,05$

Fenotypizácia lymfocytov v krvi (Tab. 3). Stanovenie CD3 a CD4 buniek preukázalo signifikantný pokles v skupine VDM oproti NK ( $P < 0,05$ ). V absolútnom počte CD8+ buniek neboli zaznamenané signifikantné rozdiely medzi jednotlivými skupinami, avšak došlo k poklesu hodnôt v skupine A a VDM oproti NK. Hodnoty absolútnych počtov CD44 buniek boli najnižšie v skupine VDM a najvyššie v skupine NK. Hodnoty v skupine A boli mierne znížené oproti NK. Stanovenie IgG preukázalo nesignifikantný nárast hodnôt v skupinách A, NDM a VDM oproti NK. Naopak, pri IgM bol zistený nesignifikantný pokles v pokusných skupinách oproti NK. Podobná situácia nastala aj pri stanovení MHC II, kde došlo tiež k poklesu hodnôt pokusných skupín oproti NK, v skupine VDM až signifikantne.

Tab. 3 Absolútny počet subpopulácií lymfocytov v periférnej krvi ( $G \cdot l^{-1} = 10^9 \cdot l^{-1}$ , priemer  $\pm$  SD)

	NK	A	NDM	VDM
CD3	$3,22 \pm 1,56^a$	$2,11 \pm 0,85$	$2,57 \pm 0,85$	$1,35 \pm 0,63^a$
CD4	$2,48 \pm 1,18^a$	$1,81 \pm 0,70$	$2,06 \pm 0,66$	$1,11 \pm 0,52^a$
CD8	$0,70 \pm 0,54$	$0,34 \pm 0,19$	$0,62 \pm 0,25$	$0,32 \pm 0,17$
CD4/CD8	$5,55 \pm 3,67$	$6,13 \pm 2,18$	$3,56 \pm 0,99$	$3,55 \pm 0,57$
CD44	$4,70 \pm 2,18$	$3,31 \pm 1,16$	$4,00 \pm 1,47$	$2,34 \pm 1,05$
IgG	$0,37 \pm 0,17$	$0,46 \pm 0,20$	$0,51 \pm 0,30$	$0,50 \pm 0,18$
IgM	$0,30 \pm 0,27$	$0,22 \pm 0,15$	$0,19 \pm 0,07$	$0,13 \pm 0,06$
MHC II	$0,42 \pm 0,20^a$	$0,33 \pm 0,10$	$0,26 \pm 0,07$	$0,16 \pm 0,08^a$

NK vs VDM  $P < 0,05$  (CD3); NK vs VDM  $P < 0,05$  (CD4); NK vs VDM  $P < 0,05$  (MHC II)

Intraepitelové lymfocyty duodéna (Tab. 4). Vyšetrenie CD3 v čreve preukázalo nesignifikantný nárast hodnôt v skupine A oproti NK. Rovnaká situácia nastala aj pri CD4 lymfocytoch. U CD8 boli pozorované najvyššie hodnoty v skupine NDM a to so signifikanciou ( $P < 0,05$ ) oproti NK aj A. V skupine VDM boli hodnoty CD44 najnižšie. Stanovenie MHC II preukázalo signifikantný nárast v mykotoxínových skupinách oproti NK aj oproti A. Hodnoty IgA boli signifikantne najvyššie v skupine A oproti NK ( $P < 0,05$ ), tiež bol zistený signifikantný pokles hodnôt v skupine NDM a v skupine VDM oproti NK a A.

Tab. 4 Relatívne percento subpopulácií duodenálnych IEL (priemer  $\pm$  SD)

	NK	A	NDM	VDM
CD3%	$27,62 \pm 4,53$	$33,81 \pm 7,75$	$29,81 \pm 5,14$	$21,54 \pm 7,79$
CD4%	$5,40 \pm 0,87$	$6,02 \pm 1,98$	$4,37 \pm 1,29$	$3,6 \pm 1,50$
CD8%	$22,75 \pm 8,69^a$	$25,97 \pm 6,71^b$	$44,58 \pm 5,17^{ab}$	$36,62 \pm 11,48$
CD44%	$42,56 \pm 10,18$	$39,89 \pm 18,03$	$40,29 \pm 12,35$	$29,34 \pm 14,49$
MHC II%	$1,75 \pm 0,74^{ab}$	$2,3 \pm 1,71^{cd}$	$28,74 \pm 5,23^{ac}$	$20,41 \pm 8,54^{bd}$
IgA	$6,65 \pm 2,96^{abc}$	$10,82 \pm 1,49^{ade}$	$1,32 \pm 0,76^{bd}$	$0,87 \pm 0,47^{ce}$

NK vs NDM  $P < 0,05$  (CD8); A vs NDM  $P < 0,05$  (CD8); NK vs NDM  $P < 0,0001$  (MHC II);

NK vs VDM  $P < 0,05$  (MHC II); A vs NDM  $P < 0,0001$  (MHC II); A vs VDM  $P < 0,05$  (MHC II); NK vs A  $P < 0,05$  (IgA); NK vs NDM  $P < 0,05$  (IgA); NK vs VDM  $P < 0,05$  (IgA);

A vs NDM  $P < 0,0001$  (IgA); A vs VDM  $P < 0,0001$  (IgA)

Vetvička (2006, 2007) zistil zvýšenie hodnôt CD4+, CD8+, CD71+ a CD122+ buniek na 2. d. po i.p. aplikácii, na 3. a 4. deň signifikantné zvýšenie v počte CD19+ buniek. Došlo aj k stimulácii IL-2 a zvýšeniu počtu IgM a IgG protilátok. Podobné výsledky získal Arinaga (1992). Ross a Vetvička (1999) popísali vo svojej práci stimuláciu NK buniek po podaní beta-D-glukánu. Rôzne druhy glukánov sú známe ako stimulanty fagocytózy (Abel a kol., 1989, Konopski a kol., 1991, Tomoda a kol., 1994). V našom pokuse beta-D-glukán preukázal priaznivý účinok predovšetkým na IEL duodéna, čo sa prejavilo zvýšením tak T, ako aj B lymfocytov v A skupine, ale nerekonštituoval počty v mykotoxínových skupinách.

## POĎAKOVANIE

Práca bola podporená grantami VEGA MŠ SR č. 1/0044/08, 1/0580/08, 1/0609/09, 2/0006/09, a SVVA SR č. APVT-51-004804, LPP-0213-06, LPP-0219-09, ako aj realizáciou projektu INFEKTZOON, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Abel G, Szolosi J, Chihara G, Facht J. Effect of lentinan and mannan on phagocytosis of fluorescent latex microbeads by mouse peritoneal macrophages: a flow cytometric study. *Int J Immunopharmacol.* 1989; 11:615-21.
- Anderson DP. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture *Ann Rev Fish Dis.* 1992; 1:281-307.
- Arinaga S, Karimine N, Takamuku K, Nanbara S, Nagamatsu M, Ueo H. Enhanced production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by peripheral monocytes after lentinan administration in patients with gastric carcinoma. *Int J Immunopharm.* 1992; 14:44-9.
- Benková M, Borošková Z, Šoltýs J. Immunostimulatory effects of certain substances in experimental ascaridiasis in pigs. *Vet. Med.* 1991; 36: 717-24
- Boyum MA. Separation of blood leukocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens* 1974; 4:269-74.
- Buddle MM, Pulford HD, Ralston M. Protective effect of glucan against experimentally induced staphylococcal mastitis in ewes. *Vet Microbiol.* 1988; 16:67-76.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology): Mycotoxins: Risk in plant, animal and human systems. Task Force Report No. 139, Ames, Iowa, USA. 2003
- Dänicke S. Prevention and control of mycotoxins. *World's Poult J.* 2002; 58:452-75.
- Duvic B, Soderhall J. Purification and characterization of a  $\beta$ -1,3-glucan. *Biol Chem.* 1990; 265:9332-7.
- Feletti F, Bernardi di Valserra, Contos S, Mattaboni P, Germogli R. Chronic toxicity study on a new glucan extracted from *Candida albicans* in rats. *Drug Res.* 1992; 42:1363-7.
- Ferencik M, Kotulova D, Masler L, Bergendi L, Sandula J, Stefanovic J. Modulatory effect of glucans on the functional and biochemical activities of guinea-pig macrophages. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1986; 8:163-66.
- Hamuro J. Anticancer immunotherapy with perorally effective lentinan. *Gan To Kagaku Ryoho* 2005; 32:1209-15.
- Konopski Z, Rasmussen LT, Seljelid R, Eskeland T. Phagocytosis of beta-1,3,-D-glucan-derivatized microbeads by mouse peritoneal macrophages involves three different receptors. *Scand J Immunol.* 1991; 33:297-306.
- Levkut M, Pistl J, Lauková A, Revajová V, Herich R, Ševčíková Z, Stropfiová V, Szaboová R, Kokinčáková T. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* EF55 against *Salmonella* Enteritidis in chicks. *Acta Vet Hung.* 2009a; 57:13-4.
- Levkut M, Revajová V, Levkutová M, Ševčíková Z, Herich R, Borutová R, Leng E. Leucocytic responses of broilers following dietary contamination with deoxynivalenol and/or treatment by dietary selenium supplementation. *Br Poult Sci.* 2009b; 50:181-87.
- Lewin B. *Genes VII.* Porto Alegre: Artmed. 2001; 955 pp.
- Olafsdottir ES, Ingollfsdottir, K. Polysaccharides from lichens, structural characteristic and biological activity. *Planta Med.* 2001; 67:199-208.
- Pestka JJ, Smolinski AT. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J Toxicol Environ Health B Crit. Rev.* 2005; 8:39-69.
- Ross GD., Vetvicka V, Yan J, Xia Y, Vetvickova J. Therapeutic intervention with complement and beta-D-glucan in cancer. *Immunopharmacol.* 1999; 42:61.
- Tomoda M, Ohara N, Shimizu N, Gonda R. Characterization of a novel glucan, which exhibits reticuloendothelial system-potentiating and anticomplementary activities, from the rhizome of *Cnidium officinale*. *Chem Pharm Bull.* 1994; 42:630-3.
- Vetvička V, Sima P. Beta-glucan in invertebrates. *ISJ* 2004, 1:60-5.

## DÔKAZ AMINOGLYKOZIDOVÝCH ANTIBIOTÍK V KRAVSKOM, OVČOM A KOZOM MLIEKU

Sýkorová Goffová Z. , Kožárová I. , Máté D.

*Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach*

### ABSTRAKT

Na stanovenie aminoglykozidových antibiotík (AMG) (streptomycín, neomycín, gentamicín, spektinomycín a kanamycín) vo fortifikovaných vzorkách kravského, ovčieho a kozieho mlieka boli predmetom našej štúdie tri mikrobiálne inhibičné testy (MIT), metóda STAR, Delvotest<sup>®</sup>SP-NT a Total antibiotics. Detekčnú citlivosť použitých MIT sme hodnotili na základe minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC), čo predstavuje detekčný limit použitých metód (LOD). Najcitlivejšou metódou bola metóda STAR, kde MIC až na spektinomycín, ktorý nebol detekovaný ani pri koncentrácií 1,0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , bola nielen v hladinách záujmu, ale dokonca aj nižších koncentráciách, ako sú stanovené maximálne reziduálne limity (MRL), pre použité AMG antibiotiká. MIC gentamicínu bola 0,05  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  v kravskom a kozom mlieku a 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  v ovčom mlieku, neomycínu 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pri všetkých druhoch mlieka, kanamycínu 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  v kravskom a kozom mlieku a v prípade ovčieho bola citlivosť nižšia, 0,2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Detekčná citlivosť pre streptomycín bola na úrovni 0,2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  vo všetkých vyšetovaných vzorkách. Delvotest<sup>®</sup>SP-NT a Total antibiotics zachytávali na úrovni MRL iba neomycín vo všetkých vyšetovaných vzorkách mlieka a gentamycín v kravskom mlieku. Detekčná citlivosť týchto dvoch MIT v liekovkách je nedostatočná.

### ÚVOD

Aplikácia antibiotík pri liečbe hospodárskych zvierat má za následok kumuláciu týchto látok v produktoch živočíšneho pôvodu, vrátane mlieka, ktoré sa cestou potravinového reťazca dostanú priamo až k spotrebiteľovi a môžu vážne ohroziť jeho zdravie. Z hľadiska nebezpečenstva pre spotrebiteľa ide predovšetkým o alergizujúci, sensibilizujúci a imunosupresívny účinok a vznik rezistencie na antibiotiká. V mliekarskom priemysle dochádza k závažným technologickým problémom výroby fermentovaných mliečnych výrobkov (syry, jogurty), inhibíciou bakteriálnych fermentačných procesov (Molina a kol., 2003, Sierra a kol., 2009).

Mlieko je pokladané za užitočnú surovinu vhodnú pre výživu novorodencov, dojčiat a malých detí, a preto požiadavky na bezpečnosť a neškodnosť tejto potraviny sú vyššie ako na iné druhy potravín (Cullor, 1992).

Metódy používané za účelom úradnej kontroly rezíduí veterinárnych liekov v potravinách živočíšneho pôvodu musia spĺňať požiadavky ustanovené rozhodnutím Komisie č. 2002/657/ES, ktorým sa vykonáva smernica Rady č. 96/23/ES, ktorá sa týka uplatňovania analytických metód a interpretácie výsledkov. Na stanovenie rezíduí inhibičných látok v mlieku sa používajú štyri úradné metódy laboratórnej diagnostiky potravín a krmív, metóda STAR, Delvotest<sup>®</sup>SP-NT, Kalidos TB, MP a Eclipse 50.

Prezentovaná práca sa zaoberá zhodnotením detekčnej citlivosti MIT (STAR, Delvotest<sup>®</sup>SP-NT, Total antibiotics) na rezíduá AMG antibiotík vo fortifikovanom kravskom, ovčom a kozom mlieku, na základe experimentálneho stanovenia základných hodnotiacich kritérií, MIC a LOD pre sledované látky zo skupiny AMG antibiotík. Uvedené kritéria boli porovnávané s MRL stanovenými v mlieku nariadením Komisie (EÚ) č. 37/2010 (100  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pre gentamycín, 150  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pre kanamycín, 1500  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pre neomycín, 200  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pre streptomycín a spektinomycín).

## MATERIÁL A METODIKA

V práci boli použité 3 MIT, STAR, ako difúzna platňová metóda (CH.12.19, 2006) s použitím testovacieho kmeňa *Bacillus subtilis* 10649 s citlivosťou na AMG antibiotiká a dvoch difúzných metód v liekovkách, Delvotest<sup>®</sup>SP-NT (CH 12.17., 2006) a Total antibiotics zakúpený od firmy BIOMEDICA, Slovensko, s testovacím kmeňom *Bacillus stearotherophilus var. calidolactis*. Detekčná citlivosť mikrobiálnych inhibičných testov bola zhodnocovaná pre 5 látok zo skupiny AMG antibiotík (streptomycín, neomycín, gentamicín, spektinomycín a kanamycín) vo fortifikovaných vzorkách kravského, ovčieho a kozieho mlieka. Na prípravu fortifikovaných vzoriek sa použilo kravské mlieko, ktoré bolo získané z mliečneho automatu, predávaného podľa nariadenia vlády SR č. 352/2009 Z. z.. Ovčie a kozie mlieko bolo odoberané zo salaša na východnom Slovensku. Do mlieka prostého rezíduí inhibičných látok sa pridávali pracovná roztoky AMG antibiotík tak, aby výsledná koncentrácia vo vyšetovaných vzorkách bola od 0,01 do 2,0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Ako negatívna kontrola boli použité vzorky mlieka bez prídavku AMG antibiotík. Takto pripravené vzorky mlieka boli zohriate vo vodnom kúpeli pri teplote 45 °C po dobu 10 minút a následne podrobené vyšetreniu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Dosiahnuté výsledky sú prezentované v Tabuľke 1 – 3.

Pri hodnotení metódy STAR, prítomnosť inhibičných látok sa prejavuje vznikom čírych zón, tzv. zóny inhibície okolo vyšetovaných vzoriek a vzorky mlieka sa považujú za pozitívne, ak je zóna inhibície väčšia ako 2 mm. Tvorba inhibičných zón bola pozorovaná pri MIC gentamicínu 0,05  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  v kravskom a kozom mlieku a 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  v ovčom mlieku, neomycínu 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pri všetkých druhoch mlieka, kanamycínu 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  v kravskom a kozom mlieku, v prípade ovčieho bola citlivosť nižšia, a to 0,2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Detekčná citlivosť pre streptomycín bola na úrovni 0,2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  vo všetkých vyšetovaných vzorkách. Citlivosť na spektinomycín zaznamenaná nebola ani pri koncentrácií 1,0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Veľkosti inhibičných zón kravského a kozieho mlieka boli približne na rovnakej úrovni na rozdiel od ovčieho mlieka, kde boli pozorované výrazne menšie zóny inhibície. Z pohľadu MRL bola MIC až na spektinomycín v hladinách záujmu a dokonca aj koncentráciách nižších, ako sú stanovené MRL.

Pri difúzných metódach v liekovkách (Delvotest<sup>®</sup>SP-NT, Total antibiotics) sa hodnotila farba zo spodných 2/3 agaru v ampulke. Žlté sfarbenie pevného média znamená neprítomnosť antimikrobiálnych látok v príslušných vzorkách mlieka pri detekčnom limite alebo pod jeho hranicou. Žlto-fialové sfarbenie pevného média znamená prítomnosť antimikrobiálnych látok v blízkosti detekčného limitu. Fialové sfarbenie pevného média znamená prítomnosť antimikrobiálnych látok pri detekčnom limite alebo nad jeho hranicou.

Delvotest<sup>®</sup>SP-NT zaznamenal nižšiu citlivosť k vybraným AMG antibiotikám. MIC gentamicínu bola v kravskom mlieku 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a 0,2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  v ovčom a kozom mlieku. Podobne bola zaznamenaná nižšia citlivosť pri ovčom mlieku aj pre neomycín, a to 0,2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pre kravské a kozie mlieko a 0,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pri ovčom mlieku. MIC spektinomycínu a streptomycínu bola 1,0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  vo všetkých vyšetovaných vzorkách, v prípade kanamycínu to bola koncentrácia 2,0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Detekčná citlivosť Delvotestu<sup>®</sup>SP-NT bola na úrovni MRL alebo aj nižšej, ako sú stanovené MRL pre gentamycín v kravskom mlieku a neomycín pre všetky druhy mlieka.

Novšou alternatívou Delvotestu<sup>®</sup>SP-NT je Total antibiotics, ktorý spoľahlivo detekoval podobne ako Delvotestu<sup>®</sup>SP-NT iba neomycín vo všetkých vyšetovaných vzorkách mlieka a gentamycín v kravskom mlieku. Citlivosť oboch difúzných inhibičných testov v liekovkách pre vybrané AMG je nedostatočná.

MIT ako screeningové metódy boli vyvinuté pre prvotný screening rezíduí antibiotík hlavne v kravskom mlieku a ich používanie pre ovčie a kozie mlieko má väčšiu pravdepodobnosť výskytu falošne pozitívnych výsledkov. Príčinou falošne pozitívnych výsledkov môžu byť nešpecifické látky, napr. lyzozým alebo laktoferín, ktoré sa nachádzajú v mastitídnom mlieku alebo kolostre,



podobne ako vysoké počty somatických buniek, kde je ich množstvo vyššie v ovčom a kozom mlieku v porovnaní s kravským mliekom (Navrátilová, 2008, Montero a kol., 2005). Rozdiely detekčnej citlivosti metód pri jednotlivých druhoch mlieka súvisia aj s rozdielmi v zložení mlieka, kde nejde len o rozdiely v percentuálnom zastúpení jednotlivých zložiek mlieka, ale jednotlivé zložky tiež vykazujú určité odlišnosti (napr. zastúpenie mastných kyselín v tuku alebo aminokyselín v bielkovinách).

Z pomedzi vyššie uvedených MIT je pre screening rezíduí AMG antibiotík najcitlivejšou alternatívou metóda STAR. Pre širší záber antimikrobiálnych látok je však vhodná ich kombinácia.

**Tab. 1 STAR – priemerné veľkosti inhibičných zón (mm ± SD) produkované reziduálnymi koncentraciami AMG antibiotík vo fortifikovaných vzorkách kravského, ovčieho a kozieho mlieka**

AMG		Koncentrácia AMG ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )					
		0,01	0,05	0,1	0,2	0,5	1,0
Neomycín	KrM	0	0	1,10 ± 0,05	2,25 ± 0,12	3,26 ± 0,18	3,75 ± 0,05
	OM	0	0	0,50 ± 0,05	0,61 ± 0,04	0,65 ± 0,03	1,75 ± 0,29
	KM	0	0	1,34 ± 0,19	2,43 ± 0,18	3,64 ± 0,28	3,91 ± 0,28
Streptomycín	KrM	0	0	0	1,05 ± 0,34	2,53 ± 0,25	3,33 ± 0,40
	OM	0	0	0	0,47 ± 0,11	0,67 ± 0,06	0,84 ± 0,12
	KM	0	0	0	0,55 ± 0,24	2,55 ± 0,47	3,73 ± 0,68
Gentamicín	KrM	0	0,58 ± 0,20	1,29 ± 0,12	2,56 ± 0,11	3,09 ± 0,40	4,36 ± 0,44
	OM	0	0	0,46 ± 0,03	1,57 ± 0,39	2,59 ± 0,01	3,19 ± 0,25
	KM	0	0,77 ± 0,35	2,06 ± 0,39	2,62 ± 0,14	4,00 ± 0,20	4,57 ± 0,01
Kanamycín	KM	0	0	0,86 ± 0,43	2,07 ± 0,62	2,96 ± 0,22	4,30 ± 0,45
	OM	0	0	0	0,59 ± 0,12	0,92 ± 0,22	2,03 ± 0,35
	KM	0	0	0,43 ± 0,04	1,28 ± 0,05	2,48 ± 0,16	3,86 ± 0,20
Spektinomycín	KrM	0	0	0	0	0	0
	OM	0	0	0	0	0	0
	KM	0	0	0	0	0	0

KrM – kravské mlieko, OM – ovčie mlieko, KM – kozie mlieko, SD – smerodajná odchýlka

**Tab. 2 Delvotest® SP-NT – detekovateľná koncentrácie AMG antibiotík vo fortifikovaných vzorkách kravského, ovčieho a kozieho mlieka**

AMG		Koncentrácia AMG ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )							
		0,01	0,05	0,1	0,2	0,5	1,0	1,5	2,0
Neomycín	KrM	-	-	-	±	+	+	+	+
	OM	-	-	-	-	±	+	+	+
	KM	-	-	-	±	+	+	+	+
Streptomycín	KrM	-	-	-	-	-	±	+	+
	OM	-	-	-	-	-	±	+	+
	KM	-	-	-	-	-	±	+	+
Gentamicín	KrM	-	-	±	+	+	+	+	+
	OM	-	-	-	±	+	+	+	+
	KM	-	-	-	±	+	+	+	+
Kanamycín	KrM	-	-	-	-	-	-	-	±
	OM	-	-	-	-	-	-	-	±
	KM	-	-	-	-	-	-	-	±
Spektinomycín	KrM	-	-	-	-	-	±	+	+
	OM	-	-	-	-	-	±	+	+
	KM	-	-	-	-	-	±	+	+

+ pozitívny výsledok, - negatívny výsledok, ± dubiózny výsledok

KrM – kravské mlieko, OM – ovčie mlieko, KM – kozie mlieko

**Tab. 3 Total antibiotics – detekovateľná koncentrácie AMG antibiotík vo fortifikovaných vzorkách kravského, ovčieho a kozieho mlieka**

		Koncentrácia AMG ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )							
AMG		0,01	0,05	0,1	0,2	0,5	1,0	1,5	2,0
Neomycín	KrM	-	-	±	+	+	+	+	+
	OM	-	-	±	+	+	+	+	+
	KM	-	-	-	-	±	+	+	+
Streptomycín	KrM	-	-	-	-	±	+	+	+
	OM	-	-	-	-	±	+	+	+
	KM	-	-	-	-	±	+	+	+
Gentamicín	KrM	-	-	±	+	+	+	+	+
	OM	-	-	-	±	+	+	+	+
	KM	-	-	-	-	±	+	+	+
Kanamycín	KrM	-	-	-	-	-	-	-	±
	OM	-	-	-	-	-	-	±	+
	KM	-	-	-	-	-	-	±	+
Spektinomycín	KrM	-	-	-	-	-	-	±	+
	OM	-	-	-	-	-	±	+	+
	KM	-	-	-	-	±	+	+	+

+ pozitívny výsledok, - negatívny výsledok, ± dubiózny výsledok

KrM – kravské mlieko, OM – ovčie mlieko, KM – kozie mlieko

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- CH 12.17. Stanovenie rezíduí inhibičných látok v mlieku a mliečnych výrobkoch metódou DELVOTEST<sup>®</sup>SP-NT. Zoznam úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív. Vestník MP SR, XXXVIII, 2006; 13: 60–63.
- CH 12.19: Screeningový test na stanovenie rezíduí antibiotík s použitím piatich bakteriálnych kmeňov (metóda STAR). Zoznam úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív. Vestník MP SR, XXXVIII, 2006; 13: 68–81.
- Cullor J. S. Tests for identifying antibiotic residues in milk. How well do they work? Symposium on antibiotic residues. Veterinary Medicine. 1992; 1235–1241.
- Molina M. P., Althaus R., Molina N., Fernández, N. Antimicrobial agent detection in ewe milk by the microbial inhibitor test brilliant black reduction – BRT AiM<sup>®</sup>. International Dairy Journal. 2003; 13: 821–826.
- Montero A., Althaus R. L., Molina A., Berruga I., Molina M. P. Detection of antimicrobial agents by a specific microbial method (Eclipse 100<sup>®</sup>) for ewe milk. Small Ruminant Research. 2005; 57: 229–237.
- Nariadenie Komisie (EÚ) č. 37/2010, o farmakologicky účinných látkach a ich klasifikácií, pokiaľ ide o maximálne limity rezíduí v potravinách živočíšneho pôvodu. Úradný vestník EÚ L 15, 22. 12. 2009; 1-72.
- Nariadenie vlády Slovenskej republiky č. 352/2009 Z. z., ktorým sa ustanovujú hygienické požiadavky na priamy predaj a dodávanie malého množstva prvotných produktov živočíšneho pôvodu, mäsa z hydiny a domácich králikov, voľne žijúcej zveri a zveriny z nej. Zbierka zákonov č. 352/2009; 124: 2746-2755.
- Navrátilová P. Screening methods use for the detection of veterinary drug residues in cow milk – a review. Czech J. Food. Sci. 2008; 26: 393-401.
- Rozhodnutie Komisie 2002/657/ES, ktorým sa implementuje smernica Rady 96/23/ES, ktorá sa týka uplatňovania analytických metód a interpretácie výsledkov. Úradný vestník EÚ L 221, 17. 8. 2002; 8–36.
- Sierra D., Contreras A., Sánchez A., Luengo C., Corrales J. C., Morales, C. T., de la Fe C., Guirao I. Short communication: Detection limit of non  $\beta$ -lactam antibiotic in goat milk by microbiological residues screening tests. J. Dairy Sci. 2009; 92: 4200–4206.

# POROVNANIE ÚČINKU BAKTERIOCÍN PRODUKUJÚCEHO KMEŇA *ENTEROCOCCUS FAECIUM* CCM4231 A JEHO ENTEROCÍNU V EKOSYSTÉME KRÁLIKA

Szabóová R.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

## ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bolo porovnať účinok bakteriocinogénneho a probiotického kmeňa *Enterococcus faecium* CCM4231 a jeho enterocínu Ent4231 v chove brojlerových králikov. Probiotický kmeň EF CCM4231 (v čerstvej forme) a jeho Ent4231 boli aplikované do vody počas 21 dní. Experiment trval 42 dní. Počas experimentu boli králiky v dobrej zdravotnej kondícii. Napriek nižšej kolonizácii kmeňa EF CCM4231 v ekosystéme králika ( $1,8 \pm 0,69 \log_{10}$ KTJ/g), bol zaznamenný jeho antimikrobiálny účinok, t. j. boli zistené signifikantne nižšie počty koaguláza-pozitívnych stafylokokov ( $P < 0.001$ ) a koaguláza-negatívnych stafylokokov ( $P < 0.001$ ) na 7. deň aplikácie kmeňa. Taktiež bola zaznamenaná redukcia koaguláza-negatívnych stafylokokov na 42. deň experimentu ( $P < 0,01$ ). Redukcia *Clostridium-like* sp. bola detegovaná v skupine zvierat počas a po aplikácii Ent4231, t.j. na 21. deň (rozdiel  $1,5 \log_{10}$ KTJ/g) a 42. deň (rozdiel  $1,0 \log_{10}$ KTJ/g) ako aj v skupine zvierat prijímajúcich kmeň EF CCM4231 na 21. deň experimentu (rozdiel  $1,1 \log_{10}$ KTJ/g) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Najvyššia redukcia oocýst *Eimeria* sp. bola zaznamenaná v experimentálnej skupine s kmeňom EF CCM4231, a to na 21. deň experimentu ( $120$  OPG/g) v porovnaní s kontrolnou skupinou ( $1184$  OPG/g). V oboch experimentálnych skupinách sa preukázal signifikantný imunostimulačný efekt (fagocytárna aktivita,  $P < 0.001$ ). Biochemické i zootechnické parametre ako aj nutričná hodnota králičieho mäsa neboli podávaním probiotického kmeňa a jeho enterocínu negatívne ovplyvnené. Napriek ruminálnemu pôvodu, kmeň EF CCM4231 a jeho bakteriocín Ent4231 sa prejavili ako sľubné aditíva v chove brojlerových králikov.

## ÚVOD

Brojlerový chov králikov je výhodný z hľadiska biologických vlastností králika. Majú intenzívny rast, plodnosť a krátky generačný interval. Mäso králika je charakteristické nízkym obsahom tuku, cholesterolu a sodíka (Combes, 2004). Medzi inováčné metódy udržania zdravého chovu králikov môžeme zaradiť aj podávanie aditív na prírodnej báze (napr. bakteriocín-produkujúce mikroorganizmy s probiotickým účinkom a ich produkty- bakteriocíny) na prevenciu alebo elimináciu hnačkových ochorení bakteriálneho ako aj protozoálneho pôvodu vyskytujúcich sa v ekosystéme králikov najmä v období po odstave. Aplikácia aditív je opodstatnená aj vzhľadom na zákaz používania antibiotík ako rastových stimulátorov v chovoch zvierat (od 1.1.2006, EÚ). Na našom pracovisku (Laboratórium živočíšnej mikrobiológie, Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Slovenská akadémia vied, Košice, Slovenská republika) bol izolovaný a preštudovaný bakteriocinogénny kmeň s probiotickým účinkom *Enterococcus faecium* CCM4231 (EF CCM4231; deponovaný v Českej zbierke mikroorganizmov; izolát z bacherového obsahu teľaťa; Lauková a kol., 1993). EF CCM4231 produkuje termostabilný bakteriocín – enterocín Ent4231 o veľkosti 3-10 kDa. Antimikrobiálny efekt kmeňa EF CCM4231 a jeho bakteriocínu Ent4231 bol sledovaný v *in vitro* podmienkach ako aj v rôznych ekosystémoch (Lauková a kol. 1999a, 1999b, 2001a, 2001b; Szabóová 2007), nie však v chove králika. V našej štúdií sme sa preto zamerali na porovnanie účinku kmeňa EF CCM4231 a jeho Ent4231 (po ich aplikácii v chove králikov) na redukciu nežiadúcej mikroflóry a výskyt oocýst eimérií, na vybrané zootechnické, biochemické a imunologické parametre a na kvalitatívne ukazovatele králičieho mäsa.

## MATERIÁL A METODIKA

Do *in vivo* experimentu (v spolupráci s Centrom výskumu živočíšnej výživy v Nitre, farma králikov pri Ústave pre chov malých hospodárskych zvierat) bolo zaradených 72 králikov vo

veku 5 týždňov, plemena HyPlus rozdelených do 2 experimentálnych (ES1; ES2) a 1 kontrolnej skupiny (KS), po 24 zvierat v každej skupine, pričom v jednej klietke boli ustajnené 2 zvieratá. Králikom v ES1 bol podávaný rifampicínom značený kmeň *Enterococcus faecium* CCM4231 (rif<sup>R</sup>;  $2.0 \times 10^{10}$  KTJ/ml, kvôli rozlíšeniu od ostatných enterokokov) v dávke 500  $\mu$ l/zviera/deň v pitnej vode počas 21 dní. Králikom v ES2 bol podávaný čiastočne purifikovaný Ent4231 v dávke 50  $\mu$ l/zviera/deň v pitnej vode počas 21 dní. Zvieratá v ES1, ES2 a KS boli kŕmené komerčne dostupnou granulovanou kŕmnom zmesou pre odchov králikov (ANPROFEED, VKZ Bučany, Slovenská republika) a mali prístup k vode *ad libitum*. Experiment sa uskutočnil na jar a trval 42 dní. Zootechnické parametre (konverzia krmiva, priemerné denné prírastky, mortalita) a zdravotný stav boli sledované denne. Vzorky trusu boli odoberané v nultý, respektíve 1. deň (začiatok experimentu), na 7. deň (týždeň podávania), 21. deň (3 týždne podávania) a 42. deň (koniec experimentu, t.j. 3 týždne od ukončenia podávania). Vzorky obsahu slepého čreva boli odoberané po odporazení 3 zvierat z každej skupiny (ES1, ES2, KS) na 21. a 42. deň experimentu v súlade s platnými veterinárnymi predpismi. Vzorky na mikrobiologické vyšetrenie z trusu a céka boli spracované štandardnou mikrobiologickou metódou a vysievané na príslušné selektívne médiá podľa ISO noriem: M-Enterococcus agar pre enterokoky, Baird-Parker agar so suplementom (SR0054C, Oxoid) pre koaguláza-pozitívne stafylokoky (CPS), Mannitol salt agar pre koaguláza-negatívne stafylokoky (CNS), Cetrimide agar pre pseudomonády, McConkey agar pre *E.coli* (Becton & Dickinson, Cockeysville, USA) a *Clostridium difficile* agar so suplementom (SR0096E) a s obsahom 7% (v/v) defibrinovanej konskej krvi (SR0050, Oxoid) pre *Clostridium-like* sp. pri teplote a dobe kultivácie typickej pre daný bakteriálny druh. Bakteriálne počty boli vyjadrené ako log<sub>10</sub> kolóniu tvorných jednotiek na gram (KTJ/g). Vzorky krvi z *vena auricularis* boli odoberané v 0-1., 21. a 42. deň. Biochemické parametre boli stanovené použitím komerčných kitov Randox (Česká republika), sledované boli celkové bielkoviny a lipidy (g/l), cholesterol, glukóza a vápnik (mmol/l), alanín-aminotransferáza ( $\mu$ kat/l), glutathionperoxidáza (U/ml). Z imunologických parametrov bola sledovaná fagocytárna aktivita (FA, %) modifikovanou metódou podľa Hrubíška (1981). Oocysty kokcií *Eimeria* sp. boli počítané vo vzorkách trusu, odoberaných na 0-1., 7., 21. a 42. deň experimentu pomocou flotačnej techniky (McMaster, 1986). Oocysty boli odčítavané mikroskopicky a intenzita infekcie bola vyjadrená v počte oocýst na 1 gram trusu (OPG/g). V mäse králikov (*Musculus longissimus dorsi*) bolo sledované chemické zloženie a kvalita mäsa 48 hodín *post mortem* – obsah celkovej vody, celkové bielkoviny a tuk (g/100g), pH48. Výsledky boli štatisticky vyhodnotené pomocou testu one-way Anova (Tukey test).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kmeň EF CCM4231 v truse králikov skupiny ES1 dosahoval na 7. deň podávania počty  $1,8 \pm 0,69 \log_{10}$ KTJ/g, v céku na 7. deň prítomnosť kmeňa EF CCM4231 nebola detegovaná. Kmeň EF CCM4231 je ruminálny izolát a v porovnaní s probiotickým kmeňom EF CCM7420, ktorý je izolátom z králika, kolonizoval tráviaci trakt v nižšom počte (Pogány-Simonová et al., 2008). Avšak, počas aplikácie kmeňa EF CCM4231 sme zaznamenali v truse králikov ES1 signifikantne nižšie počty CPS ( $P < 0,001$ ), CNS ( $P < 0,01$ ) na 7. deň oproti KS, taktiež na 21. deň podávania kmeňa sme zaznamenali redukciu CPS (o  $1,2 \log_{10}$ KTJ/g) v porovnaní s KS a signifikantná redukcia CNS ( $P < 0,01$ ) bola pozorovaná i na 42. deň oproti KS. Vo faeces oboch experimentálnych skupín králikov (ES1, ES2) bola na 21. deň zaznamenaná redukcia *Clostridium-like* sp. ( $1,1 \log_{10}$ KTJ/g v ES1;  $1,5 \log_{10}$ KTJ/g v ES2) ako aj na 42. deň v ES2 ( $1,0 \log_{10}$ KTJ/g) oproti KS. Signifikantne vyššie hodnoty fagocytárnej aktivity (FA) boli namerané v ES1 (EF CCM4231;  $P < 0,001$ ; FA  $38,00\% \pm 0,32$ ) na 21. deň experimentu v porovnaní s KS ( $22,50\% \pm 0,85$ ). V oboch experimentálnych skupinách (ES1; ES2) bol zaznamenaný imunostimulačný efekt ( $P < 0,001$ ; Tab. 1). Lauková a kol. (2008) uvádza signifikantný rozdiel v hodnote fagocytárnej aktivity ( $P < 0,001$ ) v pokusnej skupine králikov s podávaním

probiotického a enterocín M produkujúceho kmeňa *Enterococcus faecium* AL41 v porovnaní s kontrolnou skupinou. Najvyššia redukcia oocýst *Eimeria* sp. bola v ES1 na 21. deň experimentu (120 OPG/g) v porovnaní s KS (1184 OPG/g). V skupine zvierat prijímajúcich Ent4231 (ES2) bola redukcia v počte oocýst sledovaná na 42. deň (2250 OPG/g) oproti KS (5640 OPG/g). Biochemické ako aj zootechnické parametre neboli vplyvom podávaného probiotického kmeňa EF CCM4231 a jeho bakteriocínu Ent4231 ovplyvnené. Kvalita a zloženie králičieho mäsa sú závislé najmä na zložení kŕmnej dávky. Králičie mäso je z hľadiska obsahu a zloženia živín možné zaradiť do diéty pacientov s ochoreniami kardiovaskulárneho systému (Hu a Willet, 2002). Pri sledovaní fyzikálno-chemických ukazovateľov kvality mäsa 48 hodín *post mortem* vo vzorkách *M. longissimus dorsi* sme zistili len nevýrazné zmeny medzi obidvoma experimentálnymi skupinami. Obsah celkovej vody variroval vo všetkých skupinách v intervale 75,50±0,40 – 75,83±0,25 g/100g; celkových bielkovín 21,96±0,35 – 22,53±0,15 g/100g, pH48 5,83±0,07-5,99±0,06. Výnimku tvoril obsah celkového tuku v ES1 (0,83±0,05 g/100g) a ES2 (1,16±0,25 g/100g) oproti KS (1,26±0,37 g/100g), ktorý bol v obidvoch experimentálnych skupinách nižší. Podobný účinok bakterioconogénneho kmeňa EF CCM7420 s probiotickým účinkom publikovala Simonová a kol.(2008). Prídavok probiotík zvyšuje fermentačnú aktivitu v slepom čreve králikov, následkom čoho môže dochádzať ku kvalitatívnym zmenám v mäse králikov (Simonová, 2006). Napriek ruminálnemu pôvodu, kmeň EF CCM4231 a jeho bakteriocín Ent4231 sa prejavili ako sľubné aditíva v chove brojlerových králikov.

#### POĎAKOVANIE

Práca vznikla za finančnej podpory vedeckej agentúry VEGA (projekt 2/0008/08).

Tab. 1 Fagocytárna aktivita počas celého experimentu (vyjadrená v %)

	Fagocytárna aktivita (%)		
	začiatok experimentu	21.deň experimentu	42.deň experimentu
ES1 - EF CCM4231	21,60 ± 4,22	38,00 ± 0,32 <sup>a</sup>	39,50 ± 0,65 <sup>a</sup>
ES2 - PPB CCM4231	21,60 ± 4,22	18,67 ± 0,42	25,20 ± 0,80 <sup>a</sup>
KS	21,60 ± 4,22	22,50 ± 0,85 <sup>b</sup>	20,40 ± 0,51 <sup>b</sup>

Fagocytárna aktivita vyjadrená v % ako priemer ± smerodajná odchýlka (n=5); <sup>a,b</sup>P<0.001; 21. deň - 3 týždne po podávaní, 42. deň – koniec experimentu, 3 týždne po prerušení podávania; ES1- experimentálna skupina 1 s aplikáciou kmeňa EF CCM4231; ES2- experimentálna skupina 2 s aplikáciou enterocínu PPB CCM4231; KS- kontrolná skupina

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Combes S. Nutritional value of rabbit meat: A review. *Prod. Animal.*, 2004; 17:5:373-383.
- Hrubíško M. Test of phagocytosis of blood, (In Slovak). *Haematol. Transfusiol.*, Osveta, Martin, 1981; 19.
- Hu F.B, Willet W.C. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *J. Amer. Med. Assoc.* 2002; 288:2569-2578.
- Lauková A, Mareková M, Javorský P. Detection and antimicrobial spectrum of a bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* CCM4231. *Lett. Appl. Microbiol.* 1993; 16:257-260.
- Lauková A, Czikková S, Dobránsky T, Burdová O. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by enterocin CCM4231 in milk products. *Food Microbiol.* 1999a; 16:93-99.
- Lauková A, Czikková S, Laczková S, Turek P. Use of enterocin CCM4231 to control *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated dry fermented Hornád salami. *Int. J. Food Microbiol.* 1999b; 52:115-119.
- Lauková A, Vlaemynck G, Czikková S. Effect of enterocin CCM 4231 on *Listeria monocytogenes* in Saint-Paulin cheese. *Folia Microbiol.* 2001a; 46:157-160.
- Lauková A, Czikková S. Antagonistic effect of enterocin CCM 4231 from *Enterococcus faecium* on bryndza, a traditional Slovak dairy product from sheep milk. *Microbiol. Res.* 2001b; 156:31-34.

- Lauková A, Chrastinová L, Strompfová V, Pogány Simonová M, Michlovičová G, Plachá I, Čobanová K, Jurčík R, Ondruška L, Parkányi V. New enterocin M producing and probiotic strain *Enterococcus faecium* AL41 and its testing in the rabbit ecosystem. In: Proceedings of the XXIV Conference New ways in rabbit breeding, Nitra, Slovakia (in Slovak), 2008; 44-50.
- McMaster. Manual of Veterinary Parasitological Techniques, Reference Book. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Her Majesty's Stationary Office, London.1986.
- Simonová M. Probiotické a bakteriocín-produkujúce baktérie a ich vplyv na fyziológiu trávenia u králikov. Doktorandská dizertačná práca. ÚFHZ SAV Košice, 2006; 5-6, 90-91, 116.
- Pogány-Simonová M, Lauková A, Chrastinová L, Strompfová V, Čobanová K, Plachá I, Michlovičová G, Vasilková Z. Vplyv aplikačnej formy na efektívnosť bakteriocinogénneho a probiotického kmeňa *Enterococcus faecium* CCM7420. In: Proceedings of the XXIV Conference New ways in rabbit breeding, Nitra, Slovakia (in Slovak), 2008; 33-43.
- Szabóová R. Naturálne substancie a chov králikov. Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu. II. ročník, Košice, 2007; 104-107.

# MODIFIKÁCIE OPTICKÝCH VLASTNOSTÍ NANOČASTÍC OXIDU ZINOČNATÉHO

Šimšíková M.<sup>1</sup>, Antalík M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biochémie, Univerzita P. J. Šafárika, Košice

<sup>2</sup>Ústav experimentálnej fyziky, SAV, Košice

## ABSTRAKT

Polovodičové nanoštruktúry reprezentujú novú triedu materiálov so zaujímavými vlastnosťami a z toho vyplývajúcim širokým spektrom aplikácií. Možnosť kontroly veľkosti, tvaru ako i zloženia týchto nanoštruktúr vedie ku kontrole ich fyzikálno-chemických vlastností a celkovému správaniu. Povrchová modifikácia teda môže napomôcť k lepšej interakcii nanoštruktúr s biologickými systémami, či viesť k takým zaujímavým vlastnostiam, akými sú rozpustnosť, biokompatibilita, či bio-rozpoznávanie. Taktiež metóda dopingu je zaujímavá z hľadiska zmeny optických, magnetických a elektrických vlastností nanoštruktúr.

V prezentovanej práci sa zaoberáme syntézou nanočastíc oxidu zinočnatého (nano-ZnO) sol-gel metódou a štúdiom vplyvu povrchovej modifikácie a dopingu na ich optické vlastnosti.

Pomocou UV-VIS spektrofotometrie a fluorescenčnej spektroskopie sme demonštrovali zmenu optických vlastností, ktorá sa prejavila zmenou intenzity ako i posunom signálov k vyšším vlnovým dĺžkam.

## ÚVOD

Nanočastice sú veľmi malé objekty v rozmedzí približne 1-100 nm, o ktoré neustále narastá záujem pre ich zaujímavé vlastnosti a možnosti aplikácií v praxi. Niektoré nanoštruktúry však vykazujú značnú eko- a cyto- toxicitu, ako napr. nanočastice medi (Meng H., 2007), polovodičové kvantové body CdSe (Guo G., 2007) alebo fullerén C<sub>60</sub> (Sayes Ch.M., 2005). Pre danú skutočnosť sa do pozornosti dostávajú najmä nanočastice, ktoré sa vyznačujú nízkou, či dokonca žiadnou toxicitou a vysokou biokompatibilitou, čím sa stávajú atraktívnymi v bioaplikáciách. Medzi takéto nanomateriály sa zaraďuje i nano-ZnO, ktorý má pre svoju biokompatibilitu (zinok je dôležitým stopovým prvkom a zohráva dôležitú úlohu v mnohých biologických systémoch) ako i ďalším unikátnym vlastnostiam, veľký potenciál pri aplikáciách v biosystémoch - napr. pri biozobrazovaní, biooznačovaní, či ako transportný systém, čo môže byť využité v genetike, patológii, kriminológii, bezpečnosti potravín a mnohých ďalších priemyselných odvetviach (Xia Y.N., 2003; Comini E., 2006; Misra R.D.K., 2008; Zang J., 2007).

Pre bioaplikácie je nevyhnutnou podmienkou funkcionalizácia povrchu nanomateriálov, ktorý určuje ich interakciu s okolím. Tieto interakcie ovplyvňujú najmä stabilitu častíc, t.j. úspešnosť pri predchádzaní vzniku agregácií a aglomerácií. Rovnako môžu poskytovať kontrolovaný rast nanočastíc, alebo ich vylepšiť dôležitými rozpoznávacími, transportnými, či katalytickými vlastnosťami, hydrofilnosťou alebo hydrofóbnosťou (Niemeyer C.M., 2001). Ďalšou významnou metódou umožňujúcou vylepšenie elektrických, optických a magneických vlastností, ktoré úzko súvisia s aplikáciami nanočastíc je metóda dopingu, t.j. cielené zavedenie vhodného prvku do nanomateriálu (Gao L., 2009).

Napriek rozsiahlym možnostiam využitia nano-ZnO v oblasti bioaplikácií, jeho výskum značne zaostáva za ostatnými existujúcimi nanočasticami. Je to spôsobené pomerne málo preskúmanými možnostami syntézy, rovnako i nedostatočne pochopenými mechanizmami povrchovej modifikácie a cieleného zabudovania modifikátora do štruktúry ZnO.

## MATERIÁL A METODIKA

### *Chemikálie*

Chlorid zinočnatý, ZnCl<sub>2</sub>; hydroxid sodný, NaOH; manganistan draselný, KMnO<sub>4</sub>; 11-merkpto-undekánová kyselina, MUA

V danej práci sme sa zaoberali štúdiom vplyvu povrchovej modifikácie a metódy dopingu na optické vlastnosti nanočastíc oxidu zinočnatého. Ako stabilizačný činiteľ pri povrchovej modifikácii nanočastíc ZnO sme použili 11-merkpto-undekánovú kyselinu (MUA) a pri metóde dopingu ako modifikátor, ktorý je potrebné zabudovať do štruktúry nanočastíc KMnO<sub>4</sub>.

### *Syntéza nano-ZnO*

Prostredníctvom metódy sol-gel sme pripravili nanočastice oxidu zinočnatého, pričom priebeh chemickej reakcie popisuje rovnica:  $2\text{NaOH} + \text{ZnCl}_2 \rightarrow 2\text{NaCl} + \text{ZnO} + \text{H}_2\text{O}$ .

### *Syntéza Mn-dopovaných nanočastíc ZnO*

Mn-dopované nano-ZnO boli pripravené rozpustením NaOH v destilovanej vode (0.13 M, 75 ml), ku ktorému bol následne pridaný roztok ZnCl<sub>2</sub> (0.4 M, 5 ml). K dopovaniu ZnO nanočastíc bol manganistan draselný KMnO<sub>4</sub> rozpustený v destilovanej vode (6 mM, 30 mM, 60 mM; 15 ml) a pridaný do roztoku chloridu zinočnatého. Po troch hodinách konštantného miešania bol získaný svetlo ružový / ružový / fialový roztok. Precipitát bol premytý destilovanou vodou a následne ponechaný k voľnému vysušeniu pri izbovej teplote k získaniu Mn-ZnO nanočastíc.

### *Syntéza povrchovo modifikovaných nano-ZnO*

Rovnakou chemickou cestou, aká bola použitá pri syntéze Mn-dopovaných nanočastíc ZnO, sme pripravili povrchovo modifikované nano-ZnO, kde ako stabilizačný činiteľ bola použitá 11-merkpto-undekánová kyselina v troch rôznych koncentráciách (5, 10 a 100 mM). Potiahnutie nanočastíc MUA by malo prispieť k ich rozpustnosti v rôznych organických rozpúšťadlách a kovalentnému viazanu prostredníctvom hydroxylových skupín prítomných v štruktúre.

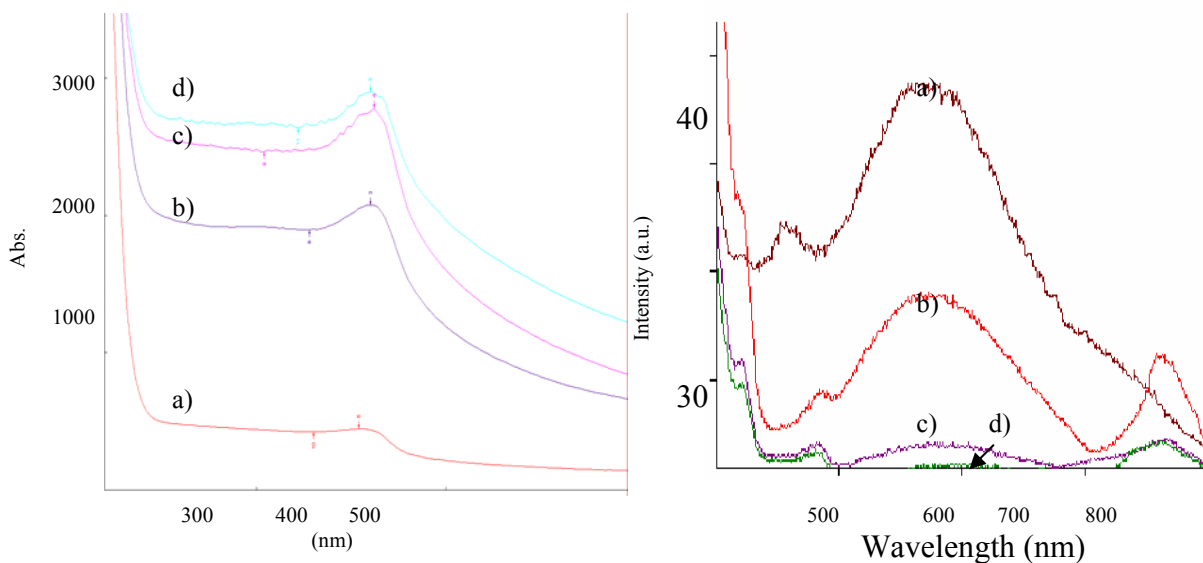
## VÝSELDKY A DISKUSIA

Optické vlastnosti pripravených nanočastíc boli charakterizované metódami UV/VIS spektrofotometrie v rozsahu od 200 – 2500 nm pomocou Shimadzu UV-3600 UV-vis-NIR spektrofotometra a fluorescenčnej spektrometrie pri izbovej teplote použitím VARIAN Cary Eclipse Spektrofluorimetra a BioTek Synergy Mx Monochromátora pri excitácii 350 nm a excitačnej i emisnej štrubine 10nm.

UV i emisné spektrá nanočastíc ZnO korešpondovali s literatúrou (UV 375 nm, PL 580 nm), kým spektrum modifikovaných nanočastíc sa zmenilo.

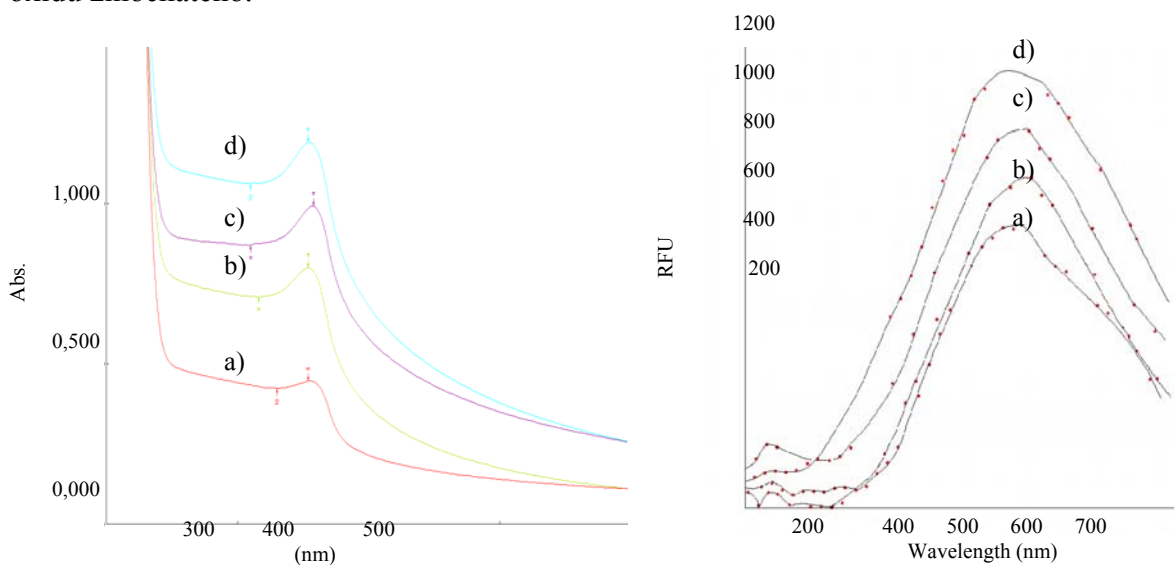
Ako vidieť na obr. 1 b) – d), Mn-dopované nanočastice vykazujú nárast intenzity absorpčných signálov úmerne s rastúcou koncentráciou modifikátora. Na obr. 2 a)-d) sú porovnané emisné spektrá daných vzoriek. Nedopované ZnO (2-a)) emitujú v zelenej oblasti spektra (580 nm) s vysokou intenzitou, kým u Mn-dopovaných vzorkách s rastúcou koncentráciou Mn dochádza k poklesu intenzity, z čoho vyplýva, že mangán ako dopant pre ZnO má zhášací efekt.





**Obr. 1., 2.** Absorpčné a emisné spektrá nedopovaných a dopovaných ZnO nanočastíc  
a) nedopované ZnO, b) ZnO dopované 6 mM  $\text{KMnO}_4$ , c) 30 mM  $\text{KMnO}_4$ , d) 60 mM  $\text{KMnO}_4$ .

Na obr.3 a 4 sú porovnané absorpčné a emisné spektrá nano-ZnO s povrchovo modifikovanými nanočasticami, kde opäť pozorujeme nárast intenzity s rastúcou koncentráciou modifikátora, čo naznačuje pozitívny vplyv MUA ako stabilizátora nanočastíc oxidu zinočnatého.



**Obr. 3., 4.** Absorpčné a emisné spektrá nano-ZnO a MUA- ZnO nanočastíc  
a) nemodifikované ZnO, b) MUA-ZnO nanočastice modifikované 5 mM MUA, c) 10 mM MUA, d) 100 mM MUA

## POĎAKOVANIE

Táto práca bola finančne podporovaná výskumnými grantami VEGA 0038, 7055, 0056; VVGS PF 12/2010/CH; Centra excelentnosti Nanofluid a ŠF EU 26220120021, 26220120033, 26220220005, 26220220061, 26220120001 a 26220120043.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Comini E.: Metal oxide nano-crystals for gas sensing. *Analytica Chimica Acta* 2006; 568:28–40
- Gao L., Zhang J.M. Effects of doping concentration on properties of Mn-doped ZnO thin films. *Chinese Physics B* 2009; 18: 4536–4540
- Guo G., Liu W., Liang J., He Z., Xu H., Yang X. Probing the cytotoxicity of CdSe quantum dots with surface modification. *Materials Letters* 2007; 61:1641-1644
- Meng. H., Chen Z., Xing G., Yuan H., Chen Ch., Zhao F., Zhang Ch., Wang Y., Zhao Y. Ultrahigh reactivity and grave nanotoxicity of copper nanoparticles. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 2007; 272:595-598
- Misra R.D.K. Quantum dots for tumor-targeted drug delivery and cell imaging. *Nanomedicine* 2008; 3:271-274
- Niemeyer C.M.: Nanoparticles, Proteins, and Nucleic Acids, *Biotechnology Meets Materials Science*, *Angew. Chem. Int.* 2001; 40: 4128-4158
- Sayes Ch.M., Gobin A.M., Ausman K.D., Mendez J., West J.L., Colvin W.L. Nano-C<sub>60</sub> cytotoxicity is due to lipid peroxidation. *Biomaterials* 2005; 26:7587-7595
- Xia Y.N., Yang P.D., Sun Y.G., Wu Y.Y., Mayers B., Gates B., Yin Y.D., Kim F., Yan H.Q. One-dimensional nanostructures: synthesis, characterization and applications. *Adv. Mater.* 2003; 15:353
- Zang J., Li Ch.M., Cui X., Wang J., Sun X., Dong H., Sun Ch.Q. Tailoring Zinc Oxide Nanowires for high Performance Amperometric Glucose Sensor. *Electroanalysis* 2007; 19:1008-1014

## REDUKOVANIE AMYLOIDNEJ AGREGÁCIE INZULÍNU ÚČINKOM FYTOALEXÍNOV

Šipošová K.<sup>1,2</sup>, Antošová, A.<sup>2</sup>, Kutschy P.<sup>3</sup>, Daxnerová Z.<sup>4</sup>, Gažová Z.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra biochémie, UPJŠ, Košice

<sup>2</sup>Ústav experimentálnej fyziky, SAV, Košice

<sup>3</sup>Katedra organickej chémie, UPJŠ, Košice

<sup>4</sup>Katedra bunkovej biológie, UPJŠ, Košice

### ABSTRAKT

Proteínové amyloidné agregáty sú spojené s mnohými závažnými chorobami. Inzulínové amyloidné depozity sú pozorované u pacientov, ktorým je inzulín podávaný formou injekcií pri liečbe diabetu. Študovali sme účinok fytoalexínových derivátov na amyloidnú agregáciu inzulínu. Zistili sme, že deriváty benzokamalexín a cyklobrasínin pri nízkych mikromolárnych koncentráciách účinne inhibujú vznik inzulínových amyloidných agregátov. Okrem toho sú schopné depolymerizovať inzulínové amyloidné fibrily. Naše zistenia poukazujú na možné terapeutické využitie účinných fytoalexínových derivátov na redukciu amyloidnej agregácie inzulínu.

### ÚVOD

Neschopnosť správneho zbalenia alebo udržania zbaleného stavu proteínov v bunke je spojená s veľkým počtom funkčných porúch, ktoré môžu viesť k závažným chorobám (Dobson a kol., 2001). Vznik nenatívnych konformačných stavov proteínov zohráva významnú úlohu pri tvorbe amyloidných agregátov, ktoré sú detegované u viac ako 20 ochorení, ako napr. Alzheimerova, Parkinsonova, Creutzfeld-Jakobova choroba, ale aj diabetes mellitus typu II a rôzne iné systémové amyloidózy. Amyloidné depozity pozostávajú prevažne z jedného typu proteínu a sú lokalizované v rôznych častiach tela v závislosti od druhu ochorenia. Súčasné poznatky poukazujú na to, že schopnosť tvoriť amyloidné agregáty je generickou vlastnosťou polypeptidového reťazca, čo umožňuje študovať tvorbu amyloidných agregátov aj mimo živých organizmov.

Amyloidné depozity spojené s injekčnou aplikáciou inzulínu obsahujú neporušené inzulínové molekuly vrátane disulfidických mostíkov v mieste aplikácie liečiva. Poznatky Yumlu a kol. (2009) poukazujú na to, že amyloidné depozity môže vytvárať ako injekčne podávaný rekombinantný ľudský inzulín, tak aj inzulínové analógy. Jednou z možností ako vysvetliť tvorbu agregátov je nedostatočná resorpcia inzulínu v mieste vpichu. Následkom toho dochádza k lokálnemu zvýšeniu koncentrácie proteínu, ktorá zvyšuje pravdepodobnosť fibrilizácie. Druhá možnosť je spojená so vznikom amyloidných agregátov už počas výroby alebo uskladnenia tohto liečiva.

Poznatky získané v poslednom období svedčia o tom, že prítomnosť amyloidných agregátov v rôznych častiach tela má toxické účinky na bunky a môžu viesť až k smrti bunky (Khlistunova a kol., 2006, Baglioni a kol., 2009, Walsh a kol., 2004). Presný mechanizmus toxicity nie je známy. Existujú však dôkazy, že prevencia tvorby alebo redukcia amyloidných agregátov je pre bunky prospešná (Khlistunova a kol., 2006, Pickhardt a kol., 2007). V súčasnosti nie je možné amyloidné ochorenia efektívne liečiť, preto cielená identifikácia látok redukujúcich množstvo amyloidných agregátov je veľmi dôležitá. Morshedi a kol., (2007) zistili, že niektoré indolové deriváty inhibujú amyloidnú agregáciu lysozýmu. Medzi indolové deriváty patria aj fytoalexíny. Sú to malé, antimikrobiálne sekundárne metabolity produkované *de novo* po expozícii biologickému alebo fyzikálnemu stresu rastlinami z čeľade krížokveté (*Cruciferae*) (Purkayastha a kol., 1995). Cieľom našej práce bolo preskúmať vplyv niektorých fytoalexínových derivátov na amyloidnú agregáciu inzulínu *in vitro*.

## MATERIÁL A METODIKA

### *Chemikálie*

Ľudský rekombinantný inzulín (I2643-50MG, Sigma Aldrich), tioflavín T (ThT), 8-anilino-naftalén-1-sulfonová kyselina (ANS), konžská červená (CR) boli zakúpené od firmy Sigma, chlorid sodný od firmy LaChem. Fytoalexínové deriváty boli syntetizované na Katedre organickej chémie PF UPJŠ.

### *Amyloidná agregácia inzulínu*

Amyloidné fibrily boli pripravené 2 h inkubáciou 10  $\mu\text{M}$  inzulínu v 100 mM NaCl, pH 1.6 intenzívnym miešaním (1200rpm) pri teplote 65°C (Sorci a kol., 2009). Vytvorenie amyloidných fibril bolo overené viacerými metodikami (meranie fluorescence po naviazaní ThT alebo ANS, viazaním Konžskej červenej a elektrónovou mikroskopiou).

### *Viazanie ThT, ANS*

K jednotlivým vzorkám bol pridaný ThT alebo ANS vo výslednej koncentrácii 20  $\mu\text{M}$ . Viazanie ThT alebo ANS do amyloidných fibril je sprevádzané nárastom intenzity fluorescence v emisnom spektre. ThT bol excitovaný pri 440 nm a emisia bola meraná pri 485 nm. ANS bol excitovaný pri 380 nm a emisia bola meraná pri 485 nm. Merania boli uskutočnené na spektrofluorimetri RF-5000 v semi-mikro quarzovej kyvete. Šírka excitačnej štrbiny bola 1.5 nm a emisnej 3 nm.

### *Viazanie konžskej červenej*

CR bolo pridané k jednotlivým vzorkám v pomere 2:1 (proteín:CR). V prítomnosti fibril dochádza k charakteristickému červenému posunu absorpčného maxima CR z 498 nm do oblasti okolo 510 nm a vznikom charakteristického absorpčného pleca pri 540 nm (Klunk a kol., 1989).

### *Transmisná elektrónová mikroskopia*

Vzorka obsahujúca inzulín alebo inzulínové fibrily s koncentráciou 10  $\mu\text{M}$  pred a po inkubácii s fytoalexínmi (200  $\mu\text{M}$ ) bola nanesená na medenú mriežku potiahnutú formwarom. Po adsorpcii vzorky bola mriežka opláchnutá destilovanou vodou. Následne bola zafarbená 2% roztokom uranyl acetátu a voľne usušená na vzduchu. Vzorky boli potom sledované elektrónovým mikroskopom Tesla BS 500 pri 60 kV.

### *Sledovanie inhibičnej aktivity fytoalexínov na amyloidnú agregáciu inzulínu*

K roztoku inzulínu (10  $\mu\text{M}$ ) bol pridaný fytoalexínový derivát vo výslednej koncentrácii 200  $\mu\text{M}$ . Vzorka boli inkubovaná za rovnakých podmienok aké boli použité na prípravu inzulínových amyloidných agregátov. Množstvo vytvorených amyloidných agregátov bolo sledované pomocou viazania ThT alebo ANS meraním intenzity fluorescence, ktorá bola normalizovaná k hodnote fluorescence detegovanej pre inzulínové amyloidné agregáty v neprítomnosti fytoalexínov (kontrolná vzorka 100%).

### *Sledovanie depolymerizačnej aktivity fytoalexínov na amyloidné agregáty inzulínu*

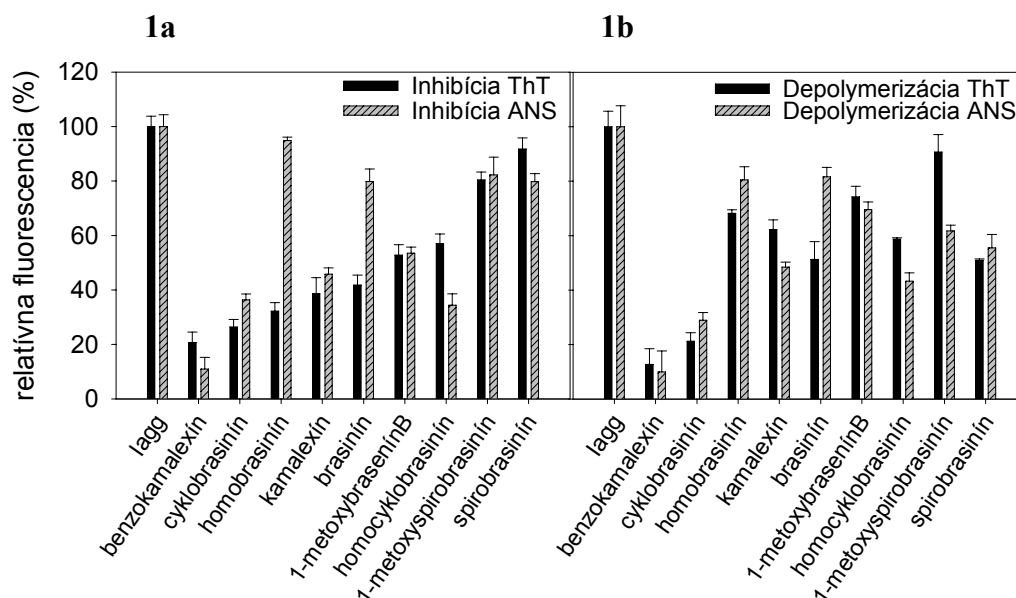
Inzulínové amyloidné fibrily (10  $\mu\text{M}$ ) boli inkubované 24 h s derivátom fytoalexínu (200  $\mu\text{M}$ ) pri teplote 37°C. Depolymerizačná aktivita bola sledovaná pomocou viazania ThT a ANS a normalizovaná k intenzite fluorescence fibril bez prítomnosti fytoalexínového derivátu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Amyloidné agregáty zohrávajú významnú úlohu v patogenéze rozličných ochorení. Porozumenie mechanizmov vedúcich k tvorbe agregátov a nájdenie účinných inhibítorov má veľký klinický význam v prevencii a liečbe týchto, zatiaľ nevyliciteľných chorôb. Jednou z terapeutických možností je inhibovanie tvorby amyloidných agregátov, ako aj ich deštrukcia účinkom rôznych nízkomolekulových látok. Ide o atraktívny terapeutický prístup, pretože inhibítory sú účinné vo fáze vzniku amyloidných štruktúr, ktorá nie je spojená s biologickou funkciou proteínu.

Fytoalexínové deriváty sa vyznačujú prítomnosťou indolového kruhu a postranného reťazca alebo heterocyklu, ktorý obsahuje atóm dusíka alebo dva atómy síry. Táto štruktúrna rozmanitosť môže podstatne ovplyvňovať ich anti-amyloidnú aktivitu.

Sledovali sme vplyv fytoalexínov na tvorbu inzulínových agregátov a ich schopnosť deštruovať inzulínové amyloidné fibrily pomocou viazania ThT a ANS (Obr. 1a, 1b). Inhibičná a depolymerizačná aktivita bola kvantifikovaná percentuálne k intenzite fluorescencie inzulínových fibríl bez prítomnosti derivátov (kontrolná vzorka 100%).

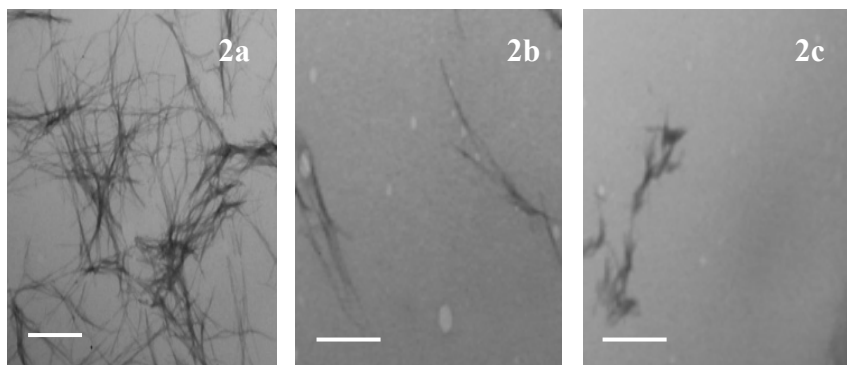


**Obr. 1. Inhibičný a depolymerizačný účinok fytoalexínov na amyloidnú agregáciu inzulínu. 1a** Inhibícia inzulínovej agregácie **1b** Depolymerizácia inzulínových agregátov Vplyv fytoalexínov na amyloidnú agregáciu inzulínu bol sledovaný viazaním ThT a ANS. Fluorescenčná intenzita ThT a ANS bola normalizovaná k fluorescenčnému signálu inzulínových agregátov bez prítomnosti fytoalexínu (100%).

Zistili sme, že inhibičná aktivita fytoalexínových derivátov je rôzna. Na základe výsledkov viazania ThT, najväčšia schopnosť inhibovať tvorbu amyloidných inzulínových fibríl bola pozorovaná pre benzokamalexín (80% inhibícia) a cyklobrasinín (75%). Naopak, najmenšia inhibičná aktivita bola zistená pre deriváty spirobrasinín (9%) a (+)-1-metoxyspirobrasinín (20%) (Obr. 1a). Inhibičný účinok študovaných fytoalexínov bol monitorovaný pomocou viazania ANS bol porovnateľný s údajmi detegovaným pomocou viazania ThT (Obr. 1). Podobné výsledky boli získané pre depolymerizačnú aktivitu fytoalexínov. Najvyššia redukcia inzulínových agregátov bola pozorovaná v prítomnosti benzokamalexínu (87% zníženie) a cyklobrasinínu (80%). Minimálna depolymerizačná aktivita bola zistená pre (+)-1-metoxyspirobrasinín (10%) a 1-metoxybraseníB (30%). Pre vysoko aktívne deriváty fytoalexínov (benzokamalexín a cyklobrasinín) sme sledovali inhibičný a depolymerizačný účinok v závislosti od koncentrácie fytoalexínových derivátov. Z koncentračných závislostí sme určili  $IC_{50}$  a  $DC_{50}$ , ktoré predstavujú koncentráciu fytoalexínu, ktorá je potrebná na 50% redukciu amyloidných agregátov pri inhibičných a depolymerizačných experimentoch. Zistili sme, že pre benzokamalexín a cyklobrasinín sa tieto hodnoty nachádzajú v rozsahu mikromolárnych koncentrácií.

Anti-amyloidná aktivita cyklobrasinínu bola potvrdená aj pomocou transmisnej elektrónovej mikroskopie. Na obr. 2a sú inzulínové agregáty s charakteristickou morfológiou amyloidných fibríl. Inkubácia inzulínových fibríl s cyklobrasinínom (200  $\mu$ M) nemala výrazný vplyv na

morfológiu fibríl, avšak viedla ku výraznej redukcii množstva amyloidných vlákien (obr.2 b). Podobne, prítomnosť cyklobrasinínu mala inhibičný účinok na tvorbu amyloidných inzulínových fibríl. Pozorovali sme ako menší počet amyloidných štruktúr, ktorých dĺžka bola podstatne kratšia (obr. 2c) v porovnaní s inzulínovými fibrilami vytvorenými v neprítomnosti tohto derivátu (obr. 2a).



**Obr. 2. TEM inzulínových fibríl.**

**2a** Inzulínové fibrily bez prítomnosti cyklobrasinínu.  
**2b** Depolymerizačný účinok cyklobrasinínu (200 $\mu$ M).  
**2c** Inhibičný účinok cyklobrasinínu (200 $\mu$ M).  
 Čiarka reprezentuje 500nm.

Na základe získaných experimentálnych údajov sme zistili, že niektoré fytoalexínové deriváty majú schopnosť ovplyvňovať amyloidnú agregáciu inzulínu. Rozsah účinku závisí od štruktúry jednotlivých fytoalexínových derivátov. Najvyššiu schopnosť inhibovať tvorbu amyloidných štruktúr a depolymerizovať vzniknuté inzulínové fibrily majú deriváty benzokamalexínu a cyklobrasinín. Naše výsledky poukazujú na možné terapeutické využitie benzokamalexínu a cyklobrasinínu v prevencii amyloidnej agregácie inzulínu.

#### POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená projektom VVGS PF 13/2010/Ch, VEGA 0079 a 0056, Centra excelentnosti Nanofluid a ŠF EU 26220220005, 26220120033, 26220120021.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Dobson, Ch., M. The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 2001; B356:133-145
- Khlistunova, I., Biernat, J., Wang, Y., Pickhardt, M., Bergen, M., Gazova, Z., Mandelkow, E., Mandelkow, E-M. Inducible Expression of Tau Repeat Domain in Cell Models of Tauopathy: Aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs. *J. Biol. Chem.* 2006;281:1205-1214
- Klunk W.E., Pettigrew J.W., Abraham D.J. Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. *J Histochem. Cytochem.* 1989; 37(8):1273-1281
- Morshedi, D., Rezaei-Ghaleh, N., Ebrahim-Habibi, A., Inhibition Ahmadian, S., Nemat-Gorgan, M., of amyloid fibrillation of lysozyme by indole derivatives - possible mechanism of action. *FEBS J.* 2007.274(24):6415-6425
- Pickhardt, M., Larbig, G., Khlistunova, I., Coksezen, A., Meyer, B., Mandelkow, E-M., Schmidt, B., Mandelkow, E. Phenylthiazolyl-hydrazide and its derivatives are potent inhibitors of tau aggregation and toxicity in vitro and in cells. *Biochemistry* 2007;46(35):10016-23.
- Purkayastha, R. P., Daniel, M., Progress in Phytoalexin Research during the Past 50 Years In *Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action*; Eds.; Marcel Dekker: New York, 1995; p. 1
- Sorci, M., Grassucci, R. A., Hahn, I., Frank, J., Belfort, G., Time-dependent insulin oligomer reaction pathway prior to fibril formation: Cooling and seeding. *Proteins.* 2009. 77:62-73
- Yumlu, S., Barany, R., Eriksson, M., Röcken, Ch. Localized insulin-derived amyloidosis in patients with diabetes mellitus: a case report. *Human pathology.* 2009. 40:1655-1660

## VPLYV ZINKU NA ZDRAVIE A PRODUKCIU BROJLEROVÝCH KURČIAT

Štofaničková J., Šály J., Sesztáková E.

*Klinika vtákov a exotických zvierat, UVLF, Košice*

### ABSTRAKT

Brojlery hybridu Ross 308 boli vo veku 2 dni rozdelené do 3. kontrolných skupín tvorených 59. kusmi zvierat a 3. pokusných skupín v počte 54 kusov. Kontrolné skupiny boli kŕmené komerčnou kompletnou kŕmnou zmesou HYD 01 do 14. dní veku, potom až do konca experimentu kŕmnou zmesou HYD 02 ad libitum. Brojlerom pokusných skupín bol do týchto kŕmnych zmesí pridávaný zinok vo forme oxidu zinočnatého v množstve 50 mg/kg ž.h. Cieľom pokusu bolo v týždenných intervaloch od 7. do 42. dňa veku sledovať vplyv prídavkov zinku na telesnú hmotnosť, prírastky hmotnosti, spotrebu kŕmnej zmesi, vybrané hematologické a biochemické parametre a ukazovatele mechanických vlastností kostí u brojlerových kurčiat. Prídavky zinku mali do 4. týždňa odchovu pozitívny vplyv na telesnú hmotnosť a hmotnostné prírastky brojlerových kurčiat. Hematologické a biochemické parametre boli signifikantne ovplyvnené len ojedinele v určitých fázach pokusu. Obsah zinku v krvi pokusných zvierat bol vo všetkých fázach experimentu vyšší ako u kontrolných so štatisticky významnými rozdielmi na 7. a 35. deň. Medza pružnosti, pevnosť v ohybe a lomové napätie boli prídavkami zinku ovplyvnené a potvrdil sa vplyv zinku na biomechanickú kompetenciu kostného tkaniva.

### ÚVOD

V literatúre bola zistená značná nejednotnosť pri uvádzaní optimálneho obsahu zinku v krmive pre hydinu. Jantošovič a kol. (1998) udávajú rozpätie 30-60 mg.kg<sup>-1</sup> kŕmnej zmesi, podľa Wanga a kol. (2002) je optimálna hladina diétného zinku 68 mg.kg<sup>-1</sup>, podľa Huanga a kol. (2007) až 84 mg.kg<sup>-1</sup>. Keďže štandardné krmivá nie vždy dostatočne kryjú potrebu zinku pre hydinu, zamerali sme sa na sledovanie možností zlepšenia niektorých produkčných ukazovateľov u brojlerov prídavkom zinku do krmiva. Bol sledovaný aj vplyv prídavkov zinku na vybrané hematologické a biochemické parametre, ako aj mechanické vlastnosti kostí, ktoré sú základnými parametrami odrážajúcimi štruktúru a funkciu kosti.

### MATERIÁL A METODIKA

Ako pokusné zvieratá boli použité brojlery hybridu Ross 308 od 2. do 42. dňa veku. Kurčatá boli vo veku 2 dni odvážené, rozdelené do šiestich skupín- 3. kontrolných a 3. pokusných, a umiestnené v experimentálnych priestoroch kliniky. Kontrolné skupiny tvorilo 59 kusov zvierat, pokusné 54 brojlerov. Kontrolné skupiny boli kŕmené komerčnou kompletnou kŕmnou zmesou HYD 01 do 14. dňa veku a potom až do konca experimentu kŕmnou zmesou HYD 02 ad libitum. V oboch bolo deklarované množstvo zinku 50 mg.kg<sup>-1</sup> kŕmnej zmesi. Brojlerom pokusných skupín bol do týchto kŕmnych zmesí pridaný zinok vo forme oxidu zinočnatého v množstve 50 mg/kg ž.h.m. Telesná hmotnosť u kurčiat bola sledovaná v týždňových intervaloch. V týždňových intervaloch bolo z kontrolných aj pokusných skupín náhodne vybraných po 10 kusov zvierat, ktoré boli klinicky vyšetrené, zaznamenali sa prírastky ich hmotnosti, spotreba kŕmnej zmesi a boli od nich odobrané vzorky krvi na hematologické a biochemické vyšetrenie. Následne po eutanázii dekapitáciou boli brojlery pitvou vyšetrené na zistenie prípadných zmien na vnútorných orgánoch. Pri pitve boli zároveň od brojlerov odobrané tibiotarzy na vyšetrenie ich mechanických vlastností. Ich testovanie bolo uskutočnené na statickom trhacom stroji FP100/1. Pri rýchlosti zaťažovania 2,5 mm.min<sup>-1</sup> bola použitá sila od 1 kN po 40 N a vzdialenosť podpier od 25 do 60 mm v závislosti od veľkosti kostí. Priehyb kostí bol snímaný a registrovaný na záznam s 10-násobným zväčšením. Medza pružnosti (Re), pevnosť v ohybe (Rm) a lomové napätie (Rl)

boli vyhodnotené zo zaťažujúceho diagramu. Výsledky boli spracované v štatistickom programe GraphPad Prism 5 a štatistická významnosť bola určená nepárovým t-testom.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V pokuse bol zaznamenaný pozitívny vplyv zinkových prídavkov na klinický stav zvierat. Patologické zmeny na vnútorných orgánoch zistené neboli. V prvých štyroch fázach experimentu bola u kurčiat pokusnej skupiny priemerná telesná hmotnosť signifikantne vyššia ako u zvierat v kontrolnej skupine (Tab. 1) a vyššie hmotnostné prírastky zvierat pokusnej skupiny v prvých dvoch týždňoch vykazovali takisto štatistickú významnosť. Yu a kol. (2005) pozorovali podobný vplyv zinkových prídavkov do krmiva brojlerov. Hudson a kol. (2004) udávajú, že spotreba a konverzia krmiva prídavkami organického zinku ovplyvnené nie sú, čo sa zhoduje s výsledkami v našom experimente. Nebol potvrdený ani výrazný vplyv prídavkov zinku na hematologické a biochemické parametre napriek tomu, že viacerí autori ich ovplyvnenie zinkom uvádzajú. Rozdiely medzi hodnotami erytrocytov, leukocytov, heterofilov, bazofilov, lymfocytov, monocytov ani hemoglobínu neboli štatisticky významné. Preukazné rozdiely boli iba v hodnotách hematokritu na 21. deň a v hodnotách eozinofilov na 7. deň pokusu. Z biochemických parametrov boli signifikantné rozdiely medzi kontrolnými a pokusnými skupinami sledované na 28. a 42. deň v obsahu vápnika, na 14. deň v obsahu horčíka, na 35. deň v aktivite ALP a vo veku 42. dní v aktivite AST. Hodnoty fosforu, ALT a celkových proteínov v krvnom sére nevykazovali žiadne štatisticky významné zmeny. Underwood a Suttle (1999) uvádzajú, že zmeny zinkových hladín v krvnom sére sa objavujú až po dlhodobejšej deficiencii alebo prebytku v krmnej dávke. V našom pokuse bol obsah zinku v krvi pokusných zvierat už od 7. dňa vyšší ako u kontrolných so štatisticky významnými rozdielmi na 7. a 35. deň (Tab.2) a vo všetkých fázach zvýšený aj nad referenčné maximum  $29,55 \mu\text{mol.l}^{-1}$ , ktoré pre kurčatá udávajú Yur a kol. (2002). Hodnoty medze pružnosti, pevnosti v ohybe a lomového napätia sa v prvých troch týždňoch pokusu pohybovali u oboch skupín na približne rovnakej úrovni. Od 28. dňa došlo u pokusnej skupiny u všetkých troch ukazovateľov k ich vzostupu oproti kontrole s maximálnymi hodnotami na 35. deň. Štatisticky významné rozdiely boli zaznamenané na 35. deň a 42. deň (Tab. 3).

Tab. 1 Porovnanie priemernej telesnej hmotnosti (g)

		7.deň	14.deň	21.deň	28.deň	35.deň	42.deň
K	x	104,8	202	484,4	880,6	1470	1970
	SD	0,0172	0,0388	0,0848	0,0813	0,1670	0,2194
	n	10	10	10	10	9	10
P	x	110,4	250,4*	604,2**	1025**	1511	2040
	SD	0,0103	0,0382	0,0669	0,0836	0,1915	0,2348
	n	10	10	10	10	4	10



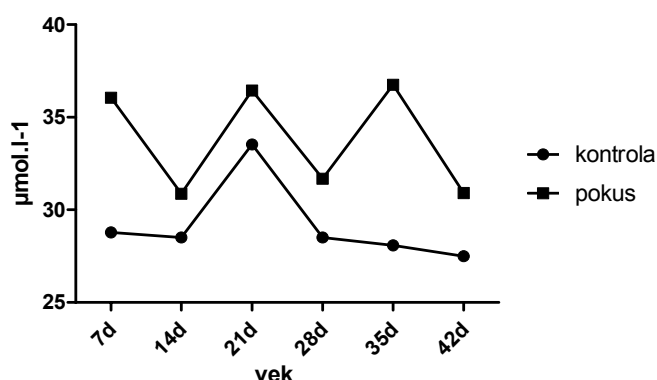
Tab. 2 Porovnanie priemerného obsahu zinku v krvnom sére brojlerov v jednotlivých etapách pokusu ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )

		7.deň	14.deň	21.deň	28.deň	35.deň	42.deň
K	Zn	28,78	28,50	33,53	28,50	28,08	27,49
	SD	3,775	6,815	7,040	6,239	4,645	3,517
	N	10	10	10	10	9	10
P	Zn	36,06 **	30,87	36,44	31,68	36,75 *	30,91
	SD	5,943	9,518	11,880	5,529	5,822	5,942
	n	10	10	10	10	4	10

Tab. 3 Porovnanie vybraných ukazovateľov mechanických vlastností kostí u brojlerov v jednotlivých etapách pokusu (Mpa)

		7.deň	14.deň	21.deň	28.deň	35.deň	42.deň
K	Re	61,00	61,68	58,60	84,14	94,27	86,46
	SD	10,04	10,17	11,12	9,996	18,71	29,28
	Rm	73,82	79,29	77,60	93,08	100,2	93,33
	SD	9,885	11,89	13,27	11,95	20,56	29,54
	R1	42,64	51,68	51,78	76,14	80,93	72,44
	SD	12,65	13,96	19,98	22,65	35,22	25,52
	n	10	10	10	10	9	10
P	Re	64,00	57,86	59,85	96,23	117,8**	98,65
	SD	7,983	8,121	15,80	36,89	19,66	27,20
	Rm	76,68	75,70	84,09	104,0	126,7*	106,2
	SD	9,094	10,29	18,41	37,89	32,56	26,39
	R1	42,88	46,15	61,46	79,89	114,1*	92,58*
	SD	10,23	16,32	24,33	43,10	19,92	28,57
	n	10	10	10	10	4	10

\* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  štatistická významnosť medzi pokusnými skupinami a kontrolou (t- test)



Graf 1 Hladiny sérového zinku u brojlerov v jednotlivých etapách pokusu ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )

Sledovaný bol vplyv prídavkov zinku do krmiva na hmotnostné prírastky, spotrebu krmiva, vybrané hematologické, biochemické parametre a mechanické vlastnosti kostí brojlerových kurčiat. Výsledky našich vyšetrení ukázali, že prídavky zinku do krmiva mali pozitívny vplyv

na klinický stav zvierat a do 4. týždňa odchovu aj pozitívny vplyv na telesnú hmotnosť a hmotnostné prírastky brojlerových kurčiat. Zníženie spotreby krmiva prídavkom zinku nebolo preukázané. Hematologické a biochemické parametre boli signifikantne ovplyvnené len v určitých fázach pokusu. Zinok v krvi pokusných skupín vykazoval počas celého experimentu vyššie hodnoty ako u kontrolných a bol zvýšený aj nad referenčné maximum. Medza pružnosti, pevnosť v ohybe a lomové napätie boli prídavkami zinku ovplyvnené, čo potvrdzuje vplyv zinku na biomechanickú kompetenciu kostného tkaniva.

#### POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená projektom VEGA 1/4389/07 a VEGA 1/0590/09.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Huang Y L, Lu L, Luo X G, Liu B. An optimal dietary zinc level of broiler chicks fed a corn-soybean meal diet. *Poult. Sci.* 2007; 12: 2582 – 2589.
- Hudson B P, Fairchild B D, Wilson J L. Breeder age and zinc source in broiler breeder hen diets on progeny characteristics at hatching. *J. Appl. Poult. Res.* 2004; 13: 55 – 64.
- Jantošovič J, Jurajda V, Kříž H, Kušev J, Magic D, Magic D Jr, Šály J, Škardová I. Choroby hydiny a exotických vtákov. M&M vydavateľstvo Prešov. 1998; 72 – 77.
- Underwood E J, Suttle N F. The mineral nutrition of livestock (3rd edition). CABI Publishing, Biddles Ltd., Guilford and King's Lynn, UK. 1999; 477 – 512.
- Wang X, Fosmire G J, Gay C V, Leach R M. Short-term zinc deficiency inhibits chondrocyte proliferation and induces cell apoptosis in the epiphyseal growth plate of young chickens. *J. Nutr.* 2002; 132: 665 – 673.
- Yu Z P, Le G W, Shi Y H. Effect of zinc sulphate and zinc methionine on growth, plasma growth hormone concentration, growth hormone receptor and insulin-like growth factor-I gene expression in mice. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2005; 32: 273 – 278.
- Yur F, Bildik A, Belge F, Kilicalp D. Serum, plazma and erythrocyte zinc levels in various animal species. *Vet. Fak. Derg.* 2002; 13 (1-2): 82-83.

# ANALÝZA A POROVNANIE GENÓMOV BAKTERIOFÁGA MSF1 A VYBRANÝCH ENTEROKOKOVÝCH PROFÁGOV

Šuľák M.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

## ABSTRAKT

Bakteriofág MSF1 je tretím bakteriofágom izolovaným z bakteriálneho druhu *Enterococcus faecalis*. Pre podrobnejšiu charakterizáciu genómu tohto bakteriofága sa pripravili génové banky MSF1 fágovej DNA v hostiteľskom organizme *Escherichia coli*. Fragmenty DNA (>600 kbp) sa klonovali v klonovacom vektore systéme pUC118/EcoRI a pUC118/HincII. Čiastočne sa sekvenovalo 10 častí fágovej DNA s celkovou veľkosťou 10664 bp a obsahom GC párov 37%. Z genómu tohto bakteriofága bol čiastočne charakterizovaný lytický modul a gén kódujúci metylázu. Všetky získané sekvencie vykazujú významnú podobnosť (viac ako 95%) s už známymi fágovými alebo profágovými sekvenciami. Následne sme porovnávali umiestnenie vybraných sekvencií z genómu MSF1 so sekvenciami z rôznych enterokokových fágov z databázy GenBank.

## ÚVOD

Bakteriofágy (prokaryotické vírusy) sú vírusy napádajúce baktérie. Ich výskyt je podmienený prítomnosťou baktérií a teda môžeme ich nájsť v každom prostredí. Najbohatším zdrojom je more, kde sa vyskytujú fágové častice v počtoch až  $10^4$  -  $10^7$  na ml (Wichels a kol., 1998). Najviac preskúmané sú fágy enterických baktérií *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium*. Vysoká koncentrácia bakteriofágov sa pozorovala aj v bachore prežúvavcov. Bachorové bakteriofágy sa vyznačujú morfológickou diverzitou a patria do troch vírusových rodín (*Myoviridae*, *Siphoviridae* a *Podoviridae*) (Klieve a Bauchop, 1988). Svojimi vlastnosťami sú fágy dôležitým faktorom pre kontrolu dynamiky bakteriálnej populácie v bachore prežúvavcov. V súčasnosti sú bachorové bakteriofágy len málo preskúmané. Kompletne preskúmaný je len jeden bachorový bakteriofág – M1 lyzogénny fág zo *Selenomonas runinantium* ML12 (Cheong a Brooker, 1998).

V súčasnosti sú bakteriofágy zaujímavé z medicínskeho hľadiska. Už v roku 1920 sa začali využívať ich antibakteriálne účinky. Pre fágovú terapiu sú vhodné iba lytické bakteriofágy, pretože lyzogénne fágy nemusia vyvolať okamžitú deštrukciu bakteriálnych buniek a môžu niesť virulentné gény, ktoré sprostredkujú rezistenciu voči antibiotikám k iným baktériám. Fágová terapia sa osvedčila pri liečbe sepsí (otrave krvi), gastroenterologických ako aj nozokomiálnych infekcií.

Hoci je *E. faecalis* prirodzenou súčasťou ľudského gastrointestinálneho, je zároveň najrozšírenejším druhom spomedzi enterokokov spôsobujúcich infekcie u človeka. Patogénom sa stáva pri výskyte mimo tráviaceho traktu a v dnešnej dobe je *E. faecalis* hlavnou príčinou nozokomiálnych infekcií.

## MATERIÁL A METODIKA

*Bakteriálne kmene a živné pôdy(média):.*

Kmene *E. coli* K12 ER2267 a ER1821 rástli na médiu Luria-Bertani (LB) pri teplote 37 °C. Agarové platne boli pripravené pridaním 0.7 % agaru do živného média.

Kmeň 47/3 pôvodne klasifikovaný ako *Streptococcus bovis*, po 16S rRNA analýze sa preklasifikoval na kmeň *Enterococcus faecalis* 47/3 (Nigutová a kol., 2008). Kmeň rástol na živnom médiu Todd-Hewitt pri teplote 37 °C.

#### *Izolácia fágovej DNA:*

Po kultivácii sa kmeň *E. faecalis* 47/3 infikoval fágovým roztokom, ktorý obsahoval bakteriofág MSF1. Pri dostatočne vysokej hodnote pfu/ml (plaque forming unit), charakterizujúcej množstvo fágov a ovplyvňujúcej kvalitu fágovej DNA sa DNA izolovala podľa metodiky na izoláciu fágovej DNA (Maniatis a kol.,1989).

#### *Klonovanie a sekvenčná analýza:*

Génová banka bakteriofága MSF1 sa pripravila z celkovej DNA bakteriofága MSF1, ktorá sa parciálne poštípala reštrikčnými endonukleázami *HindIII*, *HincII* a *SspI*. Fragmenty DNA s veľkosťou nad 600 kbp sa vyextrahovali z gélu a ligovali do vektorového systému pUC118/*EcoRI* v prípade MSF1 DNA poštípenej *HindIII* a pUC118/*HincII* pri MSF1 DNA štiepenej *HincII* a *SspI*. Ligačné zmesi sa použili na transformáciu kompetentných buniek *E. coli* ER 1821 a *E. coli* ER 2267. Transformačné zmesi sa vysiali na LB platne s obsahom antibiotika ampicilínu (100 µg.ml<sup>-1</sup>). Individuálne kolónie získané po inkubácii počas noci (37°C) sa podrobili ďalšej analýze. Kolónie sa preočkovali do tekutého LB média s obsahom ampicilínu a nasledujúci deň sa izolovala plazmidová DNA alkalickou lýzou. Získané plazmidy sa podrobili reštrikčnej analýze použitím reštriktáz *HindIII*, *BamHI* pre overenie prítomnosti inzertu a analýza reštriktázami *HaeIII* a *Tsp509I* umožnila rozlíšenie jednotlivých fragmentov. Rekombinantné klony sa sekvenčne analyzovali použitím BLAST algoritmu (Altschul a kol.,1997) dostupného na webovej stránke <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

#### VÝSLEDKY A DISKUSIA

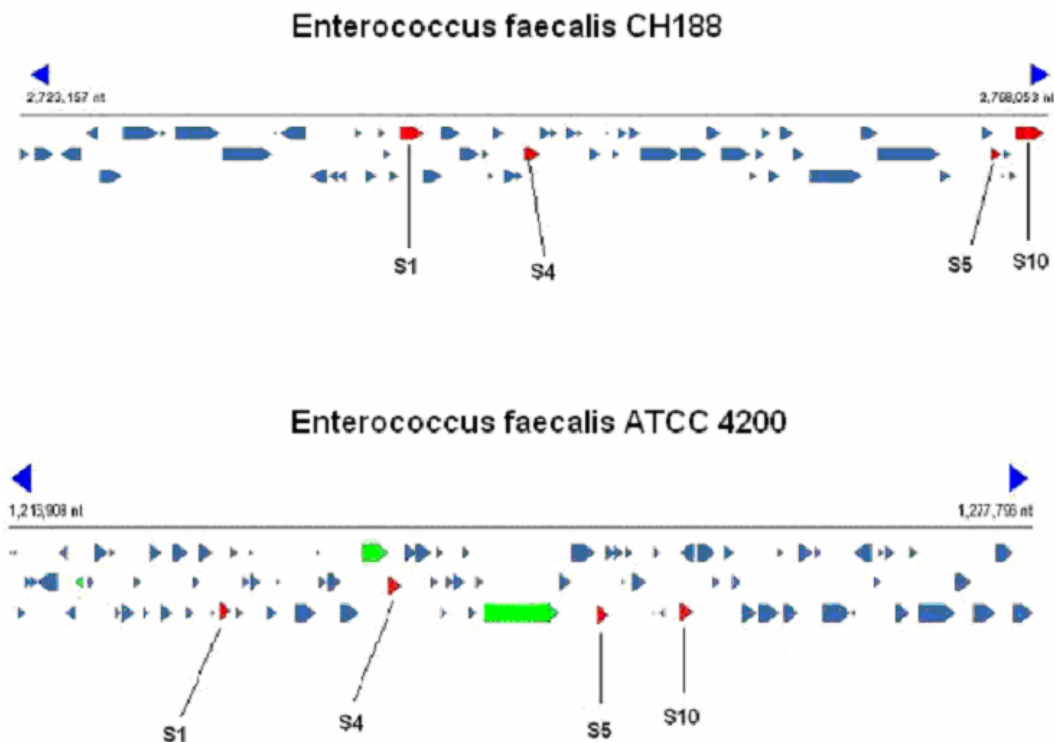
Z génovej banky bakteriofága MSF1 sme analyzovali 100 kolónií a náhodne vybrané transformanty testovali na výskyt inzertov. Sekvenčne sa analyzovalo 27 rekombinantov. Bioinformatická analýza sa vykonala BLAST algoritmom (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), v ktorej boli preložené poradia nukleotidov do poradia aminokyselín. Bioinformatická analýza bola robená ku dňu 20. júla 2010. Na základe tejto analýzy sme pozorovali významnú podobnosť nukleotidových sekvencií nami pripravených rekombinantov s časťami iných bakteriofágov u všetkých klonov (Tab. 1, dáta dokumentované pre rekombinanty S1-S10). Získané rekombinanty S3, S6, S9 a S10 na základe blastx analýzy kódujú fágové portálne proteíny. Tieto gény sú prirodzenou súčasťou bakteriofágov a majú funkciu pri infekcii fágovej nukleovej kyseliny do hostiteľského organizmu. Nukleotidová sekvencia rekombinanta S1 vykazuje najväčšiu podobnosť s *RecT* fágovou rekombinázou z *Enterococcus sp.* 7L76. Taktiež nukleotidová sekvencia ďalšieho rekombinanta S8 vykazuje 98% podobnosť s fágovou integrázou z fága *Enterococcus phiFL3A*.

Rekombinant S7 na základe blastx analýzy obsahuje gén kódujúci hypotetický proteín, vykazujúci najvyššiu podobnosť k proteínu lokalizovanému v oblasti profágu integrovaného v genóme *E. faecalis* ATCC 4200. Veľkosť rekombinanta S7 bola 1023 bp s obsahom 38,3% GC párov a pravdepodobne sa jedná o fágový proteín. Sekvencie rekombinantov S2 a S4 vykazujú 98% podobnosť s metylázou z *E. faecalis* ATCC 4200 (S2), resp. 97% podobnosť s metylázou z *E. faecalis* CH188 (S4). Obe tieto gény sú lokalizované v profágových sekvenciách v oboch organizmoch. Najzaujímavejším sa zdá byť rekombinant S5, ktorý v porovnaní s GenBank databázou vykazoval podobnosť s lyzínom *E. faecalis* X98. Rekombinant S5 obsahuje navyše gén kódujúci holín, ktorý podľa porovnaní patrí do rodiny phi29 *E. faecalis* ATCC 29200. V tabuľke 1 je znázornený prehľad rekombinantov, porovnanie veľkosti jednotlivých inzertov v rozmedzí 844 - 1167 bp, percentuálna podobnosť rekombinanta s príslušnou GenBank sekvenciou, Blast Hit miesto a percentuálny obsah GC párov.

Tabuľka 1: Prehľad vybraných rekombinantov

Rekombinant	Blastx Hit	Podobnosť Blastx analýza	Veľkosť inzertu (bp)	Obsah GC párov (%)
S1	CBL31291.1, recombinase, phage RecT family [Enterococcus sp. 7L76]	310/316 (98%)	1146	37,1
S2	<a href="#">ZP_05474704.1</a> , DNA modification methylase [Enterococcus faecalis ATCC 4200]	249/254 (98%)	1115	1.1 34,7
S3	ZP_05592573, predicted protein [Enterococcus faecalis AR01/DG]	187/188 (99%)	1093	39,4
S4	ZP_05585423, DNA modification methylase [Enterococcus faecalis CH188]	248/254 (97%)	1133	35,9
S5	ZP_05599211, endolysin [Enterococcus faecalis X98]	138/143 (96%)	1167	35,8
S6	ZP_05581578, minor structural protein 1 [Enterococcus faecalis D6]	258/266 (96%)	844	36,5
S7	ZP_05581577, predicted protein [Enterococcus faecalis D6]	265/267 (99%)	1023	38,3
S8	YP_003347563, integrase [Enterococcus phage phiFL3A]	95/96 (98%)	1045	35,3
S9	YP_003347564, hypothetical protein [Enterococcus phage phiFL3A]	109/114 (95%)	1054	33,4
S10	ZP_05422950, predicted protein [Enterococcus faecalis T1]	119/124 (95%)	1044	35,2

Obrázok č.1 znázorňuje lokalizáciu najlepších blastx hitov rekombinantov z génovej banky bakteriofága MSF1 (S1,S4,S5,S10), ktoré boli porovnávané s genómom *E. faecalis* CH188 a *E. faecalis* ATCC 4200. Z porovnávaní vyplýva, že sekvencie rekombinantov z genómu fága MSF1 vykazujú významnú podobnosť s profágmi v genómoch organizmov *E. faecalis*. Okrem spomínanej sekvenčnej podobnosti majú rovnakú aj lokalizáciu jednotlivých génov z čoho usudzujeme, že bakteriofág MSF1 je lyzogénnym bakteriofágom a patrí medzi predstaviteľov profágov v organizmoch *E. faecalis*. Podľa získaných poznatkov môžeme konštatovať, že MSF1 sa radí medzi profágy pochádzajúce z voľne žijúcich enterokokových organizmov, ale vzhľadom na ich vysokú vzájomnú podobnosť sa do popredia dostáva otázka, či je vhodné pokračovať v ďalšej charakterizácii genómu bakteriofága MSF1.



Obrázok č.1: Prehľad porovnávania genómov *Enterococcus faecalis* CH188 a *Enterococcus faecalis* ATCC 4200.

## POĎAKOVANIE

Autor ďakuje za finančnú podporu grantu APVV -0586-07.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Cheong J.P.E., Brooker J.D.: Lysogenic bacteriophage M1 from *Selenomonas ruminantium*: isolation, characterization and DNA sequence analysis of the integration site. *Microbiology* 144, 2195-2202 (1998).
- Klieve A.V., Bauchop T.: Morphological diversity of ruminal bacteriophages from sheep and cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 54,1637-1641(1998).
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.: Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, (1982).
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.: Molecular cloning: A laboratory manual. Second Edition, Cold Spring Harbor, NY, (1989).
- Nigutová K., Štyriak I., Javorský P., Pristaš P.: Partial characterization of *Enterococcus faecalis* Bacteriophage F4. *Folia Microbiol.*, 2008, 53, 234-236.
- Wichels A., Biel S.S., Gelderblom H.R., Brinkhoff T., Muyzer G., Schutt Ch.: Bacteriophage Diversity in the North Sea. *App. and Environ. Microbiol.*, 1998, 64 (11), 4128-4133.
- Štyriak I., Pristaš P., Javorský P.: Lack of GATC sites in the genome of *Streptococcus bovis* bacteriophage F4. *Res. Microbiol.*, 151, 2000, 285-289.

# RESTRIKČNO-MODIFIKAČNÉ SYSTÉMY U BAKTÉRIÍ RODU *ENTEROCOCCUS*

Vandžurová A.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

## ABSTRAKT

V práci sme študovali výskyt restričných a modifikačných aktivít II. typu u bakteriálnych izolátov patriacich do rodu *Enterococcus*. Pozornosť sme venovali najmä restričným enzýmom, ktoré sme po detekcii v hrubých bunkových extraktoch použitím chromatografie čiastočne purifikovali. Určili sme základné biochemické vlastnosti purifikovaných enzýmov a využitím metódy „run-off“ sekvenovania sme stanovili štiepne miesta.

Zo 48 bakteriálnych kmeňov rodu *Enterococcus* sme prítomnosť restričných endonukleáz potvrdili u kmeňov *E. faecium* 31K a *Enterococcus sp.* 8M. Endonukleáza Efa31KI je aktívna v širokom rozsahu koncentrácie solí a rozoznáva sekvenciu CCWGG. Metódou „run-off“ sekvenovania sme dokázali, že enzým štiepi za druhým cytozínom v rámci CCWGG sekvencie a je teda pravým izoschizomérom BstNI a neoschizomérom EcoRII. Restričná endonukleáza Esp8MI rozoznáva sekvenciu GDGCHC a štiepi za piatym nukleotidom v tejto sekvencii (GDGCH/C) a je pravým izoschizomérom SduI. Štiepením totálnej DNA testovaných kmeňov komerčne dostupnými restričnými enzýmami sme dokázali aj prítomnosť špecifických DNA metyltransferázových aktivít.

## ÚVOD

Restrično-modifikačné systémy (R-M systémy) boli po prvý krát popísané u prokaryotických organizmov, hlavne u baktérii, v súvislosti so schopnosťou ochrany bakteriálnych buniek pred vstupom cudzorodej DNA (obvykle pred infekciou bakteriálnymi vírusmi tj. bakteriofágmi) (Piknová a kol., 2004, 2005). R-M systémy pozostávajú z enzýmov s dvomi odlišnými enzýmovými aktivitami: restričnej endonukleázy a DNA metyltransferázy. Restričné endonukleázy (RE) sú enzýmy, ktoré rozoznávajú a štiepia špecifické sekvencie (zväčša palindromické) v rámci dvojvláknovej DNA. DNA metyltransferázy (DNA MTázy) sú enzýmy, ktoré katalyzujú metyláciu DNA (Wilson a kol., 1991). Práve štúdium restrično-modifikačných systémov a objav restričných endonukleáz umožnili získavanie definovaných fragmentov DNA a ich následnú analýzu. U enterokokov neboli doposiaľ charakterizované žiadne R-M systémy na biochemickej úrovni a jediný známy R-M systém II. typu sa predpokladá len na základe sekvenčnej homológie u *E. faecalis* V583.

Cieľom práce bolo preštudovať výskyt restričných a modifikačných aktivít II. typu u rôznych bakteriálnych izolátov patriacich do rodu *Enterococcus*. Pozornosť bola venovaná hlavne restričným enzýmom a ich základnej biochemickej charakterizácii.

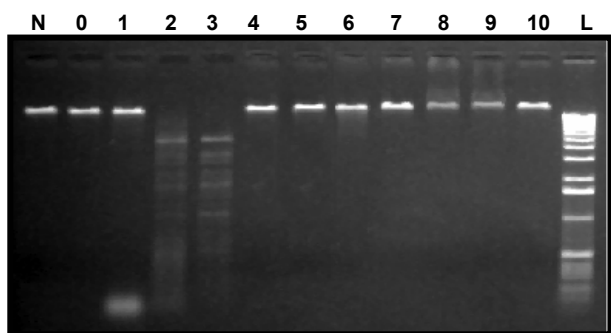
## MATERIÁL A METODIKA

V práci sme použili 48 kmeňov enterokokov, ktoré pochádzali zo zbierky mikroorganizmov Ústavu fyziológie hospodárskych zvierat SAV v Košiciach a boli izolované z faeces alebo tráviaceho traktu rôznych zvierat (Nigutová a kol., 2005). Bakteriálne kmene sme kultivovali v tekutom Todd Hewitt médiu, pričom kultivácia prebiehala za trepania v aeróbných podmienkach pri 37 °C. V prvom kroku sme restričnú aktivitu testovali v hrubých bunkových extraktoch, postupom podľa modifikovanej skriningovej metódy Javorského a Vanáta (1992). Na chromatografickú purifikáciu sme použili 1ml kolónu HiTrap Heparin HP (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Švédsko). Elúcia proteínov prebiehala v 5 – 10 ml lineárneho gradientu 0 - 1,2 mol.dm<sup>-3</sup> NaCl v roztoku A. Rýchlosť prietoku elučného roztoku bola 30ml/h a zachytené frakcie mali objem 500 µl. Aktivitu restričných enzýmov sme testovali štiepením rôznych DNA substrátov v 20 µl štiepných zmesiach nasledovného

zloženia: 0,5 µl DNA, 2 µl hrubý bunkový extrakt, 2 µl tlmivý roztok NEB4 a 15,5 µl destilovanej vody. Štiepne zmesi sme inkubovali 45 min pri 37 °C, po inkubácii sme pridali 2 µl STOP roztoku a vzorky DNA sme následne analyzovali elektroforeticky v 0.8% agarózových géloch. Získané fragmenty sme vizualizovali pod UV svetlom. Optimálne podmienky pre aktivitu RE sme testovali v systéme univerzálnych tlmivých roztokoch NEB 1, 2, 3, 4 od firmy New England Biolabs, ktoré sa líšili predovšetkým koncentráciou solí. Pre presné určenie štiepneho miesta sme použili metódu „run-off“ sekvenovania (Parashar a kol., 2006). Sekvenovanie sme uskutočnili Sangerovou dideoxy metódou v laboratóriách firmy Macrogen.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Zo 48 kmeňov enterokokov sme restričnú aktivitu detegovali u dvoch kmeňov: *E. faecium* 31K a *Enterococcus sp.* 8M. Uvedené enzýmy sme v ďalšom kroku chromatograficky purifikovali. V bunkových extraktoch oboch kmeňov sme potvrdili prítomnosť restričnej aktivity (Obr. 1, dáta dokumentované pre kmeň *Enterococcus sp.* 8M). V zmysle najnovšej nomenklatury (Roberts a kol., 2003) sme purifikované enzýmy označili ako Efa31K1 a Esp8MI.



**Obr. 1.** Detekcia restričnej aktivity *Enterococcus sp.* 8M (dráha č. 2 – 3) po elúcii z kolóny HiTrap Heparin HP.

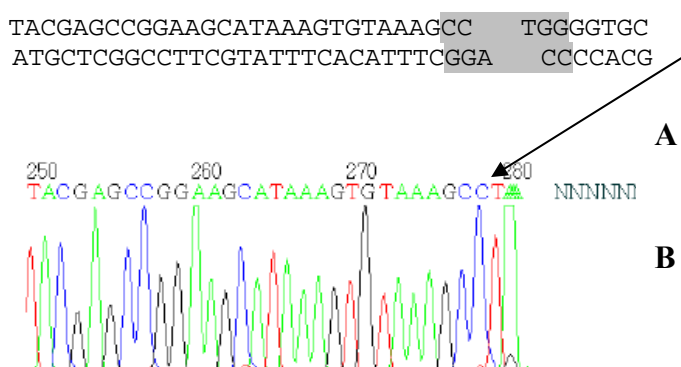
Po purifikácii RE Efa31K1 a Esp8MI sme pristúpili k určaniu optimálnych podmienok pre ich aktivitu a stanoveniu rozoznávanej sekvencie. RE Efa31K1 vykazovala takmer 100% aktivitu vo všetkých tlmivých roztokoch, a je aktívna v širokom rozsahu koncentrácie solí (od 0 – 100mM NaCl). V prípade enzýmu Esp8MI sme najvyššiu aktivitu pozorovali v prítomnosti tlmivého roztoku NEB 2 (50mM NaCl), preto sme na ďalšie analýzy použili tento tlmivý roztok.

### Stanovenie rozoznávanej sekvencie pre Efa31K1

Za účelom stanovenia rozpoznávanej DNA sekvencie sme uskutočnili série štiepení rôznych DNA substrátov. Získané profily štiepení sme porovnávali s teoreticky vytvorenými profilmi (získané zo stránky databázy REBASE <http://rebase.neb.com>) už známych RE. Profily získané štiepením λDNA, pKRX a pBR328 vykazovali dominantné fragmenty podobné teoreticky vytvorenému profilu pre restričnú endonukleázu BstNI. Pre potvrdenie podobnosti profilov sme uskutočnili kombinované štiepenie λDNA enzýmom Efa31K1 a komerčne dodávaným enzýmom BstNI. Získané profily boli identické, z čoho vyplýva, že Efa31K1 rozpoznáva sekvenciu CCWGG, a teda je izoschizomérom BstNI. Pre presné určenie štiepneho miesta v rámci rozoznávanej sekvencie CCWGG sme použili plazmid pKRX, ktorý obsahuje zásahové miesto pre Efa31K1 vo vhodnej vzdialenosti od univerzálného sekvenačného priméru. Plazmid pKRX sme štiepili s Efa31K1 a linerizovaný purifikovaný DNA produkt sme následne sekvenovali. Ako vidieť na obr. 2, Efa31K1 štiepi za druhým



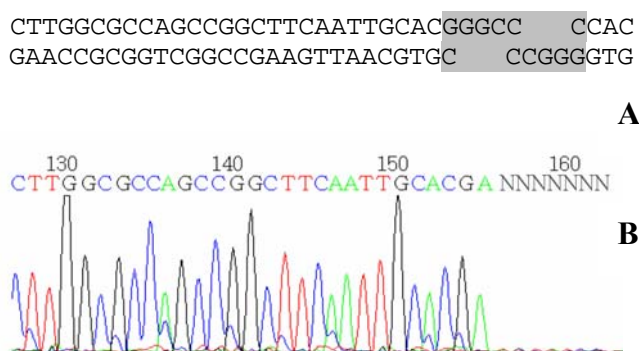
cytozínom v rámci CCWGG sekvencie a je tak pravým izoschizomérom BstNI (CC/WGG) a neoschizomérom RE EcoRII (/CCWGG).



**Obr. 2.** Stanovenie miesta štiepenia endonukleázy Efa31KI v rámci sekvencie CCWGG s použitím plazmidu pKRX metódou „run-off“ sekvenovania. A - reálna sekvencia plazmidu pKRX so zvýrazneným zásahovým miestom pre Efa31KI; B - chromatogram zo sekvenovania plazmidu pKRX, štiepeného s Efa31KI. (Posledný A nukleotid v získanej sekvencii bol nešpecificky pridaný polymerázou v procese sekvenovania)

### Stanovenie rozoznávanej sekvencie pre Esp8MI

Štiepením pLitmus 38 a λDNA RE Esp8MI vznikli dominantné fragmenty, podobné teoreticky vytvorenému profilu SduI. Porovnaním profilov štiepenia λDNA enzýmom Esp8MI a komerčne dodávaným enzýmom SduI jednotlivo a ich kombináciou sme potvrdili, že oba enzýmy produkujú zhodné profily štiepenia, a teda enzým Esp8MI rozoznáva sekvenciu GDGCHC a je izoschizomérom SduI. Pri určovaní štiepneho miesta v rámci sekvencie GDGCHC rozoznávanej RE Esp8MI sme na sekvenovanie vybrali plazmid pLitmus 38, u ktorého sa zásahové miesto pre Esp8MI nachádzalo vo vzdialenosti asi 160 nukleotidov od sekvenačného primeru. Chromatogram zo sekvenovania (obr. 3) jednoznačne dokazuje, že RE Esp8MI štiepi za piatym nukleotidom v rámci rozoznávanej GDGCHC sekvencie, a je teda pravým izoschizomérom SduI (GDGCH/C).



**Obr. 3.** Stanovenie miesta štiepenia pre restričný enzým Esp8MI v rámci sekvencie GDGCHCs použitím plazmidu pLitmus 38 metódou „run-off“ sekvenovania. A - reálna sekvencia plazmidu pLitmus 38 so zvýrazneným zásahovým miestom pre Esp8MI; B - chromatogram zo sekvenovania. (Posledný A nukleotid v získanej sekvencii bol nešpecificky pridaný polymerázou v procese sekvenovania)

V našich experimentoch sme prítomnosť RE potvrdili u dvoch kmeňov *E. faecium* 31K (Efa31KI) a *E. sp.* 8M (Esp8MI) z celkovo 48 testovaných bakteriálnych kmeňov rodu *Enterococcus*. Experimenty ukázali, že RE Efa31KI je aktívna v širokom rozsahu koncentrácie solí, rozoznáva sekvenciu CCWGG a jej štiepne miesto sa nachádza za druhým

cytozínom v rámci CC/WGG sekvencie a je teda pravým izoschizomérom BstNI izolovaný z baktérie rodu *Bacillus stearothermophilus* (Buryanov a kol., 1989). Izoschizoméry BstNI sú jedny z najčastejšie sa vyskytujúcich RE a boli doteraz izolované viac ako 150 krát z baktérií z rôznych taxonomických skupín a rôznych prostredí.

Endonukleáza Esp8MI vykazuje najvyššiu aktivitu v 50mM NaCl, rozoznáva sekvenciu GDGCHC a jej štiepne miesto sa nachádza za piatym nukleotidom (GDGCH/C) a je teda pravým izoschizomérom SduI (Janulaitis a kol., 1981). Restriktčná endonukleáza SduI bola izolovaná z baktérie *Streptococcus durans*, ktorá je dnes klasifikovaná *Enterococcus durans*, teda z taxonomicky blízkeho organizmu. SduI izoschizoméry sú len zriedkavo detegované, doteraz boli nájdené len 15 krát, pričom viac než polovica izolátov produkujúcich SduI izoschizoméry patrí ku gram-pozitívnym baktériám.

Prítomnosť DNA MTázových aktivít sme dokázali štiepením totálnych DNA u kmeňov testovaných na RE s komerčne dostupnými RE.

Naše štúdium R-M systémov u enterokokov je pravdepodobne prvou systematickou biochemickou štúdiou zameranou na tento bakteriálny druh, ktorý bol doposiaľ z hľadiska výskytu R-M systémov prakticky neprebádaný. Baktérie rodu *Enterococcus* sú pritom najmä z medicínskeho hľadiska významné patogénny, ktoré spôsobujú rôzne infekcie a lepšie poznanie ich genetiky môže napomôcť k účinnejšej liečbe infekcií vyvolaných enterokokmi.

## POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla za podpory grantu VEGA 2/0051/08.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Buryanov Y.I., Baryshev M.M., Kosykh, V.G., Bayev, A.A. The purification and characterization of BstNI modification methylase. *J. Cell Biochem. Suppl.* 1989, 13D: 211.
- Janulaitis, A., Marcinkeviciene, L., Petrusyte, M., Mironov, A. A new sequence-specific endonuclease from *Streptococcus durans*. *FEBS Lett.* 1981, 134: 172-174.
- Nigútová K, Pristas P, Javorský P. Bacteriocin-like activity production and resistance in selected enterococci and streptococci of animal origin. *Arch Anim Nutr.* 2005, 59 3: 205-11.
- Parashar V., Capalash N., Xu S., Sako Y., Sharma P. TspMI, a thermostable isoschizomer of XmaI (5'C/CCGGG3'): characterization and single molecule imaging with DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 72: 917-923.
- Piknová M., Fiľová M., Javorský P., Pristaš P. Different restriction and modification phenotypes in ruminal lactate-utilizing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004, 236: 91-95.
- Piknová M., Javorský P., Pristaš P. Multiple restriction-modification systems are present in rumen treponemes. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005, 251: 99-103.
- Roberts R. J., Belfort M., Bestor T., Bhagwat A. S., Bickle T. A. a kol. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res.* 2003, 31: 1805-1812
- Wilson G. G., Murray N. E. Restriction and Modification Systems. *Annu. Rev. Genet.* 1991, 25: 585-627.

## VÝSKYT MASTITÍD STAFYLOKOKOVEJ ETIOLÓGIE V CHOVE DOJNÍC A MOŽNOSTI ICH REDUKCIE

Zigo František, Vasiľ Milan, Elečko Juraj

Ústav chovu zvierat, UVLF, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

### ABSTRAKT

Príspevok sa zaoberá výskytom mastitíd stafylokokovej etiológie a možnosťami ich redukcie v chove 145 dojníc s voľným ustajnením. Počas jedného roka bolo vykonaných päť komplexných vyšetrení v štvrtročných intervaloch a následne počas sledovaného obdobia boli navrhnuté protimastitídne opatrenia. Po druhom komplexnom vyšetrení sa liečilo 19 dojníc infikovaných baktériami *Staphylococcus sp.* prípravkom Synulox LC susp. a.u.v. Po liečbe klesol počet infikovaných dojníc baktériami *Staphylococcus sp.* z 28.4 % na 14.4 %, ale zvýšil sa počet infikovaných dojníc baktériami *Streptococcus sp.* o 6,5 %. Po štvrtom komplexnom vyšetrení sa liečilo prípravkom Synulox LC susp. a.u.v. 22 dojníc infikovaných baktériami *Staphylococcus sp.* a 19 dojníc infikovaných baktériami *Streptococcus sp.* Aj keď sa znížil počet dojníc infikovaných baktériami *Staphylococcus sp.* z 33.9 % na 16.8 % a *Streptococcus sp.* z 25 % na 11.2 %, v danom čase vzrástol počet dojníc infikovaných baktériami *Enterococcus sp.*+*E.coli* z 0.8 % na 6.4 % a dojníc infikovaných inými baktériami (*Bacillus sp.*; *Arcanobacterium sp.*; *Proteus sp.*; *Rhodococcus sp.*) z 1.6 % na 10.4 %.

### ÚVOD

Mastitídy dojníc sú polyfaktórne ochorenia, na ktorých sa podieľajú patogénne mikroorganizmy, vonkajšie prostredie, organizmus dojnice ale aj manažérske schopnosti chovateľa. V súčasnosti je známych cca. 130 pôvodcov mastitíd. Patria sem baktérie, vírusy, plesne, kvasinky ale aj prvoky. Najčastejšími pôvodcami mastitíd sú baktérie. Mikroorganizmy najčastejšie infikujú vemeno cez ceckový kanálik (Tongel, 2009). V etiológii mastitíd dojníc baktérie *Staphylococcus sp.* zaberajú významné miesto. V severských krajinách sa koagulázo–negatívne stafylokoky podieľajú na environmentálnych mastitídach dojníc až 50 % (Pitkälä a kol., 2004). Na Slovensku problém environmentálnych mastitíd po roku 2000 narastá. Prv to boli hlavne zápaly vemena vyvolané baktériami *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* a druhmi z čeľade *Enterobacteriaceae*. Ostatných rokoch v etiológii environmentálnych mastitíd dojníc na Slovensku dominujú koagulázo–negatívne stafylokoky a zvýšil sa výskyt mastitíd vyvolaný *Arcanobacterium pyogenes* a *Streptococcus dysgalactiae* (Vasiľ, 2006).

Cieľom práce bolo v chove dojníc s voľným ustajnením a dojením v dojárni, sledovať výskyt mastitíd vyvolaných baktériami *Staphylococcus sp.* a *Streptococcus sp.* a napomôcť efektívnemu uplatneniu protimastitídnych metód pri ich redukcii v chove.

### MATERIÁL A METÓDY

Sledovania boli vykonané v stáde o priemernom počte 145 dojníc ustajnených voľne v 3 rekonštruovaných kravínoch rozdelených do troch produkčných skupín a dojených v dojárni zariadením Westfalia tandem 2 x 4 (Bönen, Germany) s brakovaním 20 % a dopĺňaním vysokoteľnými jalovicami.

Na začiatku sledovania boli zistené nedostatky. Ustajňovacie priestory sa čistili nedostatočne a nepravidelne dezinfikovali, deratizácia a dezinfekcia sa nevykonávala takmer vôbec. Hygienický program dojenia sa nevykonával správne (najčastejšie nedostatky boli v nedokonalom umývaní a osušení vemena, neskorom ponáraní koncov ceckov po vydojení a nezaškolenom obsluhujúcom personáli). Kontrola účinnosti používaných dezinfekčných roztokov sa nevykonávala. Výpadok v používaní jednorazových utierok na umývanie ale aj na

osúšanie vemena sa nahrádzal nedostatočným počtom plátených utierok. Klinické prípady mastitíd sa liečili sporadicky, bez určenia pôvodcu a stanovenia citlivosti antibiotikami. Kontrola účinnosti liečby sa nevykonávala. Normou požadovaný počet somatických buniek v bazénovej vzorke ( $400000.1 \text{ ml}^{-1}$ ) mlieka určeného pre dodávku do mliekárne chovateľ zabezpečoval tak, že selektoval dojnice. Dojnice selektoval týždenne na základe výsledkov NK-testu. Dojnice vykazujúce pozitívnu reakciu pri vyšetrení NK-testom na 2+, dojil zvlášť a mlieko likvidoval (tento postup uplatňoval aj počas nášho sledovania).

Na začiatku sledovania boli prijaté opatrenia na odstránenie zistených nedostatkov a obsluhujúci personál bol preškolený v oblasti hygienického programu dojenia, čistenia, dezinfekcie ustajňovacích priestorov, pravidelnosti dezinfekcie a deratizácie, kontroly správnej funkcie dojacieho zariadenia, kontroly denného, týždenného, mesačného čistenia a dezinfekcie dojacieho zariadenia a zaviedla sa liečba dojníc v zasušení.

Výskyt mastitíd sme sledovali rok. Pri každom komplexnom vyšetrení vykonanom v trojmesačných intervaloch bolo vemené u všetkých laktujúcich dojníc vyšetrené klinicky, sekrét každej laktujúcej mliečnej štvrte bol vyšetrený NK-testom a za aseptických podmienok boli odobraté štvrťové vzorky mlieka na bakteriologické vyšetrenie. Po druhom komplexnom vyšetrení sa Synuloxom LC susp. a.u.v. (Pfizer AH, Taliansko) liečilo 19 dojníc, u ktorých bolo 28 štvrtí infikovaných druhmi *Staphylococcus sp.* Po štvrtom komplexnom vyšetrení sa prípravkom Synulox LC susp. a.u.v. liečilo 41 dojníc, z ktorých bolo 22 dojníc infikovaných baktériami *Staphylococcus sp.* a 19 dojníc baktériami *Streptococcus sp.*

## VÝSLEDKY

Z výsledkov uvedených v tabuľke 1 vyplýva, že navrhnuté protimastitídne opatrenia sa dôsledne nedodržiavali, preto po druhom komplexnom vyšetrení sa liečilo 19 dojníc infikovaných baktériami *Staphylococcus sp.* prípravkom Synulox LC susp. a.u.v. Po liečbe klesol počet infikovaných dojníc baktériami *Staphylococcus sp.* o 14 %, ale zvýšil sa počet infikovaných dojníc baktériami *Streptococcus sp.* o 6,5 %. Po štvrtom komplexnom vyšetrení sa liečilo prípravkom Synulox LC susp. a.u.v. 22 dojníc infikovaných baktériami *Staphylococcus sp.* a 19 dojníc infikovaných baktériami *Streptococcus sp.* Aj keď sa znížil počet dojníc infikovaných baktériami *Staphylococcus sp.* o 17,1 % a *Streptococcus sp.* o 13,8 %, v danom čase vzrástol počet dojníc infikovaných baktériami *Enterococcus sp.*+*E.coli* o 5,6 % a dojníc infikovaných inými baktériami (*Bacillus sp.*; *Arcanobacterium sp.*; *Proteus sp.*; *Rhodococcus sp.*) o 8,8 %.

**Tabuľka 1** Výskyt baktérií v individuálnych vzorkách mlieka laktujúcich dojníc v stáde o priemernom počte 145 kráv počas piatich vyšetrení vykonaných v štvrtročných intervaloch

Poradie vyšetrení chovu	I.		II.		III.		IV.		V.	
Počet vyšetrených kráv	121		116		118		124		125	
Izolované baktérie	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Staphylococcus sp.</i>	37	30,6	33	28,4	17	14,4	42	33,9	21	16,8
<i>Streptococcus sp.</i>	6	5	16	13,8	24	20,3	31	25	14	11,2
<i>Enterococcus+E.coli</i>	4	3,3	3	2,6	7	6	1	0,8	8	6,4
Iné baktérie	14	11,6	12	10,3	15	12,7	2	1,6	13	10,4
<b>Celkom</b>	<b>61</b>	<b>50,4</b>	<b>64</b>	<b>55,2</b>	<b>63</b>	<b>53,4</b>	<b>76</b>	<b>61,2</b>	<b>56</b>	<b>44,8</b>

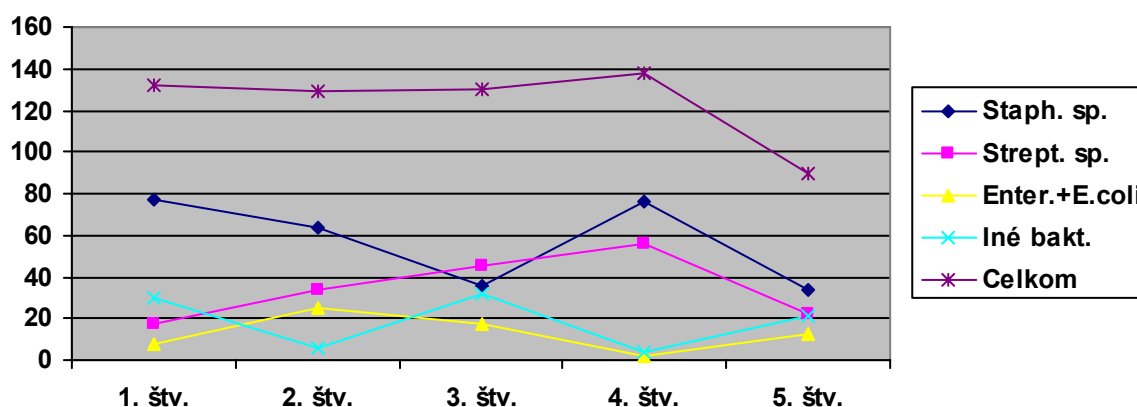
**Iné baktérie - (*Bacillus sp.*; *Arcanobacterium sp.*; *Proteus sp.*; *Rhodococcus sp.*)**

**Tabuľka 2** Výskyt baktérií v štvrťových vzorkách mlieka laktujúcich dojníc počas piatich vyšetrení vykonaných v štvrťročných intervaloch.

Poradie vyšetrení chovu	I.		II.		III.		IV.		V.	
Vyšetrené štvrťové vzorky mlieka	473		453		460		483		488	
Izolované baktérie	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Staphylococcus aureus.</i>	5	1,1	3	0,7	2	0,4	8	1,7	1	0,2
<i>Staphylococcus xylosus</i>	24	5,1	21	4,6	6	1,3	25	5,2	16	3,2
<i>Staphylococcus warneri</i>	29	6,1	10	2,2	9	2,0	9	1,9	4	0,8
<i>Staphylococcus chromog.</i>	9	1,9	17	3,8	4	0,9	20	4,1	8	1,6
<i>Staphylococcus pulvereri</i>	10	2,1	13	2,9	15	3,3	14	2,9	5	1,2
<b><i>Staphylococcus sp.</i></b>	<b>77</b>	<b>16,3</b>	<b>64</b>	<b>14,1</b>	<b>36</b>	<b>7,8</b>	<b>76</b>	<b>15,7</b>	<b>34</b>	<b>7,0</b>
<i>Streptococcus uberis</i>	11	2,3	23	5,1	29	6,3	32	6,6	15	3,0
<i>Streptococcus dysgalacie</i>	6	1,3	11	2,4	16	3,5	24	4,9	7	1,4
<b><i>Streptococcus sp.</i></b>	<b>17</b>	<b>3,6</b>	<b>34</b>	<b>7,5</b>	<b>45</b>	<b>9,8</b>	<b>56</b>	<b>11,6</b>	<b>22</b>	<b>4,5</b>
<i>Enterococcus sp. + E.coli</i>	8	1,7	25	5,5	17	3,7	2	0,4	13	2,7
<b>Iné baktérie</b>	<b>30</b>	<b>6,3</b>	<b>6</b>	<b>1,3</b>	<b>32</b>	<b>7,0</b>	<b>4</b>	<b>0,8</b>	<b>21</b>	<b>4,5</b>
<b>Celkom</b>	<b>132</b>	<b>27,9</b>	<b>129</b>	<b>28,5</b>	<b>130</b>	<b>28,2</b>	<b>138</b>	<b>28,6</b>	<b>90</b>	<b>18,4</b>

Iné baktérie - (*Bacillus sp.*; *Arcanobacterium sp.*; *Proteus sp.*; *Rhodococcus sp.*)

**Graf 1** Dynamika výskytu patogénnych baktérií v štvrťových vzorkách počas piatich vyšetreniach chovu o priemernom počte 140 dojníc vyšetovaných v štvrťročných intervaloch.



Iné baktérie - (*Bacillus sp.*; *Arcanobacterium sp.*; *Proteus sp.*; *Rhodococcus sp.*)

Z prezentovaných výsledkov vyplýva:

- Redukcia mastitíd vyvolaných druhmi *Staphylococcus sp.* vyžaduje komplexné uplatnenie protimastitídnych metód a liečbu všetkých nimi infikovaných dojníc v stáde.
- Vysoký bakteriologický tlak z prostredia a z infikovaných mliečnych žliaz dojníc vedie k nárastu infekcií vemena dojníc inými pôvodcami mastitíd prítomných v stáde.
- I na priek vyššiemu výskytu enviromentálnych infekcií mliečnej žľazy s latentným, subklinickým a subakútnym priebehom je možné pri separácii mlieka z infekčných štvrtí produkovať mlieko s obsahom PSB v bazénovej vzorke do 400 000/ml<sup>-1</sup>.

## POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporovaná projektom APVV-0629-07, projektom VEGA1/0384/08 a projektom APVT-20-025604

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Pitkälä A, Haveri M, Pyörälä S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T: Bovine Mastitis in Finland 2001- Prevalence, Distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance. *J. Dairy Sci*, vol. 87, 2004, no.8, p. 2433-2441
- Tongel P: Odpovede na 50 najčastejšie kladených otázok týkajúcich sa produkcie vysoko kvalitného mlieka. *Slovenský chov*, vol.8, 2009, p.33-34.
- Vasil' M. Etiologické aspekty environmentálnych mastitíd v dvoch chovoch dojníc s rozdielnym spôsobom dojenja. *Mliekárstvo*, vol. 37, 2006, no.3, p. 23-28
- Waage S, Mörk T, Røros A, Aasland D, Hunshamar A, Ödegaard S. A.: Bacteria Associated with Clinical Mastitis in dairy Heifers. *J. Dairy Sci*, vol. 82, 1999, no.4, p. 712-719.

**VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV  
2010**

**Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Bod'u  
V. ročník**

Zostavil: MVDr. Dušan Fabian, PhD.

Vydal: Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4/6, 04001 Košice  
Prvé vydanie. 136 strán.

**ISBN 978-80-968618-5-9  
EAN 9788096861859**

**ISBN 978-80-968618-5-9**