

VĚDECKÝ ČASOPIS



VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

6

ROČNÍK 21 (XLIX)
PRAHA
CENA 10 Kčs
ČERVEN 1976

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Rídí redakční rada

Prof. MVDr. Antonín Holub, DrSc. (předseda), prof. MVDr. Koloman Boďa, DrSc., doc. MVDr. Jan Čarvaš, CSc., prof. MVDr. Jaroslav Dražan, CSc., MVDr. Miroslav Dvořák, CSc., MVDr. Miloš Halaša, CSc., doc. MVDr. Jozef Hrušovský, DrSc., prof. MVDr. Emanuel Král, MVDr. Jaromír Lát, CSc., MVDr. Andrej Mačička, CSc., doc. MVDr. Ladislav Polák, CSc., MVDr. Jiří Srna, prof. MVDr. Jaroslav Vrtiak, DrSc.

Vedoucí redaktorka ing. Jovanka Václavičková

© Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství,
Praha 1976

■
Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA uveřejňuje studie, rozbor a vědecká pojednání o vyřešených úkolech výzkumu z oboru veterinární medicíny. Vydává Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství. Vychází měsíčně. Redakce: 120 56 Praha 2, Slezská 7, telefon 257541. Celoroční předplatné Kčs 120,—.

■
Научный журнал VETERINÁRNÍ MEDICÍNA публикует обзоры, анализы и научные статьи о разрешенных задачах по научному исследованию в области ветеринарии. Издает Институт научно-технической информации по сельскому хозяйству. Выход в свет ежемесячно. Редакция 120 56 Прага 2, Слезска 7.

■
The scientific journal VETERINÁRNÍ MEDICÍNA publishes studies, analyses and scientific treatises about the solved research tasks in the line of the veterinary medicine. Published by the Institute of Scientific and Technical Information for Agriculture. Issued monthly. Editorial office 120 56 Prague 2, Slezská 7.

■
Die wissenschaftliche Zeitschrift VETERINÁRNÍ MEDICÍNA veröffentlicht Studien, Analysen und wissenschaftliche Abhandlungen über die gelösten Forschungsaufgaben auf dem Gebiete der Veterinärmedizin. Herausgegeben von Institut für wissenschaftlich-technische Information der Landwirtschaft. Erscheint monatlich. Redaktion 120 56 Prag 2, Slezská 7.

■
Le journal scientifique VETERINÁRNÍ MEDICÍNA publie les études, analyses et traités scientifiques concernant les tâches de recherches résous dans le domaine de médecine vétérinaire. Publie par l'Institut des informations scientifiques et techniques pour l'agriculture. Paraît une fois par mois. Rédaction 120 56 Prague 2, Slezská 7.

IZOLACE TOXIGENNÍHO KMENE PLÍSNĚ *ASPERGILLUS FLAVUS* A CHARAKTERISTIKA PRODUKOVANÝCH AFLATOXINŮ

O. Zapletal, A. Piskač, J. Malá, J. Dražan ml.

Vysoká škola veterinární, Brno

ZAPLETAL O., PISKAČ A., MALÁ J., DRAŽAN J. ml. *Izolace toxigenního kmene plísně *Aspergillus flavus* a charakteristika produkováných aflatoxinů.* Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 321-330, 1976.

Autoři popisují průkaz produkce aflatoxinu B₁ kmenem plísně *Aspergillus flavus*, který byl na jaře roku 1975 zachycen na cereálním krmivu. Kromě schopnosti produkovat tento mykotoxin vykazoval tento kmen plísně, ve srovnání s laboratorními kmeny *Aspergillus flavus*, velmi rychlý a intenzivní růst a vývoj. Získaný a izolovaný aflatoxin B₁ bylo možné chromatograficky a spektrálně fotometricky identifikovat až tehdy, když byl kmen plísně kultivován na vhodném substrátu, na kterém produkoval v nejmenší míře rušivé fluoreskující vedlejší metabolity. Tento poznatek vedl autory k závěru, že v některých případech je nutné kromě dosud klasicky používaného postupu diagnostiky aflatoxikóz požadovat i izolaci popřípadě přítomného kmene *Aspergillus flavus* a po jeho přepěstování v čistých kulturách na vhodných mediích pak zjišťovat produkci aflatoxinů a fyzikálně chemicky je identifikovat.

aflatoxiny; toxigenita plísně; rušivé produkty; komplexní diagnostika; izolace kmene; *Aspergillus flavus*

V posledních letech se otázka mykotoxikóz dostává do popředí zájmu v humánní i veterinární medicíně. Zejména to byl a stále je *Aspergillus flavus*, jehož některými kmeny produkované mykotoxiny – aflatoxiny – jsou v dost široké míře přítomny v potravinách a krmivech rostlinného i živočišného původu. Zatímco se v nedávno minulém období hlavní pozornost soustředila na arašidy a z nich připravené výrobky, které představovaly hlavní rostlinný materiál kontaminovaný již zmíněným druhem plísní a jeho toxickými metabolity, v současné době řada autorů zjišťuje, že v různých oblastech a zemích jsou touto plísní a jejími toxiny kontaminovány i jiné potraviny a krmiva, například obilniny, zeleninové, ovocné, masné a mléčné produkty aj. (Alcroft aj., 1961; Bean aj., 1972; Frank, 1966; Juszkiewicz aj., 1967; Kiermeier a Rumpf, 1975; Krogh aj., 1973; Lillehoj a Fennell, 1975 aj.).

Tato dost četná zjištění svědčí o tom, že aflatoxiny produkující kmeny plísně *Aspergillus flavus* jsou již značně rozšířené a jsou schopné infikovat zejména substráty rostlinného i živočišného původu narušené

nevhodnou manipulací a technologií. Tím se v ještě větší míře než dosud stávají zdrojem toxicity a kancerogenity pro konzumenty, to jest pro člověka a hospodářská zvířata (Frank, 1974; Hanssen, 1971; Wogan, 1966).

Popsané okolnosti nás vedly k tomu, že jsme věnovali zvýšenou pozornost onemocnění prasnic ve velkochovu Sdruženého družstevního podniku Šebetov. Toto onemocnění bylo na základě klinického, patologicko-anatomického a zejména toxikologického nálezu diagnostikováno jako aflatoxikóza (Piskač aj., 1976). Proto jsme podrobili používané krmivo mykologickému a toxikologickému sledování a u zachycených plísni jsme zjišťovali přítomnost aflatoxinu B₁. Tento mykotoxin jsme potom izolovali a ověřili jsme jeho fyzikálně chemickou charakteristiku.

METODA

V průběhu jarních měsíců roku 1975 uhynulo v SDP Šebetov několik prasnic, vždy v období krátce před porodem, či po něm. Onemocnění, jež bylo z klinického hlediska provázeno symptomy vážné dyspepsie, spojené s defekací černohnědého trusu, dále pak apatie až somnolence, anémie s ikterizací sliznic a kůže a změnami v postojích končetin a držení hlavy, mělo ve sledovaném období akutní, mnohdy i apoplektický průběh. Patologicko-anatomický a histologický nález byl nejvýraznější na digestivním aparátu a játrech, kde spolu s charakteristickým obrazem hemoragického syndromu byla shledána jak makroskopicky, tak i mikroskopicky výrazná parenchymatózní degenerace jaterní tkáně spolu s nálezem četných proliferací žlučovodů. Vzorek jater uhynulých zvířat byl podroben toxikologické analýze zaměřené na průkaz aflatoxinu B₁ nebo jeho metabolitů. Výsledek analýzy byl pozitivní (Piskač aj., 1976).

V námi odebraných a sledovaných vzorcích krmiva pak byly běžnou kultivační technikou získány směsné kultury plísni (Raper a Fennell, 1965), v nichž rozbořem bylo zjištěno až 80% zastoupení plísně *Aspergillus flavus*. Tato plíseň byla izolována na Sabouraudově agaru a identifikována laskavostí dr. Fasatiové z Botanického ústavu Univerzity Karlovy v Praze jako *Aspergillus flavus* – *oryzae*.

Takto izolovaný a identifikovaný kmen byl pro další experimentální práci pomnožen na trojím substrátu: na Sabouraudově agaru v Petriho miskách, na Meyerově tekutém mediu v Erlenmayerových baňkách a na sterilních, fyziologickém roztokem navlhčených dietních sucharech postupem podle Kusáka aj. Po 14 až 25denní inkubaci, a to u kultur na Sabouraudově agaru a Meyerově mediu při teplotě 30 °C, u kultur na sucharech při teplotě laboratoře, byl materiál podroben opakované extrakci chloroformem (Rodricks, 1968, Zapletal aj., 1973). Získaný extrakt byl vakuově odpařen v rotačním odpařovači a takto získaný hrubý extrakt byl používán k další experimentální práci.

Aflatoxiny hrubého extraktu byly purifikovány a separovány chromatografií na tenké vrstvě silikagelu postupem uvedeným Piskačem a Mertlíkem (1971) a Zapletalem aj. (1973). Při této práci byly použité chromatografické desky připravené nanesením silikagelu „Kie-

selgel G Merck“ na skleněné plotny. Jako vyvíjející soustava byla použita směs rozpouštědel o složení metanol/chloroform (v poměru 7/93 obj. dílů) – (Piskač aj., 1975).

Chromatograficky izolované metabolity byly identifikovány jednak *in situ*, jednak na základě hodnocení R_f faktorů a charakteru fluorescence oddělených skvrn ve srovnání s ověřenými standardy aflatoxinů ve světle ultrafialové lampy opatřené filtrem pro vlnovou délku 366 nm. Skvrny izolovaných metabolitů byly potom ověřeny diferenčním postřikem 20% kyselinou sírovou (Piskač aj., 1971), po němž skvrny aflatoxinů vykazaly změnu fluorescence z modré a modrozelené na ostré žlutozelenou. Kromě toho byly izolované metabolity po purifikaci opakovanou chromatografií na tenké vrstvě silikagelu sneseny z desek a po převedení do roztoku ve spektrálně čistém a spektrálně fotometricky ověřeném metanolu byly identifikovány postupem podle Nabneye Nesbitta (1965) a Zimy, Zapletala (1970) na základě posouzení jejich spektrálně fotometrické charakteristiky v ultrafialové a viditelné oblasti světla na přístroji Specord UV-VIS.

Části extraktu kultury sledovaného kmene plísně *Aspergillus flavus* bylo použito i k biologickému experimentu na bílých myších a na selatech. Pokusným zvířatům bylo – po odpaření rozpouštědla – podáno krmivo nasycené hrubým extraktem z kultury sledované plísně *Aspergillus flavus*. Pokusná zvířata, tj. bílé myši a prasata o hmotnosti 34 kg, byla před nasazením do pokusu klinicky vyšetřena a byl ověřen jejich zdravotní stav (u prasat byly zjištěny výchozí hodnoty některých biochemických ukazatelů – aktivity enzymatických systémů GOT, GPT, LDH, alkalické fosfatázy, hladiny bilirubinu a celkové bílkoviny). Během pokusu pak byl sledován rovněž klinický stav zvířat a hodnoty uvedených ukazatelů. Uhynulá zvířata, popřípadě i zvířata utracená a odporažená po třiceti dnech trvání pokusu, byla patologicko-anatomicky vyšetřena a jejich orgány, zejména játra, byly vyšetřeny také histologicky.

VÝSLEDKY

RŮST PLÍSNĚ

Při kultivaci na Sabouraudově agaru i na Meyerově mediu a zvlhčených dietních sucharech vykazoval kmen s pracovním názvem *Aspergillus flavus* (zv. „Šebetov“) velmi rychlý a intenzivní růst. Během 72 hodin po inokulaci spór na kultivační substrát, ať už při teplotě laboratoře (kultury pěstované na sterilních zvlhčených dietních sucharech), nebo v termostatu při teplotě 30 °C (kultury na Meyerově mediu a Sabouraudově agaru), všechny kultury velmi intenzivně rostly a vzápětí, v rozmezí 96 až 120 hodin po inokulaci, došlo v souvislosti s tvorbou konidií k jejich postupnému barevnému přechodu z barvy bílé na žlutozelenou. Potom se žlutozelená barva kolonií změnila na sépiově hnědou; proces byl ukončen do osmého dne po inokulaci, tj. do 192 hodin. Proti běžným laboratorním kmenům plísně *Aspergillus flavus*, např. IMI 89717, IMI 89417, námi sledovaný kmen zv. „Šebetov“ vykazoval růst podstatně intenzivnější. Rovněž jednotlivá stadia vývoje plísně ve srovnání s kmeny laboratorními probíhala v kratších intervalech.

CHROMATOGRAFICKÁ CHARAKTERISTIKA METABOLITŮ PLÍSNĚ ASPERGILLUS FLAVUS (ZV. „ŠEBETOV“)

Při separaci metabolitů z hrubého extraktu kultur pěstovaných na Sabouraudově agaru a Meyerově mediu byla izolována jako hlavní zelenomodře fluoreskující složka o hodnotě R_f 0,82. Při jejím spodním okraji však byla patrná tmavě modrá skvrna o hodnotě R_f 0,76, ovšem uvedenou zelenomodrou skvrnou podstatně překrytá. Další separace metabolitů získaných z hrubého extraktu kultur pěstovaných na těchto dvou mediích, tj. na Sabouraudově agaru a Meyerově mediu, byla velmi obtížná vzhledem k tomu, že zelenomodrá skvrna, jejíž hlavní součástí – jak předpokládáme – jsou barevné pigmenty a látky aflatoxinům podobné, rušivě působila i při opakovaných chromatografických separacích.

Jestliže jsme však podrobili stejnému separačnímu postupu hrubý extrakt kultury, která byla pěstována na dietních sucharech, byla situace snazší o to, že zmíněné rušivé vlivy vedlejších složek v tomto hrubém extraktu byly minoritní a na chromatogramu bylo již možné odlišit i další modře fluoreskující skvrny. Z nich jsme se v další práci zaměřili na tmavě modře fluoreskující skvrnu o hodnotě R_f 0,76, shodnou svou fluorescencí i hodnotou R_f s použitým vnitřním i vnějším standardem aflatoxinu B_1 . Na základě těchto zjištění jsme čtyřikrát až šestkrát opakovanou chromatografií na tenké vrstvě silikagelu separovali a purifikovali hrubý extrakt kultury na dietních sucharech, až jsme získali zmíněný metabolit řádně oddělený a čistý. Takto připravený extrakt jsme znovu chromatografovali v přítomnosti svědka, spektrálně čistého aflatoxinu B_1 (výrobce Calbiochem). Ověřením charakteru fluorescence a shodné hodnoty R_f jsme zjistili shodu chromatografické i fluorescenční charakteristiky sledovaného metabolitu o R_f = 0,76 se standardním aflatoxinem B_1 . Tuto vlastnost jsme dále potvrdili i tím, že po postříku chromatogramu 20% kyselinou sírovou jak skvrna izolovaného metabolitu, tak i skvrna standardu B_1 shodně změnily tmavě modrou barvu fluorescence na jasně žlutou (obr. 1).

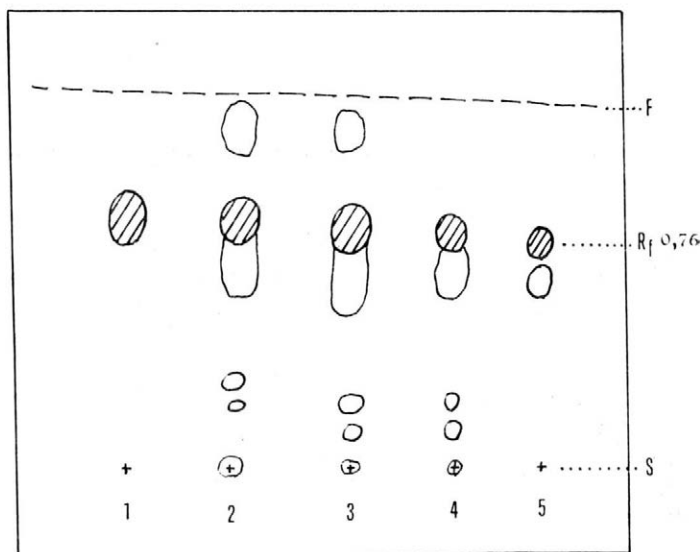
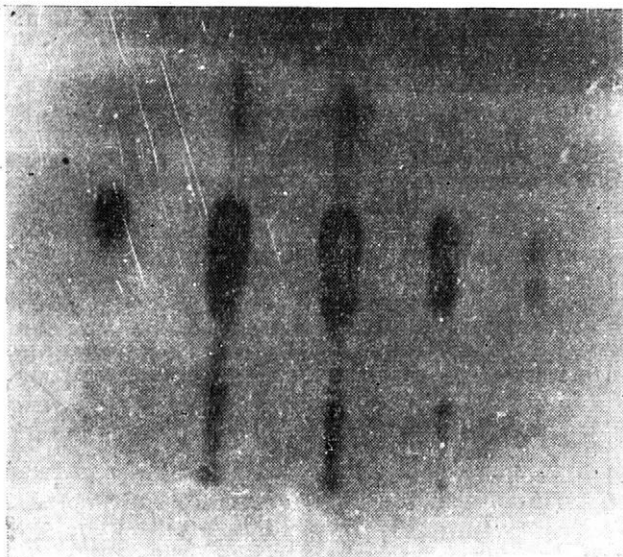
CHARAKTERISTIKA SPEKTRÁLNĚ-FOTOMETRICKÁ

Opakovanou, až šestinásobnou purifikací a separací pomocí chromatografie na tenké vrstvě silikagelu, zaměřenou na izolaci tmavě modře fluoreskujícího metabolitu o R_f 0,76 (který jsme na základě uvedených zjištění předběžně považovali za aflatoxin B_1), jsme dosáhli jeho očištění od ostatních rušivých látek. V tomto stadiu jsme vzorek z chromatogramu převedli do spektrálně čistého metanolu a podrobili spektrálně fotometrickému měření v ultrafialové a viditelné oblasti světla. Měřením proti spektrálně čistému metanolu jsme získali charakteristickou křivku (obr. 2), na které jsou patrná velmi výrazná maxima absorpce při vlnové délce 266 a 366 nm, která jsou považována za charakteristická pro spektrální křivku aflatoxinu B_1 .

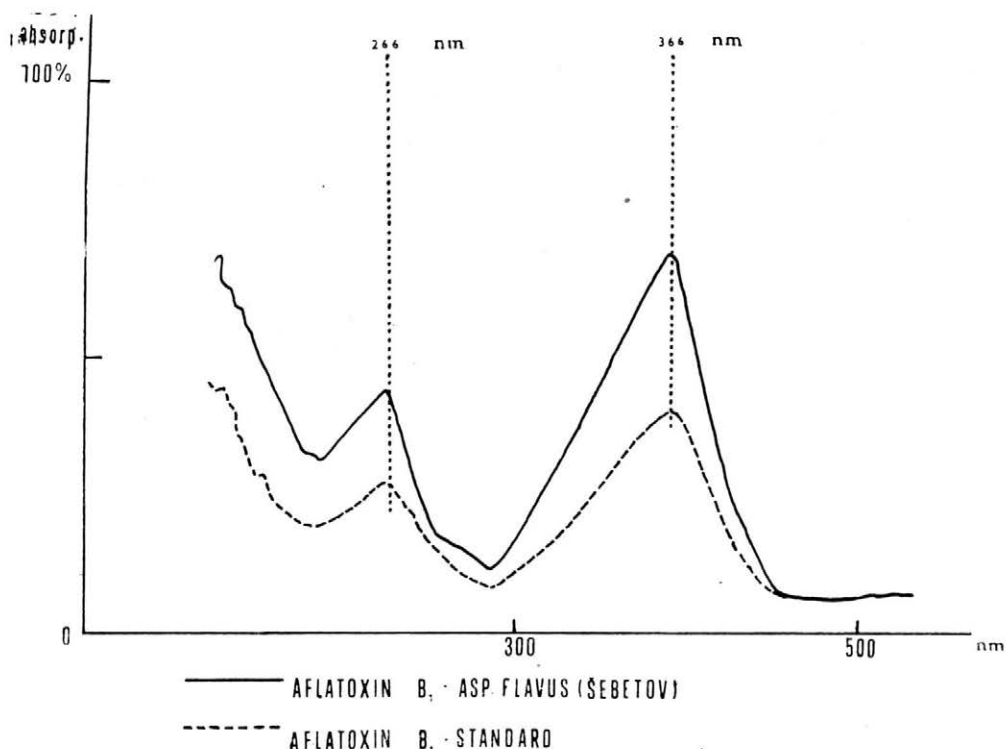
BIOLOGICKÝ POKUS

Vzhledem k tomu, že sledovaný kmen plísně *Aspergillus flavus* (zv. „Šebetov“), zachycený v krmivu určeném pro prasata, byl příčinou onemocnění a úhynu prasnic, v jejichž játrech byla prokázána přítomnost

1 — standardní aflatoxin
vaných metabolitů (fo-
tografie při UV světle):
1 — standardní aflatoxin
B₁ ($R_f = 0,76$), 2 — hr-
bý extrakt kultury plís-
ně s obsahem aflatoxinu
B₁ ($R_f = 0,76$), 3, 4, 5 —
tentýž hrubý extrakt ře-
dění 10X, 100X, 1000X



aflatoxinu B₁ a jeho metabolitů, byl biologický pokus proveden rovněž na prasatech. Dvěma vepřům o hmotnosti 34 kg byl podán po odpaření roz-pouštědla hrubý extrakt kultury sledované plísně s přibližným obsahem 750 μ g aflatoxinu B₁, ověřeného dříve uvedeným způsobem. U pokusných zvířat nebyly po příjmu kontaminovaného krmiva pozorovány závažné změny zdravotního stavu, s výjimkou lehké inapetence, krátkodobého zvýšení tělesné teploty a nevýrazných změn v aktivitě některých enzy-matických systémů (Piskač aj., 1976). Po čtyřech týdnech trvání ex-perimentu byla zvířata kontrolně odpořazena. Nejvýraznější patologicko-anatomické změny byly shledány na játrech, na kterých byla makroskopicky patrná dost četná ložisková nekrotizace, histologickým vyšetřením pak



2. Spektrální křivka izolovaného čistého aflatoxinu B₁ ve srovnání s křivkou standardního aflatoxinu B₁

byla zjištěna značná proliferace žlučových, spojená s celulizací portobiliárních prostorů, tvořenou převážně histiocyty, fibroblasty a lymfocyty. Ložiska buněčné infiltrace byla expandována do některých lalůčků, ve kterých došlo i k nekrotizaci jaterní tkáně, spojené s pyknózou jader hepatocytů (Piskač aj., 1976).

Bílým myším byl hrubý extrakt téže plísňové kultury podán obdobným způsobem. Ze skupiny deseti pokusných myší pět uhynulo pátého dne po podání krmiva s hrubým extraktem, pět bylo utraceno po čtyřech týdnech trvání experimentu. Histologickým vyšetřením jater uhynulých a utracených myší byl shledán nález obdobný tomu, který byl zjištěn u pokusných prasat, s tím rozdílem, že v játrech myší byly zjištěny intenzivnější změny v proliferaci žlučových.

Patologicko-anatomické a histologické nálezy u pokusných zvířat byly shodné u uhynulých prasnic sledovaného zemědělského závodu. Rozdíl byl v tom, že v játrech pokusných zvířat byly vyvolané změny mnohem výrazněji patrné.

DISKUSE

V publikaci popsané zachycení a toxikologická charakteristika kmene plísně *Aspergillus flavus* (zv. „Šebetov“) bylo signalizováno výskytem onemocnění a úhynu prasnic ve Sdruženém družstevním podniku (Piskač aj., 1976). Komplexním posouzením celého případu, to jest klinickým, patologicko-anatomickým a histologickým vyšetřením, die-

tetickým rozbořem krmiva a toxikologickým rozbořem krmiva a biologického materiálu z uhynulých zvířat, vyplynulo, že příčinou onemocnění je přítomnost atafloxinu v použitém krmivu. Ovšem vlastním rozbořem daného krmiva bylo zjištěno, že dovážené rostlinné materiály, které bývají různými autory uváděny jako hlavní zdroj aflatoxinů ve výživě zvířat (Piskač aj., 1976; Jacquet aj., 1970; Kraybill, 1969), jsou v tomto krmivu přítomny pouze v nevýrazném množství, ale že se jedná o krmivo obsahující převážně komponenty tuzemské, z větší části vyrobené přímo v zemědělském závodě. Přímý důkaz přítomnosti aflatoxinů ve vyšetřovaném krmivu, jako nutný předpoklad komplexního průkazu aflatoxikózy (Piskač aj., 1971), byl velmi znesnadněn přítomností látek extrahovaných do používaných organických rozpouštědel. Jsou to látky, které při chromatografické separaci a purifikaci působily natolik rušivě, že výsledky toxikologického vyšetření krmiva byly velmi sporé. Tyto zjištěné barevně fluoreskující skvrny již popsali zejména Yokotsuka aj. (1967), kteří je označili za složky „aflatoxinům podobné“, které jsou některými kmeny plísně *Aspergillus flavus* produkovány a jsou od aflatoxinů odlišitelné rozdílnými fyzikálně chemickými vlastnostmi a biologickým účinkem (Kirksey a Cole, 1974). V našem případě pak bylo při použití ověřených metod separace a purifikace aflatoxinů (Zapletal aj., 1970; Piskač aj., 1971) možné odlišit „aflatoxinům podobné složky“ od vlastních aflatoxinů produkováných sledovaným kmenem až tehdy, když plíseň byla z krmiva izolována a předpěstována v čisté kultuře na laboratorních médiích (Sabouraudově agaru, Meyerově mediu a dietních sucharech). Z těchto kultur, zejména z kultury na sucharech, byly získány hrubé extrakty, které sice ony „aflatoxinům podobné látky“ obsahovaly, ovšem v míře tak nízké, že již umožňovala jejich oddělení v takovém rozsahu, aby bylo možné získat aflatoxin B₁, identifikovatelný jak na základě chromatografických vlastností, tak i na základě jeho charakteristické fluorescence a její změny při diferenciacním postřiku 20% kyselinou sírovou a zejména pak na základě spektrální křivky s charakteristickými maximy absorpce při 266 a 366 nm vlnové délky (Piskač aj., 1971; Zima, Zapletal, 1970; Zapletal, Zima, 1970).

Toto zjištění pak bylo ještě potvrzeno charakteristickým patologicko-anatomickým a histologickým nálezem u použitých pokusných zvířat, který byl shodný s nálezem u uhynulých prasnic sledovaného zemědělského podniku (Piskač aj., 1976).

Zjištěné údaje vedou k předpokladu, že k průkazu aflatoxikózy hospodářských zvířat je nutné komplexně zpracovat podklady klinického nálezu, patologicko-anatomického a histologického vyšetření a toxikologického vyšetření použitého krmiva i biologického materiálu z uhynulých zvířat. V případě, že výsledky klinického, patologicko-anatomického a histologického a toxikologického vyšetření biologického materiálu dávají důvodný předpoklad k diagnóze aflatoxikózy, ale vyšetření daného krmiva je dubiozní či nezřetelné právě v důsledku působení rušivých extrahovatelných látek podobného typu, je nutné sledované krmivo vyšetřit také mykologicky. Mykologické vyšetření krmiva je třeba spojit i s ověřením toxinogenity izolovaného kmene plísně *Aspergillus flavus* a toto ověření doplnit nezbytnou identifikací získaného mykotoxinu chromatografií na tenké vrstvě silikagelu, stanovením jeho spektrálně fotometrických vlastností a posléze i biologickým pokusem.

Literatura

- ALLCROFT, R. — CARNAGHAN, R. B. A. — SEARGEANT, K. — O'KELLY, J.: A toxic factor in Brazilian groundnut meal. *Vet. Rec.*, 73, 1961, s. 428-429.
- BEAN, A. G. — SCHILLINGER, A. J. — KLARMAN, L. W.: Occurrence of aflatoxins and aflatoxin-producing strains of *Aspergillus* sp. in soybeans. *Appl. Microbiol.*, 24, 1972, s. 437-439.
- FRANK, H. K.: Aflatoxinen in Lebensmitteln. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 17, 1966, s. 237-242.
- FRANK, H. K.: Das Mykotoxinproblem bei Lebensmitteln und Getränken. *Zentbl. Bakt. Hyg.*, I/B, 159, 1974, s. 324-334.
- HANSSEN, E.: Über Aflatoxine. *Med. Ernähr.*, 12, 1971, s. 249-259.
- JACQUET, J. — BOUTIBONNES, P. — TÉHÉRANI, A.: Fréquence actuelle des flavatoxines dans les aliments du bétail. *Acad. d'Agric. Fr., Extr. an. proc. verb.*, 1970, s. 187-200.
- JUSZKIEWICZ, T. — STEC, J. — STEFANIAK, B. — RAKALSKA, Z. — MADEJSKI, Z.: Biochemical and pathological effects of aflatoxin poisoning in ducklings. *Vet. Rec.*, 1967, (cit. PISKAČ, A. aj., 1975).
- KIERMEIER, F. — RUMPF, S.: Behaviour of aflatoxin during production of processed cheese. *Z. Lebensmittelunters. Forsch.*, 157, 1975, s. 211-216.
- KIRKSEY, J. W. — COLE, R. J.: Screening for toxin-producing fungi. *Mycopath. Mycol. appl.*, 54, 1974, s. 291-296.
- KRAYBILL, H. K.: Review of the toxicology and epidemiology of mycotoxins. *Trop. Geogr. Med.*, 21, 1969, s. 1-18.
- KROGH, P. — HALD, B. — HASSELAGER, E. A. — CAMPBELL, A. D.: Aflatoxin residues in bacon pigs. *Pure Appl. Chem.*, 35, 1973, s. 275-281.
- LILLEHOJ, E. B. — FENNEL, D. I.: Fungi and aflatoxin in a bin of stored white maize. *J. Stor. Prod. Res.*, 11, 1975, s. 47-51.
- NABNEY, J. — NESBITT, B. F.: A spectrophotometric method for determining the aflatoxins. *Analyst, Lond.*, 90, 1965, s. 155-160.
- PISKAČ, A. — MERTLÍK, J. — ZAPLETAL, O. — ZIMA, S. — KRÍŽ, H.: Chemický průkaz aflatoxinu a sledování jeho účinku na metabolismus zvířat. [Závěrečná zpráva.] Brno 1971. — Vysoká škola veterinární.
- PISKAČ, A. — ZAPLETAL, O. — MALÁ, J.: Sledování účinku a toxicity metabolitů některých plísní na organismus zvířat a jejich metabolické funkce a využití získaných poznatků v diagnostice a prevenci. [Závěrečná zpráva.] Brno 1975 — Vysoká škola veterinární.
- PISKAČ, A. — ZAPLETAL, O. — DRAŽAN, J. ml. — DRAŽAN, J. — JEŘÁBEK, J. — DRÁBEK, L. — ČERNÝ, L. — GROCH, J. — ROŽEK, J.: Záchyt a průkaz aflatoxikózy prasnic ve velkochovu. *Veterinářství*, 26, 1976, s. 120-122.
- RAPER, K. B. — FENNEL, D. I.: The genus *Aspergillus*. William & Wilkins comp., Baltimore 1965.
- RODRICKS, J. V.: Separation and purification of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ and comparison of semi-synthetic aflatoxin B₂ and G₂ with naturally occurring aflatoxins B₂ and G₂. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 46, 1968, s. 149-151.
- WOGAN, G. N.: Chemical, nature and biological effects of the aflatoxins. *Bact. Rev.*, 30, 1960, s. 460-470.
- YOKOTSUKA, T. — SASAKI, M. — KIKUCHI, T. — ASAO, Y. — NOBUHARA, A.: Production of fluorescent compounds other than aflatoxins by Japanese industrial molds. In: MATELES, R. I. — WOGAN, G. N.: *Biochemistry of some foodborne microbial toxins*. M. I. T. Press, 1967.
- ZAPLETAL, O. — KRÍŽ, H. — ZIMA, S.: Qualitative differentiation of aflatoxins and Kurasane in feeding mixtures for poultry, by thin-layer chromatography. *Acta vet.*, Brno, 38, 1969, s. 163-170.
- ZAPLETAL, O. — ZIMA, S.: Některé podmínky tvorby aflatoxinů produktivními kmeny plísně *Aspergillus flavus*. *Vet. Med., Praha*, 15, 1970, č. 9, s. 529-534.
- ZAPLETAL, O. — KOBR, K. — STANĚK, J. — PISKAČ, A.: Evaluation of the

methods of extraction, purification and separation of aflatoxins B₁ and G₁ for their quantitative determinations in feed and feeding mixtures. Acta vet., Brno, 42, 1973, s. 185-194.

ZIMA, S. — ZAPLETAL, O.: Některé faktory ovlivňující kvantitativní stanovení aflatoxinů spektrální fotometrií. Vet. Med., Praha, 15, 1970, č. 9, s. 535-543.

Došlo dne 15. 1. 1976

ZAPLETAL O., PISKAČ A., MALÁ J., DRAŽAN J. jun. (Veterinárny institút, Brno, Československo). Izolácia toxigenného kmeňa húb *Aspergillus flavus* a charakteristika produkovaných toxínov. Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 321-330, 1976.

Авторы описывают выявление продукции афлатоксинов В₁ при помощи штамма гриба *Aspergillus flavus*, который был обнаружен на кормовом зерне весной 1975 года. Кроме способности продукции этого микотоксина, этот штамм гриба, по сравнению с лабораторными штаммами *Aspergillus flavus*, отличался очень быстрым и интенсивным ростом и развитием. Полученный и изолированный афлатоксин В₁ можно было хроматографически и спектрально-фотометрически идентифицировать только тогда, когда штамм гриба был культивирован на подходящем субстрате, где в минимальной мере продуцировал мешающие флуоресцирующие второстепенные метаболиты. Этот факт вел авторов к заключению, что в некоторых случаях, кроме до сих пор классически применяемого способа диагностики афлатоксикозов, необходимо требовать и изоляции найденного штамма *Aspergillus flavus*, а после его пересева в чистых культурах в подходящих средах, потом определять продукцию афлатоксинов, связанную с их физическо-химической идентификацией.

афлатоксины; токсигенность грибов; мешающие продукты; комплексная диагностика; изолирование штамма; *Aspergillus flavus*

ZAPLETAL O., PISKAČ A., MALÁ J., DRAŽAN J. jun. (University of Veterinary Medicine, Brno, Czechoslovakia). Isolation of the Toxicogenic Strain of the Fungus *Aspergillus flavus* and Characteristics of the Produced Aflatoxins. Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 321-330, 1976.

The authors demonstrate the production of the B₁ aflatoxin by means of a strain of the fungus *Aspergillus flavus* which was captured on cereal feed in spring 1975. Besides the production of the mycotoxin, this fungus strain showed a very quick and intensive growth and development, in comparison with the laboratory strains of *Aspergillus flavus*. The obtained and isolated aflatoxin B₁ could be identified by chromatography and spectral photometry only when the fungus strain was cultivated on a suitable substrate where it showed the lowest production of the disturbing fluorescent metabolism by-products. That finding led to the conclusion that in some cases it is necessary, besides the classically used procedure of the diagnosis of aflatoxicosis, to require also the isolation of the possibly present strain of *Aspergillus flavus* and — after its recultivation in pure cultures on suitable media — the determination of aflatoxin production connected with their physical and chemical identification.

aflatoxins; toxicogenicity of fungus; disturbing products; complex diagnosis; strain isolation; *Aspergillus flavus*

ZAPLETAL O., PISKAČ A., MALÁ J., DRAŽAN J. jun. (Veterinärmedizinische Hochschule, Brno, Tschechoslowakei). Isolierung eines toxigenen Stammes des Schimmelpilzes *Aspergillus flavus* und Charakteristik der produzierten Aflatoxine. Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 321-330, 1976.

Die Autoren beschreiben den Nachweis der Produktion des B₁-Aflatoxins durch einen *Aspergillus-flavus*-Stamm, der auf Zerealfutter im Frühjahr 1975 vorgetroffen wurde. Außer der Fähigkeit Mykotoxin zu produzieren wies dieser Schimmelpilzstamm im Vergleich zu den *Aspergillus-flavus*-Laborstämmen ein sehr schnelles und intensives Wachstum und Entwicklung auf. Das gewonnene und isolierte B₁-Aflatoxin konnte erst dann chromatographisch und spektralphotometrisch identi-

fiziert werden, wenn der Schimmelpilzstamm auf geeignetem Substrat kultiviert wurde, wo er im geringsten Maß störende, fluoreszierende Nebenmetaboliten produzierte. Diese Erkenntnis führte die Autoren zur Schlußfolgerung, daß es in einigen Fällen nötig ist, außer dem bisher benutzten klassischen Vorgang bei der Diagnostik von Aflatoxikosen auch die Isolierung des eventuell auftretenden *Aspergillus-flavus*-Stammes zu verwirklichen und nach dessen Umkultivierung auf Reinkulturen auf geeigneten Medien die Produktion von Aflatoxinen in Verbindung mit deren physikalisch chemischen Identifikation zu ermitteln.

Aflatoxine; Toxigenität des Schimmelpilzes; störende Produkte; komplexe Diagnostik; Isolierung des Stammes; *Aspergillus flavus*

Adresa autorů:

MVDr. O. Zapletal, CSc., doc. MVDr. A. Piskač, CSc., ing. J. Malá, J. Dražan ml., Vysoká škola veterinární, Palackého 1-3, 612 42 Brno

REZIDUA PERCHLÓRETYLÉNU A BENZÍNU V KAFILÉRNÍCH TUCÍCH A MOUČKÁCH PRO KRMNÉ ÚČELY

I. Ingr

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

INGR I. *Rezidua perchlóretylénu a benzínu v kafilerních tucích a moučkách pro krmné účely.* Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 331-341, 1976.

Byly vypracovány metody důkazu a stanovení reziduí perchlóretylénu a benzínu v kafilerních tucích a moučkách určených pro krmné účely. Metody jsou založeny na odběru par extrahovadel nad vzorky kafilerních produktů a na jejich identifikaci a stanovení plynovou chromatografií. Mez detekovatelnosti perchlóretylénu je za podmínek metody 0,05 %, benzínu 0,01 % (hmotnostních), přičemž úpravou podmínek lze obě meze snížit. Reprodukovatelnost výsledků při prakticky se vyskytujících koncentracích reziduí ve výrobcích je charakterizována hodnotou variačního koeficientu 2,79 (perchlóretylén) a 6,05 (benzín). Vlastní analýza jednoho vzorku trvá maximálně pět minut. Ve všech vzorcích současně vyráběných kafilerních tuků a mouček byla rezidua extrahovadel prokázána a jejich obsah byl u kafilerních tuků značný a velmi variabilní, u masokostních mouček z benzínové extrakce byla zjišťována jen stopová množství. Doporučuje se využít předložených analytických metod k důsledné a pravidelné objektivní kontrole reziduí extrahovadel v kafilerních produktech určených ke krmným účelům.

plynová chromatografie; metoda head-space; kvalitativní a kvantitativní analýza

Výrobky veterinárních asanačních ústavů – kafilerní masokostní moučky a kafilerní tuky – jsou v současné době a jistě zůstanou i v budoucnu významným vkladem do centrálního fondu krmiv. Aby mohly být kafilerní produkty racionálně využívány ve výživě hospodářských zvířat, musí vyhovovat několika požadavkům, m. j. musí být pro zvířata zdravotně nezávadné, musí být smyslově přijatelné, aby je zvířata byla ochotna přijímat, nesmí negativně ovlivňovat růstové a produkční schopnosti zvířat a nesmí negativně ovlivňovat jakost jatečných produktů. Veterinární asanační ústavy přecházejí od mechanických způsobů oddělování tuků k efektivnějším metodám extrakce organickými rozpouštědly. Z toho plyne řada problémů spojených s využitím kafilerních produktů ve výživě hospodářských zvířat – možná přítomnost reziduí extrahovadel ve výrobcích, možnost negativního ovlivnění sensorických vlastností výrobků převzetím pachu použitého rozpouštědla, možnost negativního ovlivnění zdraví a intenzity růstu zvířat, možnost negativního ovlivnění sensorických vlastností masa a tuku jatečných zvířat.

V našich podmínkách se používá k získávání kafilerního tuku dvou

druhů organických rozpouštědel – perchlóretylénu a benzínu. Předností perchlóretylénu je jeho nehořlavost a nevýbušnost, a tedy bezpečnost práce při jeho použití. Nevýhodou je poměrně vysoká cena, vysoký bod varu, a tedy obtížnost a časová i energetická náročnost při jeho odstraňování z kafilerních produktů. Extrakční benzín je těkavější a tím snadněji odstranitelný z výrobků, je levnější, ale jeho velkou nevýhodou je hořlavost a explozivnost, což klade vysoké nároky na bezpečnostní opatření ve výrobě.

O účincích perchlóretylénu na organismus známe poměrně málo. Podle Lazareva (1959) působí perchlóretylén jako narkotikum a patrně nevyvolává tukovou infiltraci parenchymatózních orgánů. O nejbližším chlórovaném uhlovodíku trichlóretylénu uvádí Roslanowski (1973), že je silně narkotický a že silně působí na ústřední nervový systém a na zrakové orgány. Weigert (1975) připisuje trichlóretylénu narkotické účinky. Extrakční benzín je směs uhlovodíků parafinické řady, obsahující i určité množství izosloučenin. Toxicita parafinických uhlovodíků je minimální a klesá s klesajícím počtem uhlovodíků v řetězci (Zajíc aj., 1967). Přítomností reziduí perchlóretylénu a benzínu v kafilerních produktech a jejich důsledky na zdraví a růst zvířat a na jakost živočišných produktů se v dostupné literatuře zatím nikdo, až na několik málo výjimek, nezabýval. Chlopková aj., (1975)) zjistili, že přídavek kafilerního tuku v množství 5 % a s obsahem 0,45 % perchlóretylénu do krmných dávek pro prasata neovlivnil negativně zdraví a růst zvířat, ani senzorické vlastnosti jejich masa a tuku. Při ověřování množství zkrmování kostního tuku získaného benzínovou extrakcí bylo zjištěno (Najman aj., 1968, 1970; Ingr aj., 1970), že 5% přídavek kostního tuku, obsahující 0,14 % benzínu, do krmných dávek prasat a kuřat nezhoršil jejich zdravotní stav, intenzitu růstu ani senzorickou jakost jatečných produktů.

V zásadě ie však třeba považovat perchlóretylén a benzín za nežádoucí cizorodé látky a uvedená příznivá zjištění nelze považovat za absolutně platná. Problematicke je třeba věnovat zvýšenou pozornost zejména proto, že vedle masokostních mouček se od roku 1974 stal i kalierní tuk součástí centrálního fondu krmiv, podíl kafilerních tuků získaných extrakcí organickými rozpouštědly se zvyšuje, hladina rozpouštědel ve výrobcích není objektivně sledována a že zemědělská praxe poukazuje u těchto produktů na pach po extrahovadlech. Je proto velmi žádoucí hladinu extrahovadel v kafilerních produktech objektivně a pravidelně sledovat. Nelze podcenit ani ekonomické ztráty způsobené únikem perchlóretylénu s kafilerním tukem.

Zjišťování přítomnosti a obsahu perchlóretylénu a benzínu v kafilerních produktech není z analytického hlediska snadnou záležitostí a metody tohoto druhu nebyly v dostupné literatuře uvedeny, poněvadž samotný problém je nový. Rezidua rozpouštědel v tucích pro technické účely byla rafinačními postupy eliminována. Skutečnost, že jde o analýzu předpokládaného malého obsahu tukových rozpouštědel v tucích, vylučuje praktickou použitelnost klasických analytických metod, poněvadž by musel předcházet pracný izolační postup, např. destilace. Vynikající možnosti poskytuje plynová chromatografie a na jejím základě byla vypracována metoda přímé analýzy par nad vzorkem (tzv. „head-space“ metoda)

k důkazu a stanovení extrakčního benzínu v kostním tuku pro krmné účely (Ingr, 1969).

Cílem předložené práce bylo vypracovat na základě posledně citované práce rychlou, objektivní a dostupnou metodu důkazu a stanovení perchlóretylénu v kafilerních výrobcích, a to tak, aby analýza perchlóretylénu a benzínu byla proveditelná za velmi podobných podmínek, tzn. aby jedno kontrolní analytické pracoviště bylo schopno jedním přístrojem kontrolovat oba druhy rozpouštědel. Dalším cílem bylo využít vypracovaných metod ke zjištění přítomnosti a skutečného obsahu reziduí perchlóretylénu a benzínu v současně vyráběných kafilerních tucích a moučkách, a dát tak základ jejich kontroly, aby příspěvek veterinárních asanačních ústavů do centrálního fondu krmiv byl co nejkvalitnější a aby mohlo být těchto produktů racionálně využito ve výživě hospodářských zvířat bez rizika, že bude ohroženo zdraví a růst zvířat a že se zhorší jakost jatečných produktů.

METODA

Základem pro vypracování postupu byla práce Ingr, (1969) o stanovení benzínu v kostním tuku. Metoda je založena na odběru a přímém dávkování par benzínu nad vzorkem tuku do plynového chromatografu. Nezbytným předpokladem správnosti, přesnosti a reprodukovatelnosti výsledků této metody je rovnovážný stav soustavy kapalina – plyn, a to u vzorků standardních a zkoušených. Eliminací ostatních stavových veličin (teplota, tlak, objem nebo hustota) se dosáhne toho, že hmota extrahovaná, jako hledaná veličina, je jedinou proměnnou. Prakticky to znamená použít stejných vzorkovnic (objem i tvar) pro standardní i zkoušené vzorky, dodržet stejnou hmotnost standardů i zkoušených vzorků a uchovávat je při stejných teplotách od přípravy vzorků až k vlastní analýze.

PŘÍPRAVA VZORKŮ

Jako vzorkovnice se nejlépe osvědčily transfúzní láhve NTS o objemu 300 ml. Standardní vzorky tuků se připraví z vepřového sádla, které je dostupné a svými fyzikálními vlastnostmi velmi blízké kafilerním tukům, a perchlóretylénu nebo benzínu používaných k extrakci kafilerních tuků. Podle výsledků předběžných analýz se připraví řada standardů ve vhodném koncentračním rozmezí (v hmotnostních procentech rozpouštědla ve vepřovém sádle). Standardní i zkoušené vzorky se navažují do uvedených vzorkovnic v množství 100 g. Po naplnění vzorků se vzorkovnice velmi šetrně zahřejí, aby vzorky neulpěly na stěnách a aby vytvořily homogenní vrstvu a hladinu. Po samovolném vychlazení na teplotu laboratoře se vzorkovnice uzavrou a ponechají se několik hodin (nejlépe přes noc) stát, aby se ustavil rovnovážný stav mezi rozpouštědlem obsaženým v tuku a jeho parami nad vzorkem. Obdobně se připraví standardní a zkoušené vzorky kafilerních mouček. Pro přípravu standardních vzorků jsou nejvhodnější kafilerní moučky ze závodů, kde se kafilerní tuk odděluje mechanicky, poněvadž jiný materiál ve funkci nosiče nemůže vhodně simulo-

vat fyzikální vlastnosti (velikost částic, struktura, povrch) a složení (obsah tuku, vody, bílkovin) kafilerní moučky.

PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE

Hlavním problémem byla volba stacionární fáze, která by byla vhodná pro obě rozpouštědla. Perchlóretylén (syn. 1,1,2,2-tetrachlóreten; tetrachlóretylén) patří k chlоровaným uhlovodíkům alifatickým, pro které lze použít jako zakotvené fáze silikonových olejů, polyglykolů, trikresylfosfátu, esterů kyseliny ftalové a další. Benzín je směsí parafinických uhlovodíků a možnost volby zakotvené fáze pro jejich plynově chromatografické dělení je ještě širší; k uvedeným fázím je třeba přiřadit zejména skvalan a apiezonový tuk (Purnell, 1966; Dean, 1974). S ohledem na dobrou zkušenost v dřívější práci (Ingr, 1969) a na citované možnosti i pro separaci perchlóretylénu byl zvolen a používán jako zakotvená fáze polyetylenglykoladipát v množství 15 % hmotnosti nosiče. Četné zkoušky potvrdily možnost použití polyetylenglykoladipátu. Bylo ještě třeba vyzkoušet nejvhodnější podmínky vlastní analýzy pro perchlóretylen a benzín. Při stejných průtocích plynů bylo třeba použít rozdílných teplot kolon a citlivosti záznamu. Při použití čs. plynového chromatografu Chrom 2 s plamenoionizačním detektorem se ukázaly jako vhodné tyto podmínky:

náplňová kolona o délce 2550 mm a vnitřním průměru 6 mm; nosič Chromosorb W 60–100 mesh;
zakotvená fáze polyetylenglykoladipát (15 %);
průtoky plynů: dusík 30 ml min.⁻¹, vodík 35 ml min.⁻¹, vzduch 450 ml min.⁻¹;
teplota kolony: 130 °C (perchlóretylén), 110 °C (benzín);
citlivost záznamu: 1 : 200 (perchlóretylén), 1 : 500 (benzín);
rychlost posuvu papíru v zapisovači 5 mm min.⁻¹

Vzorky par nad vzorkem tuku nebo moučky se odebírají injekční stříkačkou o objemu 1 až 5 ml po propíchnutí gumové zátky a dávkuje se do vstřikovací komory přístroje. Podle okolností lze měnit dávkování vzorku nebo citlivost záznamu a výsledek příslušně přepočítat.

VÝSLEDKY A DISKUSE

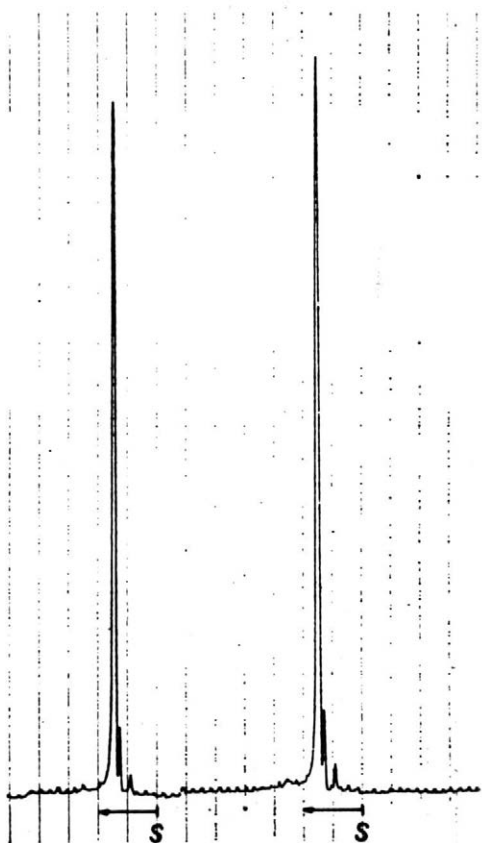
KVALITATIVNÍ ANALÝZA

Přítomnost reziduí perchlóretylénu nebo benzínu v kafilerním tuku nebo v kafilerní moučce se prokáže záznamem chromatografického maxima o stejném elučním čase jako má čisté rozpouštědlo. V daných případech byla identifikace jednoznačná, poněvadž jak u perchlóretylénu (obr. 1, 2 a 6), tak i u benzínu (obr. 4 a 7) bylo zaznamenáno vždy jedno výrazné maximum. V případě perchlóretylénu se u vzorků kafilerního tuku (obr. 6) i v modelových vzorcích (obr. 2) a u čistého perchlóretylénu (obr. 1) sice objevila dvě jiná maxima s kratším elučním časem, ale v relativně malém množství, takže jednoznačnost identifikace perchlóretylénu nebyla ohrožena. V případě čistého perchlóretylénu (obr. 1) mo-

hou obě nevýrazná chromatografická maxima náležet nečistotám, např. méně chlórovanému trichlóretylénu (Šedivec a Flek, 1968), u modelových vzorků (obr. 2) a kafilerního tuku (obr. 6) k nim mohou přistupovat např. oxidační zplodiny tuků. Vzhledem k obtížnosti identifikace těchto neznámých složek a především vzhledem k neúčelnosti této identifikace pro stanovený cíl práce bylo upuštěno od snah identifikovat maxima neznámých látek. V případě, že identifikace hledaného rozpouštědla by nebyla jednoznačná, je třeba použitou metodou stejných elučních časů doplnit metodou několika kolon (různé zakotvené fáze) nebo metodou teplotní závislosti elučních hodnot (Purnell, 1966).

KVANTITATIVNÍ ANALÝZA

Rezidua perchlóretylénu a benzínu v kafilerních výrobcích byla stanovena metodou absolutní kalibrace (Purnell, 1966). Kalibrační grafy byly sestaveny na základě analýz modelových vzorků obsahujících známé množství perchlóretylénu (obr. 2 a 3) nebo benzínu (obr. 4 a 5). Nutnou podmínkou úspěšné analýzy je dodržení konstantní teploty modelových a zkoušených vzorků (nejvhodnější je laboratorní teplota) a bezprostřední časová návaznost analýz zkoušených a modelových vzorků. Obsah rozpouštědel ve vzorcích byl zjišťován měřením výšek chromatografických maxim a odečtením výsledků z kalibračního grafu. Za uvedených podmínek analýzy lze v případě perchlóretylénu spolehlivě detekovat obsah 0,05 %, v případě benzínu 0,01 % (hmotnostních). Přitom lze úpravou podmínek (zvýšením teploty vzorků, zvýšením objemu analyzovaného vzorku par, zvýšením teploty kolony a průtoku nosného plynu, zvýšením citlivosti záznamu) mez detekovatelnosti benzínu ještě výrazně snížit. V případě perchlóretylénu jsou tyto možnosti poněkud menší, poněvadž citlivost záznamu byla již zvýšena, což je patrné z rozdílné kvality záznamů nulové linie (obr. 2 a 4; obr. 6 a 7). Snižování meze detektovatelnosti však není účelné vzhledem ke skutečnému obsahu reziduí a technologických možnostem jejich snížení, jak vyplývá z dalšího.



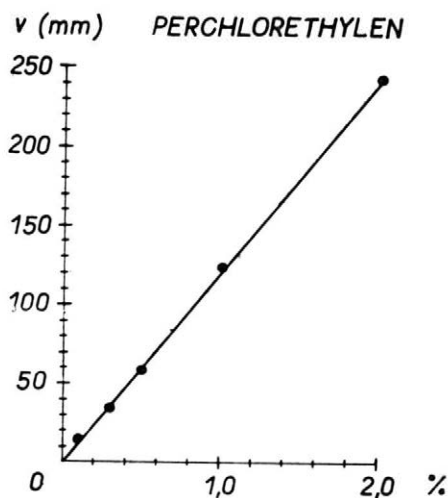
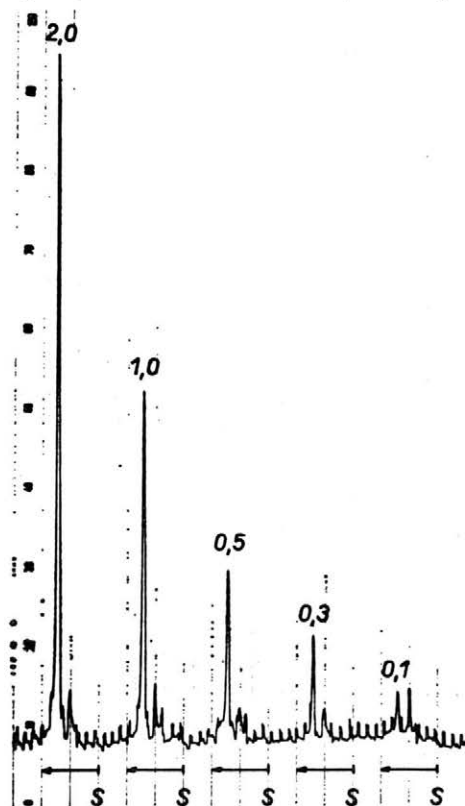
1. Chromatografické eluční křivky perchlóretylénu používaného k extrakci kafilerního tuku
S...start, resp. okamžik vstříku vzorku do přístroje

Přesnost a reprodukovatelnost stanovení perchlóretylénu a benzínu byla ověřena na vzorcích kafilerních tuků paralelními analýzami:

	perchlóretylén	benzín
počet paralelních analýz n	6	6
průměrná hodnota $\bar{x}$	1,380 %	0,180 %
střední chyba průměru $s\bar{x}$	0,015 %	0,001 %
směrodatná odchylka s	0,038 %	0,010 %
variační koeficient V (%)	2,79 %	6,05

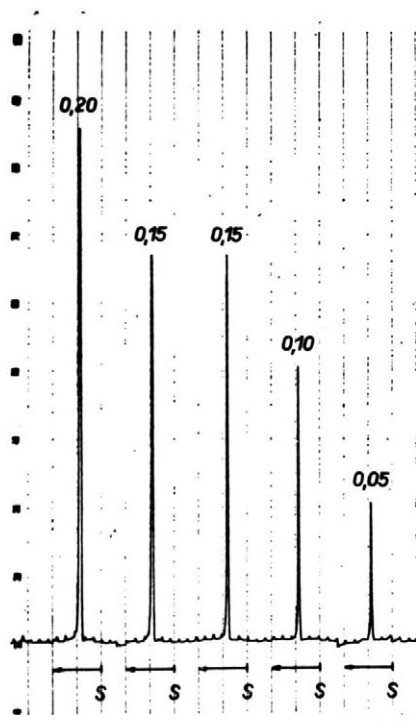
Uvedené parametry metod jsou velmi dobré a pro daný účel zcela vyhovující. Hodnota variačního koeficientu (nověji označováno jako relativní směrodatná odchylka s_r) je do jisté míry nepřímě úměrná obsahu hledané látky; v případě kafilerních mouček, ve kterých je hladina reziduí nižší, je třeba očekávat vyšší hodnoty variačních koeficientů. V dřívější práci (Ingr, 1969) bylo dosaženo při stanovení reziduí benzínu obdobné reprodukovatelnosti ($V = 6,78$). Hlavním zdrojem chyb jsou zřejmě nepřesnosti při odměřování objemu par pro analýzu.

Za uvedených podmínek analýzy byl eluční čas perchlóretylénu asi 180 sekund, benzínu asi 120 sekund. To znamená, že vlastní analýza jednoho vzorku kafilerního produktu včetně predehřátí vstřikovací komůrky nepřesáhne dobu 5 minut, což spolu s uvedenými parametry je přesvěd-

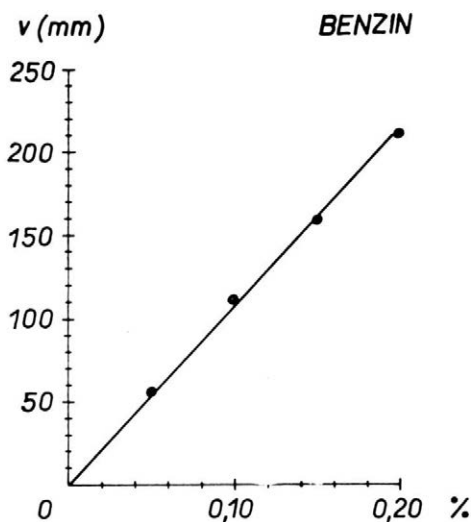


2. Analýza modelových vzorků tuku se standardním obsahem perchlóretylénu (hmotnostní %)

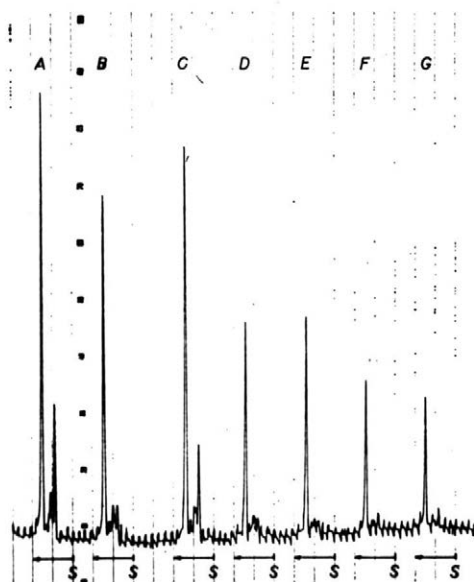
3. Kalibrační graf pro zjištění obsahu perchlóretylénu v kafilerních tucích



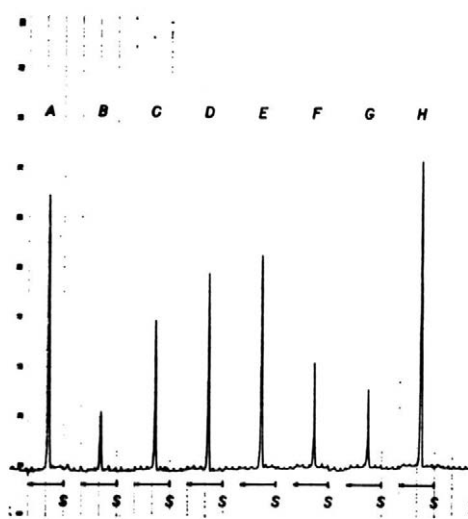
4. Analýza modelových vzorků tuku se standardním obsahem benzínu (hmotnostní %)



5. Kalibrační graf pro zjištění obsahu benzínu v kafilerních tucích



6. Záznam chromatografické analýzy sedmi vzorků kafilerního tuku z perchlóretylénové extrakce



7. Záznam chromatografické analýzy osmi vzorků kafilerního tuku z benzínové extrakce

čivým dokladem vhodnosti plynově chromatografické metody pro daný účel.

OBSAH REZIDUÍ PERCHLÓRETYLÉNU A BENZÍNU V SOUČASNĚ VYRÁBĚNÝCH KAFILERNÍCH PRODUKTECH

V kafilerních tucích získaných perchlóretylénovou extrakcí v závodě M. byl zjišťován obsah reziduí perchlóretylénu, v některých vzorcích až několik hmotnostních procent, přičemž variabilita obsahu byla značná. Po zjištění této skutečnosti a po zavedení technologických a organizačních opatření ve výrobě byly odebrány kontrolní vzorky kafilerního tuku při různých teplotách a dobách destilace s cílem stanovit optimální podmínky v zájmu maximálního snížení obsahu reziduí perchlóretylénu. U 21. takto získaného vzorku (bez ohledu na podmínky destilace) byla zjištěna následující množství perchlóretylénu (hmotnostní procenta):

0,35	0,15	0,18	0,57	0,18	0,15
1,55	0,40	0,40	0,30	0,20	
0,80	0,15	0,25	0,25	0,18	
0,18	0,74	0,38	0,53	0,18	

Z výsledků je patrné, že je v možnostech výrobce dosáhnout snížení obsahu reziduí perchlóretylénu v kafilerním tuku na 0,2 %. S ohledem na výsledky experimentů Chloupkové aj. (1975), kteří při zkrmování kafilerního tuku obsahujícího 0,45 % perchlóretylénu nezjistili zhoršení zdravotního stavu a růstu ani zhoršení kvality jatečných produktů prasat, by taková hranice byla reálná jak z hlediska výrobce, tak i z hlediska možnosti racionálního uplatnění kafilerního tuku ve výživě zvířat. Ovšem dosažení této hranice a její záruky budou klást na výrobu značné nároky a bude třeba zajistit pravidelnou objektivní kontrolu obsahu reziduí ve výrobcích. Ustanovení podnikové normy ÚVAÚ, platné od 1. 8. 1975, o čichové zkoušce na přítomnost reziduí perchlóretylénu je diskutabilní a prakticky těžko realizovatelné vzhledem k prostředí výroby, kde se čichová zkouška dělá, k přirozenému pachu výrobků a relativně málo výraznému pachu perchlóretylénu a k subjektivitě zkoušky i snížené citlivosti pracovníků pracujících trvale v tomto prostředí. Mimo to byl analyzován ještě vzorek kafilerního tuku reprezentující týdenní výrobu závodu B., s výsledkem 2,0 % perchlóretylénu. Masokostní moučky závodů extrahujících perchlóretylénem analyzovány nebyly.

Zahraniční dodavatel celého zařízení na benzínovou extrakci v závodě B. zaručuje kafilerní tuk i kafilerní moučku prostou benzínem. Skutečnost byla ověřována na 15 vzorcích kafilerního tuku a na odpovídajících vzorcích masokostních mouček s těmito výsledky (hmotnostní procento benzínu):

číslo vzorku	kafilerní tuk	masokostní moučka
1	0,22	< 0,01
2	0,22	< 0,01
3	0,18	< 0,01
4	0,22	< 0,01
5	0,14	< 0,01
6	0,02	0,01
7	0,06	vzorek nedodán

8	0,03	0,01
9	0,01	0,10
10	0,09	0,03
11	0,01	0,01
12	0,08	< 0,01
13	0,01	0,02
14	0,18	< 0,01
15	0,15	< 0,01

Ve všech vzorcích tuku i moučky byla rezidua benzínu prokázána. S výjimkou jednoho vzorku (0,10 %) lze u masokostních mouček hovořit o stopových množstvích. U tuku však byla zjištěna značná variabilita, a proto byly ve výrobě zkoušeny různé varianty destilačních podmínek s cílem snížit obsah reziduí benzínu na minimum. Výsledkem těchto opatření a následujících analýz vzorků bylo zjištění, že hladinu benzínu v kafilerním tuku lze snížit pod 0,10 %. Zaručit absolutní nepřítomnost reziduí ve výrobcích by bylo provozně obtížné, určitá možnost je v používání benzínu s nižším destilačním rozmezím. Dodavatel zařízení neuvádí způsob, jakým se má zjišťovat nepřítomnost benzínu ve výrobcích. Benzín ovlivňuje pach krmiva výrazněji než perchlóretylén ve srovnatelné koncentraci, a to svou větší těkavostí i charakteristickým benzinovým pachem. Je tedy čichem snáze postižitelný. Přesto objektivní laboratorní kontrola kafilerních výrobků určených ke zkrmování se zdá být velmi naléhavá. Hladiny reziduí benzínu řádově v setinách hmotnostních procent by bylo snad možné tolerovat. Při 5 % přídavku kostního tuku o obsahu 0,14 % benzínu nebyl u prasat a drůbeže zjištěn negativní vliv na zdraví a růst zvířat (Najman aj., 1968, 1970), ani na jakost jatečných produktů (Ingr aj., 1970).

Kafilerní produkty mohou výrazně přispět k posílení krmivové základny, budou-li splňovat jakostní kritéria, mezi něž patří i obsah reziduí extrahovadel. Ačkoli principiálně by vzorky měly být prosty těchto reziduí (poněvadž se jedná o exogenní cizorodé látky), v praxi by takové požadavky byly nerealizovatelné. Je proto třeba zajistit snížení jejich obsahu na minimum a pravidelně objektivně kontrolovat hladinu reziduí ve výrobcích. Předložené metody tyto možnosti poskytují.

Poděkování:

Autor upřímně děkuje MVDr. Márii Pavlasové z Ústředí veterinárních asanačních ústavů ČSR za konzultace a zajištění vzorků, Haně Mertové a Mileně Buráňové za technickou spolupráci.

Literatura

- DEAN, J. A.: Chemické dělicí metody. Praha 1974.
 CHLOUPKOVÁ, V. — PAVLASOVÁ, M. — INGR, I.: Ověření vlivu kafilerních krmných tuků získávaných různými technologickými postupy na zdravotní stav, užitečnost výkrmových prasat a kvalitu jatečných produktů. [Výzkumná zpráva.] Brno 1975. — Vysoká škola veterinární.
 INGR, I.: Důkaz a stanovení reziduí extrakčního benzínu v kostním tuku pro krmné účely plynovou chromatografií. Vet. Med., Praha, 14, 1969, č. 12, s. 687-693.
 INGR, I. — NAJMAN, L. — HERZIG, I. — TOULOVÁ, M.: Jateční hodnota a jakost masa a sádla prasat při zkrmování kostního tuku. Prům. Potravín, 21, 1970, s. 201-204.
 LAZAREV, N. V.: Chemické jedy v průmyslu. I. Organické látky. Praha 1959.

NAJMAN, L. — HERZIG, I. — TOULOVÁ, M. — INGR, I.: Využití kostního tuku ke krmným účelům a jeho zhodnocení z hlediska veterinárně-hygienického. [Výzkumná zpráva.] Brno 1968. — Výzkumný ústav veterinárního lékařství.

NAJMAN, L. — HERZIG, I. — TOULOVÁ, M. — INGR, I.: Možnost uplatnění kostního tuku ve výživě prasat. Vet. Med., Praha, 15, 1970, č. 11-12, s. 731-740.

PURNELL, H.: Plynová chromatografie. Praha 1966.

ROSLANOWSKI, E.: Jak bezpiecznie pracować przy rozpuszczalnikach? Przem. ferment. rol., 17, 1973, s. 29-32.

ŠEDIVÉ, V. — FLEK, J.: Příručka analýzy organických rozpouštědel. Praha 1968.

WEIGERT, P.: 1,1,1-Trichloräthan — ein Ersatz für Tetrachlorkohlenstoff, Trichloräthylen und Diäthyläther bei der Untersuchung von Lebensmitteln. Arch. Lebensmittelhyg., 26, 1975, s. 58-61.

ZAJIC, J. — FORMAN, L. — POKORNÝ, J.: Technologie tuků I. Praha 1976.

Došlo dne 25. 2. 1976

INGR I. (Naучно-исследовательский институт ветеринарии, Брно, Чехословакия). Остатки перхлорэтилена и бензина в кафилерных жирах и мучках для кормовых целей. Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 331-341, 1976.

Были разработаны методы доказательства и определения перхлорэтилена и бензина в кафилерных жирах и мучках, предназначенных для кормовых целей. Методы основаны на отборе паров экстрагентов над образцами кафилерных продуктов и на их идентификации и определении при помощи газовой хроматографии. Предел детектируемости перхлорэтилена — при условиях метода 0,05 %, бензина 0,01 % (весовых), причем изменив условия, можно оба предела понизить. Невоспроизводимость результатов при встречающихся на практике концентрациях остатков в производителях характеризуется величиной коэффициента вариации 2,79 (перхлорэтилен) и 6,05 (бензин). Собственно анализ одного образца продолжается максимально пять минут. Во всех образцах одновременно приготавливаемых кафилерных жиров и мучек были доказаны остатки экстрагентов, и их содержание в кафилерных жирах было значительным и очень изменчивым, в мясо-костных мучках из бензиновой экстракции были обнаружены только следы. Рекомендуется использовать предложенные аналитические методы для последовательного и регулярного объективного контроля остатков экстрагентов в кафилерных продуктах, предназначенных для кормовых целей.

газовая хроматография; метод head-space; качественный и количественный анализы

INGR I. (Veterinary Research Institute, Brno, Czechoslovakia). Residues of Perchloroethylene and Petrol in Rendered Fats and in Feeding Meals. Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 331-341, 1976.

Methods were developed for the demonstration and determination of perchlorethylene and petrol in rendered fats and meals for feeding purposes. The methods are based on the collection of the vapours of extracting media over samples of rendering-plant products and on their identification and determination by gas chromatography. Under the conditions of the method, the limit of perchlorethylene extractability is 0.05 % and the limit of petrol extractability is 0.01 % (weight). Under adapted conditions the two limits can be reduced. The reproducibility of the results at practically occurring concentrations of residues in products is characterized by the value of the variation coefficient which reaches 2.79 in perchlorethylene and 6.05 in petrol. The maximum duration of the analysis of one sample is five minutes. In all samples of the currently produced rendered fats and meals the residues of extracting media have been demonstrated to be present. Their content was high and considerably variable in the fats from rendering plants; in meat-bone meals from petrol extraction the content of residues reached only trace values. It is recommended to use the presented analytic methods for thorough and regular objective control of the residues of extracting media in the products of rendering plants for feeding purposes.

gas chromatography; head-space method; qualitative and quantitative analysis

INGR I. (Forschungsinstitute für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). *Perchloräthylen- und Benzinresiduen in Kafillereifetten und -mehlen für Futterzwecke*. Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 331-341, 1976.

Es wurden Methoden des Nachweises und der Bestimmung von Perchloräthylen und Benzin in Kafillereifetten und -mehlen für Futterzwecke ausgearbeitet. Die Methoden basieren auf der Entnahme von Dämpfen der Extraktionsmittel oberhalb der Proben der Kafillereiprodukte und auf deren Identifikation und Bestimmung mit Hilfe der Gaschromatographie. Unter den Bedingungen der beschriebenen Methode beträgt die Detektionsgrenze beim Perchloräthylen 0,05 % und beim Benzin 0,01 % (Massigkeitsprozent), wobei man durch Regelung der Bedingungen beide Grenzwerte herabsetzen kann. Bei den praktisch auftretenden Residuenkonzentrationen in den Produkten beträgt der Variationskoeffizient der Reproduzierbarkeit der Resultate 2,79 (Perchloräthylen) und 6,05 (Benzin). Die eigentliche Analyse einer Probe dauert maximal fünf Minuten. In allen Proben von derzeit erzeugten Kafillereifetten und -mehlen wurden Residuen von Extraktionsmitteln nachgewiesen. Der Gehalt derselben in den Kafillereifetten war bedeutend und sehr variabel. In den Fleischknochenmehlen bei Benzinextraktion wurden nur Spuren Mengen vorgetroffen. Die Ausnutzung der vorgeschlagenen analytischen Methoden zur systematischen objektiven Kontrolle der Extraktionsmittelresiduen in den zur Verfütterung bestimmten Kafillereiprodukten wird empfohlen.

Gaschromatographie; Head-space-Methode, qualitative und quantitative Analyse

Adresa autora:

Ing. Ivo Ingr, CSc., Vysoká škola zemědělská, agronomická fakulta, Zemědělská 1, 662 65 Brno

Ústřední zemědělské a lesnické knihovny ÚVTIZ
z úseku veterinární medicína

Uvedené publikace je možné si zapůjčit osobně nebo písemně v ÚZLK, výpůjční oddělení, 120 56 Praha 2, Slezská 7. Výpůjční doba: pondělí až pátek od 9 do 18 hodin. U každé žádané publikace uveďte signaturu.

PETKOV, G. N. — BAJKOV, B. D. — KAROV, CH. N.

E 28.943/1974/33

Pārvi meždunarden kongres po zootehigiena — Budapešta, 2—5 oktombri 1973 g. Sofija, Centār za nauč.-techn. informacija po selsko stopanstvo 1974. 100 s. Akademia na selskostopanskite nauki 33. (Budapešt — mezinárodní konference veterinární — 1973 — sborník)

D 64.768

Materialy dokladov Vsesojuznoj naučnoj konferencii, posvjaščennoj 150-letiju Kazanskogo Ordena Lenina Veterinarnogo instituta. Kazaň, n. vl. Tom 2, 1974. 557 s. (Kazaň — Vysoká škola veterinární — konference — 1973 — sborník)

LALOV. CH. CH.

E 28.943/1974/29

Enzootična levkoza po govedata. (Naučno-metodično saveštanje na radobitne grupe ot stranite-členki na SIV, saštojalo se 15—20 oktombri 1973 g. v Bukurešt). Sofija, Centar za nauč.-techn. informacija po selso stopanstvo 1974. 153 s. tab. Akademija na selsskstop. nauki 29. (Bukurešt — mezinárodní konference veterinární — 1973 — sborník)

D 64.845

Salmonelite i salmonelozite v Bálgarija. Sofija, Bálgarskaja akademija na naukite 1974. 439 s. obr. tab. mp. (Sofija — konference o salmonelách a salmonelózách — 2. (1971) — sborník)

IVANOV, K. — BOŽILOVA, L.

E 37.800

Materiali ot Petija meždunaroden kongres na Svetovnata veterinarna asociacija po pticevadvstvo. Sofija, Nac. cent. za nauč. i tehnička informacija po selko stopanstvo 1975. 45 s. tab. (Mnichov — Mezinárodní konference Světové veterinární drůbežnické společnosti — 5. (1973) — sborník)

SEIFERLE, G.

C 21.119/4

Nervensystem. Sinnesorgane. Endokrine Drüsen. Bd. 4. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Berlin, P. Parey 1975. 426 s. 250 obr. (Anatomie hospodářských zvířat — příručka) Nervová soustava, smyslové ústrojí, žlázy vnitřní sekrece — anatomie — hospodářská zvířata — příručka)

PREUSS, F. — WUENSCHKE, A.

D 59.577/21

Über einige neue Kapselkörper an der Schweinezehen und andere Gleitdruckstrukturen bei verschiedenen Species, zugleich ein Beitrag zur Sesambeinfrage und zur Interossausfrage. Berlin, P. Parey 1974. 84 s. 3 obr. 1 tab. Fortschritte der Veterinärmedizin 21. (Prase — prsty — anatomie — výzkum / Prase — kosti sesamské — výzkum / Prase — svalu mezikostní — výzkum — NSR)

D 63.069/13

Fiziologie i biochimija belkovogo pitaniya selskochozajstvennykh životnykh. Tom 13. Borovsk, Akad. selskochoz. nauk 1974. 435 s. tab. obr. (Látková přeměna — hospodářská zvířata — bílkoviny — biochemie a fyziologie — sborník — SSSR)

TERAPIE OTRAV ORGANOFOSFÁTY U ZVÍŘAT

J. Beneš, M. Prokšová, J. Hrušovský

Vojenský veterinární výzkumný ústav, Praha

BENEŠ J., PROKŠOVÁ M., HRUŠOVSKÝ J. *Terapie otrav organofosfátů u zvířat*. Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 343-352, 1976.

Perorální intoxikace ovcí O-etyl S-(2-dimethylaminoethyl) metylfosfonotioátem (EDMM) v dávce 0,209 mg na kilogram živé hmotnosti, což je p. o. LD₅₀ (2 h), je terapeuticky zvládnutelná antidotní směsí reaktivátoru cholinesterázy (trimedoxim) a cholinolytika (atropin), která je komerčně dostupná v preparátu SPOFA pro humánní účely TMB-4 compos., když použitá účinná dávka reaktivátoru byla 10,0 mg na kilogram živé hmotnosti intravenózně, dávka cholinolytika pak v závislosti reprezentovala 0,08 mg na kilogram živé hmotnosti. Antidotní směs byla aplikována v době, kdy stupeň muskarinových a nikotinových příznaků a jim korespondující stupeň inhibice erytrocytární a plazmatické cholinesterázy byly na takové úrovni, kterou podle klasifikačních kritérií hodnotíme jako těžký stupeň intoxikace s dubiozní prognózou.

organofosfáty; ovce; terapie; TMB-4 compos. SPOFA

Současná pesticidní chemie se stále více zaměřuje na použití karbamátů a zejména organofosfátů, zatímco chlórované deriváty typu DDT mizí ze sféry zájmů, pokud nejsou zcela zakázány. Důvod tohoto postupu je vcelku notoricky známý – je to jednak problematika degradace uvedených sloučenin v přírodě, v rostlinných či živočišných organismech, jednak otázka reziduí v rostlinných i živočišných produktech potřebných pro výživu lidí i zvířat; roli hraje rovněž perzistence v živé přírodě.

Tuto práci jsme věnovali otázce otrav organofosfáty a jejich terapii, protože je zcela zřejmým faktem, že využití těchto tzv. anticholinesterázových látek v zemědělské výrobě, v ovocnářství a zelinářství, lesním a vodním hospodářství, stejně jako v humánní a veterinární medicíně neustále roste. Konečně hrozba zneužití vysoce toxických organofosfátů pro vojenské účely nebyla doposud odstraněna, takže i tento významný aspekt nelze pominout jak z hlediska ochrany území celkem, tak z hlediska veterinární medicíny zvláště.

Při studiu možnosti terapie otrav organofosfáty u zvířat jsme jako anticholinesterové látky použili O-etyl S-(2-dimethylaminoethyl) metylfosfonotioát (EDMM)*, který – jak známo – disponuje vysokou toxicitou a je potencionálním inhibitorem jak erytrocytární acetylcholineste-

*) Seznam použitých zkratk je uveden v závěru práce.

I. Srovnání perorálních LD₅₀ (vesměs mg kg⁻¹ živé hmotnosti) některých organo-
Dreisbach, 1974; Franke, 1967; Remedia Veterinaria Beyer, 1973)

Název	B	0,Cp
Amiton	—	—
Azinfos	—	—
Bidrin	—	—
Butonát	—	—
DFP	—	—
Diazinon	25,0	30,0
Dibrom	—	—
Dicapton	—	—
Dimefox	—	—
Dichlorvos	10,0	25,0
Dimethoát	20,0 — 40,0	30,0
Dimethylparathion	100,0	—
Dioxathion	—	—
Disyston	—	—
Demeton — O	—	—
Demeton — S	—	—
EDMM	—	0,209
EPN	10,0 — 20,0	10,0 — 20,0
Ethion	—	—
Fenchlorvos	300,0	300,0
Fenthion	—	—
Gofacid	—	—
Fosdrin	—	—
Fosfamidon	—	—
Fostex	—	—
HETP	—	—
Chlorthion	50,0	—
IMPF	—	—
Karbofenothion	—	—
Kumafos	10,0 — 40,0	8,0 — 20,0
Malathion	50,0 — 100,0	50,0 — 100,0
Maretin	—	—
Mipafox	—	—
NPD	—	—
Parathion	25,0 — 75,0	20,0 — 40,0
Paraoxon	—	—
Pyrazooxon	—	—
PMPF	—	—
Potasan	—	—
Pyrazothion	—	—
Ruelen	490,0 — 1000,0	200,0
Schradan	—	—
Tabun	—	—
TEPP	—	—
Thimet	—	—
Tiguvon	—	—
Trichlorfon	50,0 — 100,0	100,0 — 200,0

*) LD₁₀₀

Pozn.: LD₅₀ organofosfátů při perorální bráně vstupu pro člověka lze kalkulovat z *p. o.*

LD₅₀ pro krysu, když u člověka se uvažuje cca 5–25 × vyšší citlivost

rázy (AChE, E. C. 3.1.1.7.), tak i plazmatické butyrylcholinesterázy (ChE, E. C. 3.1.1.8.).

Jako nejčastější místa vstupu organofosfátové noxy do živého orga-

fosfátů u přežvýkavců, psa, krysy a člověka (CIBA-GEIGY, 1970; Clarke, 1967;

C	R	H
—	3,5— 7,0	—
—	10,0— 30,0	—
—	15,0	—
—	700,0	—
—	7,7— 13,5	—
—	76,0	—
—	430,0	—
—	330,0	—
—	7,5	—
—	56,0— 80,0	—
—	215,0	—
—	4,5— 9,7	—
250,0	23,0— 43,0	—
—	3,0— 12,0	—
—	30,0	—
—	1,5	—
—	—	—
—	7,0— 32,0	—
—	27,0	—
500,0	1250,0	—
—	190,0	—
—	3,7	—
—	3,7	—
—	17,0— 30,0	—
—	2500,0	—
—	2,0	—
—	100,0	—
—	0,6	0,04—0,14*)
—	10,0— 30,0	—
—	56,0— 230,0	—
500,0—3500	1000,0—1375,0	—
—	70,0	—
—	25,0	—
—	1500,0	—
12,0— 20,0	4,0— 13,0	0,5
—	3,0	—
—	4,0	—
—	—	0,02—0,04*)
—	19,0	—
—	12,0	—
—	—	—
10,0	13,0— 30,0	0,01
0,2	3,7	5,0*)
—	1,1— 2,0	1,4*)
—	1,1— 2,3	—
—	175,0— 375,0	—
60,0— 100,0	112,0	—

nismu je možné uvést inhalaci (zemědělské postřiky stejně jako vojenské aerosoly, popř. léčebné spraye), dále perkutánní resorpci (rovněž postřiky všech druhů, u vojenských organofosfátů lze navíc rychlost průniku i ne-

porušenou kůží zvýšit prostředky typu dimetylsulfoxidu (DMSO), dále je riziko resorpce *per cutis* při veterinárních léčebných zákrocích – spraye, pour-on aplikace OF, washing); konečně je z nejčasteji uváděných bran vstupu perorální intoxikace, a to zejména u volně se pasoucích zvířat a při použití organofosfátové noxy s vysokým stupněm perzistence v přírodě při vhodných meteorologických podmínkách. Tato možnost se např. uvádí u bojového organofosfátu, který je v arzenálech armády Spojených států a je kódově označen VX (Sidell a Groff, 1974).

Proto jsme v našem technickém uspořádání pokusů jako modelovou intoxikaci volili perorální formu, zejména z toho důvodu, že pokusným objektem byla ovce. Srovnání perorálních LD₅₀ pro řadu organofosfátů přežvýkavců, masožravců, hlodavců a člověka uvádí tab. I (CIBA GEIGY, 1970; Clarke, Clarke 1967; Dreisbach, 1974; Franke, 1967; REMEDIA VETERINARIA BAYER, 1973).

Otázka systematického postupu při otravách OF je zejména v humanární medicíně poměrně rozsáhle prostudována. Obecné terapeutické zásady, totiž odstranění noxy, použití cholinolytických (anticholinergních) látek, reaktivátorů cholinesterázy a symptomatologická terapie, jsou citovány v naší dřívější práci Beneš aj., 1976). V našich experimentech jsme jako cholinolytika použili atropinu, jako reaktivátoru cholinesterázy trimedoximu (preparát SPOFY TMB-4 compos. *ad usum humanum*).

MATERIÁL A METODA

Ke sledování účinnosti terapie bylo použito čtyř intoxikovaných ovcí vesměs plemene merino, samičího pohlaví, hmotnosti 30 až 50 kg. Klinické, hematologické, biochemické a koprologické parametry prošetřené před pokusem (ovce byly preventivně dehelmintovány se zaměřením na plicní a jaterní parazity) měly fyziologickou hladinu. Jako kontroly sloužily čtyři ovce, které byly intoxikovány *p.o.* LD₅₀ (2 h) EDMM 0,209 mg kg⁻¹ živé hmotnosti) bez terapeutického zákroku.

EDMM ředěný v 0,89% NaCl a pro každou ovci vždy čerstvě připravený roztok s ověřenou účinností biologickým pokusem na kryších (*i. m.* LD₅₀) byl aplikován *per os* speciálně upravenou sondou pro střední zvířata. Do sondy byla zavedena teflonová kanyla, zatavená v kovovém ústí dentacrylem; anticholinesterázová noxa byla aplikována injekční stříkačkou v objemech, které nepřesahovaly 5,0 až 10,0 ml, potom následovalo propláchnutí sondy dvojnásobným objemem destilované vody, což podle srovnávacích pokusů se značenými sloučeninami zaručovalo 100% příjem podané dávky.

Antidotní směs jsme aplikovali *i. v.* tak, aby dávka trimedoxinu reprezentovala 10,0 mg kg⁻¹ živé hmotnosti, atropin jsme vědomě nechali v poddózovaném množství, než stanoví výrobce. Pro dobu aplikace jsme volili 120. minutu po otravě, kdy klinický komplex muskarinových a nikotinových příznaků intoxikace nabyl takových rozměrů, že prognóza byla vysloveně nepříznivá.

Krev pro stanovení aktivity erytrocytární acetylcholinesterázy (AChE, E. C. 3.1.1.7.), plazmatické butyrylcholinesterázy (ChE, E. C. 3.1.1.8.), jakož i aktivity sérových transamináz (S-GOT, E. C. 2.6.1.1., S-GPT, E. C. 2.6.1.2.) byla odebírána z *v. jugularis* v intervalech těsně před aplikací

noxy (C) a dále 30, 60, 90, 120, 135 minut, 6, 24, 48 a 72 hodiny, resp. sedmý den po intoxikaci.

Aktivita cholinesteráz byla stanovována Hestrinovou metodou v Tulachově (1958) modifikaci s tím rozdílem, že plazma byla ředěna v poměru 1:2 0,89% NaCl, erytrocytární suspenze v poměru 1:5 0,01% čerstvým roztokem saponinu. Inkubační doba reprezentovala 30 minut při 37 °C v Dubnoffově shakeru (60 kyvů za min.). Aktivita enzymů byla vyjadřována v μ M hydrolyzovaného substrátu za 30 min. při 37 °C na ml plazmy, resp. erytrocytů.

Sérové transaminázy byly stanovovány metodou podle Reitmana a Frankela (1957) v rozsahu, který uvádí komerční Merckotest (Merck A. G., 3302, NSR). Kolorimetrie při 546 nm, 1,0 cm OS-kyvety, Spekol (Zeiss, NDR). Hodnoty transamináz jsou vesměs uváděny v mU ml⁻¹ séra.

U všech experimentálních ovcí byl sledován klinický průběh otravy, resp. terapeutického zákroku, u exitovaných jedinců byl zaznamenán patologico-anatomický obraz.

Výsledky byly statisticky vyhodnocovány Studentovým t-testem.

VÝSLEDKY

KLINICKÉ PROJEVY PERORÁLNÍ INTOXIKACE VČETNĚ VLIVU ANTIDOTNÍ TERAPIE

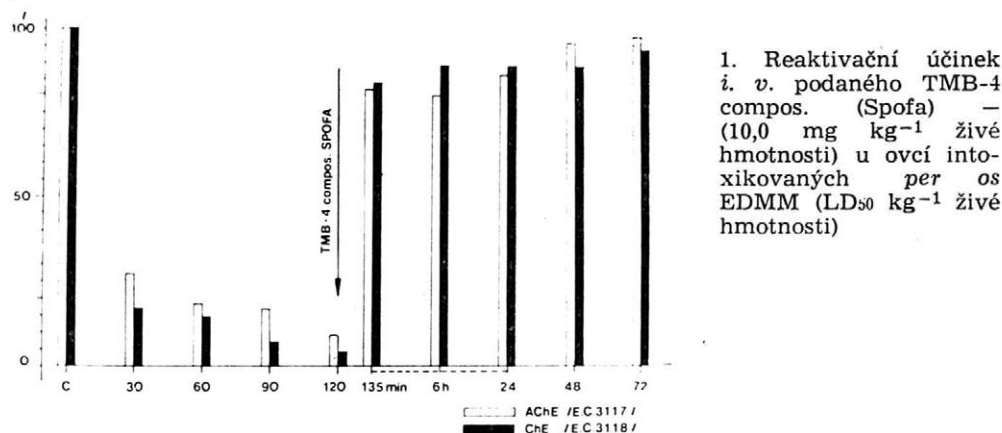
Doba laktace reprezentuje po dávce 0,209 mg EDMM na kg živé hmotnosti *per os* (LD₅₀, 2 h) 60 až 80 minut; do 90 minut nastupují muskarinové příznaky, reprezentované séromuciózní salivací, miózou, defekací, urinací, drobnými třesý a škuby v kaudálních partiích, jež se postupně rozšiřují na stěnu hrudní a celý povrch těla; postižená dýchací svalovina spolupůsobí při vzniku výrazného bronchospasmu, lze zaznamenat i typicky dvoufázové Cheyne-Stokesovo dýchání (100 minut po intoxikaci). Výrazné nikotinové příznaky jsou zřejmé za 120 minut po otravě, charakterizují je výrazné tonicko-klonické křeče. V tomto stadiu manifestních muskarin- a nikotin-like příznaků byla aplikována antidotní směs, jejíž klinický efekt lze označit při námi použité dávce jako okamžitý – relaxace spasmů, zklidnění tepové i dechové frekvence, ovce se bezpečně udrží na nohou. Za šest hodin nejsou u léčených ovcí zřetelné příznaky intoxikace, do 12 až 24 hodin jsou triasové parametry v normálu, ovce projevují běžnou chuť k potravě.

U neléčených intoxikovaných ovcí intenzita klinických příznaků otravy vrcholí mezi třetí až šestou hodinou (exitus dvou ovcí mezi 6.–7. hodinou). U zbylých dvou neléčených ovcí dochází mezi 8. až 12. hodinou po otravě ke zřetelnému poklesu intenzity příznaků, zůstávají pouze příznaky muskarinové. Po 24 hodinách přetrvává alterace tepové i dechové frekvence, celkový neklid, inapetence, za 48 hodin lze hovořit o celkové normalizaci.

Patologico-anatomický obraz u exitovaných ovcí je netypický, charakterizovaný hemoragickou diatézou, edémem plic, degenerací srdeční svaloviny i jaterní tkáně, hyperemií mozkových plén.

AKTIVITA AChE (E. C. 3.1.1.7.) A ChE (E. C. 3.1.1.8.) U *p. o.* INTOXIKOVANÝCH LÉČENÝCH I NELÉČENÝCH OVČÍ

Procentuální vyjádření inhibice AChE a ChE v erythrocytech a plazmě intoxikovaných ovčích *p. o.* LD₅₀ EDMM na kg živé hmotnosti stejně jako reaktivační efekt trimedoxinu *i. v.* aplikovaného za 120 minut po otravě, ukazuje obr. 1. Reprezentuje-li zbytková aktivita AChE v době maximálních klinických příznaků (120 min.) pouhých 9,6 % (ChE v této době 4,2 %), pak za 15 minut po podání reaktivátoru (135 minut po intoxikaci) dosahuje až AChE 82,6 % původní aktivity, ChE v tomto intervalu dokonce 86,3 %, což už je ve fyziologické toleranci. Návrat a obnova původní aktivity je dosažena nejpozději mezi 72. hodinou až 7. dnem po otravě.



Srovnání průběhu inhibice, resp. postupné obnovy aktivity obou cholinesteráz, u přeživších neléčených ovčích s hodnotami u ovčích po terapii dokumentují tab. II a III. Statisticky významný efekt terapie (vesměš $p < 0,001$), bereme-li jako kontroly ovce neléčené, je více než zřejmý, zejména v intervalech 135 minut a 6 hodin po otravě; trend k obnově aktivity u AChE neléčených ovčích, jež přežily, začíná za 24 hodiny, za 72 hodiny lze hovořit o normalizaci. Obnova aktivity ChE u neléčených ovčích (tab. III) je protražovanější, s fyziologickými hodnotami se setkáváme až sedmý den po intoxikaci.

AKTIVITA SGOT (E. C. 2.6.1.1.) A SGPT (E. C. 2.6.1.2.) U *p. o.* INTOXIKOVANÝCH LÉČENÝCH A NELÉČENÝCH OVČÍ

Obr. 2 uvádí aktivity obou sérových transamináz. Zkušenosti na více než 50 *i. m.* a *p. o.* intoxikovaných ovčích EDMM v různých dávkách nás poučily, že zejména v krátkých časových intervalech po otravě se aktivity SGOT i SGPT signifikantně nemění.

Zvýšení aktivity SGOT u léčených ovčích v intervalech 120 minut až šest hodin je na hranici statistické významnosti a koresponduje s obdobím manifestních klinických příznaků otravy; nejpozději do sedmi dnů po intoxikaci a terapii je aktivita na fyziologické hladině. Aktivity SGPT pak vykazují minimální výkyvy.

Tentýž trend, včetně normalizace, je zachován i u otrávených nelé-

II. Vliv intravenózní aplikace TMB-4 compos. (Spofa) ovcím intoxikovaným LD₅₀ EDMM p. o. na kilogram živé hmotnosti na aktivitu erytrocytární acetylcholinesterázy (AChE, E. C. 3. 1. 1. 7.)

Interval	AChE ($\bar{x}$)	$\pm S. D.$	p	n
C	28,48	0,57	—	8
30 min.	7,84	0,37	<0,001	8
60	5,21	0,95	<0,001	8
90	4,62	0,32	<0,001	8
120	2,74	1,27	<0,001	8
135 (TMB-4)	23,45	4,29	<0,001	4
135 (neléč.)	3,29	0,65	—	4
6 h (TMB-4)	22,63	4,16	<0,001	4
6 h (neléč.)	3,25	1,29	—	4
24 h (TMB-4)	24,45	3,41	—	4
24 h (neléč.)	11,97	—	—	2
48 h (TMB-4)	27,31	0,20	—	4
48 h (neléč.)	22,60	—	—	2
72 h (TMB-4)	27,93	0,14	—	4
72 h (neléč.)	29,20	—	—	2

Pozn.: hodnoty AChE jsou vesměs uvedeny v μM za 30' při 37 °C na ml

$\pm S. D.$ — standardní odchylka

n — počet použitých zvířat

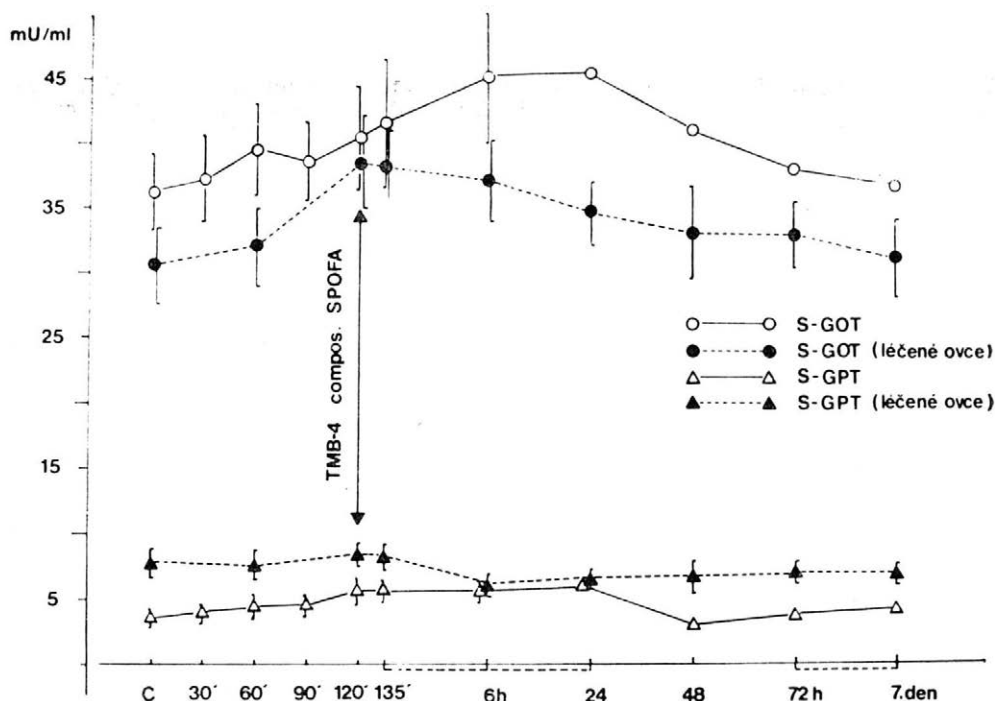
III. Vliv intravenózní aplikace TMB-4 compos. (Spofa) ovcím intoxikovaným LD₅₀ EDMM p. o. na kilogram živé hmotnosti na aktivitu plazmatické butylcholinesterázy (ChE, E. C. 3. 1. 1. 8.)

Interval	ChE ($\bar{x}$)	$\pm S. D.$	p	n
C	5,940	1,09	—	8
30 min.	1,038	0,22	<0,001	8
60	0,883	0,17	<0,001	8
90	0,391	0,14	<0,001	8
120	0,248	0,10	<0,001	8
135 (TMB-4)	5,110	0,95	<0,001	4
135 (neléč.)	0,310	0,08	—	4
6 h (TMB-4)	5,300	1,06	<0,001	4
6 h (neléč.)	0,680	0,44	—	4
24 h (TMB-4)	5,290	1,26	—	4
24 h (neléč.)	1,060	—	—	2
48 h (TMB-4)	5,240	1,40	—	4
48 h (neléč.)	2,030	—	—	2
72 h (TMB-4)	5,580	1,09	—	4
72 h (neléč.)	3,570	—	—	2
7. den (TMB-4)	5,610	1,15	—	4
7. den (neléč.)	5,250	—	—	2

Pozn.: hodnoty ChE jsou vesměs uvedeny v μM za 30' při 37 °C na ml

$\pm S. D.$ — standardní odchylka

n — počet použitých zvířat



2. Srovnání aktivit sérových transamináz u léčených a neléčených ovcí intoxikovaných per os LD₅₀ EDMM na kilogram živé hmotnosti

čených ovcí. Současně nelze hovořit o alteraci de Ritisova kvocientu, když ve všech případech je větší než 1.

ZÁVĚR

Vzhledem ke skutečnosti, že poločas dealkylace (ageing) EDMM je delší než 120 minut, byla ještě cholinesteráza v našem technickém uspořádání pokusů v reaktivovatelné formě a nemohlo tudíž dojít po terapii k další kumulaci acetylcholinu. Muskarinové příznaky byly dostatečně zvládnuty množstvím atropinu v použité směsi.

Při otravě p. o. LD₅₀ EDMM na kg živé hmotnosti bylo bezpředmětné opakovat antidotní terapii, i když vzhledem k toxicitním parametrům použitého trimedoximu je to zcela reálné. Je ovšem třeba vždy rozlišovat, zda nové vzplanutí klinických příznaků není pouze muskarinového typu, při kterém bohatě vystačíme se subkutánní aplikací 1,1% atropinu *ad usum veter.*

Otázkou nejzávažnější je a zůstane včasnost zákroku a zásadně použití směsi reaktivátoru i cholinolytika, neboť jenom tak můžeme eliminovat v mezích možností tvorbu nereaktivovatelného komplexu cholinesteráza a organofosfát. Poločas již zmíněné dealkylace je, jak známo, u různých typů organofosfátů odlišný, mohou jej právě tak reprezentovat minuty, jako může být téměř neomezený.

Intravenózní aplikace antidotní směsi rovněž není nutností, postačí – pokud se nejedná o akutní případ – podání intramuskulární, které běžně doporučuje výrobce pro humánní účely.

Použitá anticholinesterázová noxa – EDMM – v dávce p. o. LD₅₀ na kg živé hmotnosti nemá prokazatelný hepatotoxický účinek, případné statisticky nevýznamné zvýšení aktivit sérových transamináz lze přičítat spíše vyplavování enzymů z atakované kosterní svaloviny.

Seznam použitých zkratek

OF	— organofosfáty
OPI	— insekticidy na bázi organofosfátů
BOF	— bojové organofosfáty
AChE	— acetylcholinesteráza, E. C. 3.1.1.7.
ChE	— butyrylcholinesteráza, E. C. 3.1.1.8.
SGOT	— transamináza kyseliny glutamové-oxalocetové, E. C. 2.6.1.1.
SGPT	— transamináza kyseliny glutamové-pyrohroznové, E. C. 2.6.1.2.
DFP	— diizopropylfluorofosfát
EDMM	— O-etyl S(2-dimethylaminoetyl)metyl-fosfonotioát
EPN	— O-etyl-O-(p-nitrofenyl)-benzotiofosfonát
HETP	— hexaethyltetrafosfát, Mortopal, Bladan
IMPF	— izopropylmetyl fosfonofluridát, sarin
NPD	— tetra-n-propyl ditionopyrofosfát, E 8573
PMPF	— pinakolylmetyl fosfonofluoridát, soman
TEPP	— tetraethylpyrofosfát, Bladex, Demit, etylpyrofosfát, Fosvex, HEPT, Hetra-phos, Hexamit, Mortopal (obsahuje TEPP a HETP), Hexon, Hexotin, Killex, Nefos, Nifos, Tephos, Tetraton, Tetron, Vapoton
TMB-4	— trimedoxim trimetylen-bis-(4-oxiiminometylpyridinium)-di-Br nebo di-Cl
MINA	— mono-izonitrózoacetón
DAM	— diacetylmonoxim

Literatura

- BENEŠ, J. — PROKŠOVÁ, M. — HRUŠOVSKÝ, J.: Antidotní efekt TMB-4 compos. (SPOFA) u ovčí intoxikovaných O-etyl S-(2-dimethyl-aminoetyl)metylfosfonotioátem. Vet. Med., Praha, 21, 1976, č. 4, s. 237-249.
- CLARKE, E. G. C. — CLARKE, M. L.: Garner's Veterinary Toxicology. Bailière, Tindall a Cassell, London 1967. 210 s.
- DREISBACH, R. H.: Handbook of Poisoning. Lange Medical Publ., Los Altos, California 1974. 95 s.
- FRANKE, S.: Lehrbuch der Militärchemie. Band I, Deutscher Militärverlag, Berlin 1967. 297 s.
- SIDELL, F. R. — GROFF, W. A.: The reactivability of cholinesterase inhibited by VX and sarin in man. Toxic. appl. Pharmac., 27, 1974, s. 241-252.
- TULACH, J.: Kolorimetrické stanovení cholinesterasy v lidské krvi. Voj. Zdrav. Listy, 27, 1958, s. 513-515.

Došlo dne 28. 5. 1975

БЕНЕШ Й., ПРОКШОВА М., ГРУШОВСКИЙ Й. (Военно-ветеринарный исследовательский институт, Прага, Чехословакия). Терапия отравления органофосфатами у животных. Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 343-352, 1976.

Пероральная интоксикация овец О-этил S-(2-диметиламиноэтил) метилфосфонотииоатом (EDMM) в дозе 0,209 мг на кг живой массы, (р.о. LD₅₀, 2 ч) с точки зрения терапевтики преодолима антидотной смесью реактиватора холинэстеразы (тримедоксин) и холинолитика (атропин), которые коммерчески доступны в препарате СПОФА для гуманных целей ТМВ-4 компози. Действующая доза реактиватора применялась внутривенно 10,0 мг на кг живой массы, доза холинолитика соответственно 0,08 мг на кг живой массы. Антидотная смесь применялась тогда, когда степень мускариновых и никотиновых признаков и с ними коррелирующая степень ингибции эритроцитарной и плазматической холинэстераз находились на таком уровне, который, согласно критериям классификации, нами считается тяжелой степенью интоксикации с сомнительным прогнозом.

органосфаты; овцы; терапия; ТМВ-4 компози. СПОФА

BENEŠ J., PROKŠOVÁ M., HRUŠOVSKÝ J. (Military Veterinary Research Institute, Praha, Czechoslovakia). *Therapy of Organophosphate Poisoning of Animals*. Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 343-352, 1976.

Per os intoxication of sheep with O-ethyl S-(2-dimethylaminoethyl)methyl phosphonium thioate (EDMM) in the dose of 0.209 mg per kg of live weight, that means p. o. LD₅₀ (2 h), can be therapeutically mastered by means of an antidotal mixture of the reactivator of cholinesterase (trimedoxim) and of the cholinolytic (atropine), which is commercially available in the SPOFA preparation TMB-4 compos. for human purposes, if the effective dose of the reactivator was 10.0 mg per kg of live weight and if it was applied intravenously, and if the dose of the cholinolytic consisted, per 1 kg of live weight, of 0.08 mm. The antidotal mixture was applied, when the degree of the muscarinic and nicotinic symptoms and the corresponding degree of the inhibition of erythrocytary and plasmatic cholinesterase were on such a level which, according to the classification criteria, we consider a severe grade of intoxication with a dubious diagnosis.

organophosphates; sheep; therapy; TMB-4 compos. SPOFA

BENEŠ J., PROKŠOVÁ M., HRUŠOVSKÝ J. (Militärische Veterinärforschungsinstitut, Praha, Tschechoslowakei). *Therapie von Organophosphatvergiftungen bei Tieren*. Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 343-352, 1976.

Die perorale Intoxikation von Schafen mit O-Äthyl S-(2-Dimethylaminoäthyl)Methylphosphonothiat (EDMM) in Gaben von 0,209 mg je Kilogramm Lebendmasse, p. o. LD₅₀ (2 h) ist therapeutisch zu bewältigen mit Hilfe eines Antidotgemisches bestehend aus einem Cholinesterase-Reaktivator (Trimedoxim) und einem Cholinolytikum (Atropin). Dieses Gemisch ist im Präparat SPOFA für humane Zwecke TMB-4 compos. enthalten. Die benutzte Reaktivatordosis betrug 10,0 mg je Kilogramm Lebendmasse intravenös, die Cholinolytikumdosis betrug entsprechend 0,08 mg je Kilogramm Lebendmasse. Das Antidotgemisch wurde in einer Zeit appliziert, wo der Grad der Muskarin- und Nikotinsymptome und der denselben entsprechende Inhibitionsgrad der erythrozytären und plasmatischen Cholinesterase auf einem Niveau waren, das wir nach den Klassifikationskriterien als schweren Intoxikationsgrad mit dubiöser Prognose bewerten.

Organophosphate; Schaf; Therapie; TMB-4 compos. SPOFA

Adresa autorů:

MVDr. Jiří Beneš, CSc., PhMr. Milena Prokšová, doc. MVDr. Jozef Hrušovský, DrSc., Vojenský veterinární výzkumný ústav, 150 06 Praha

LÉČBA UMĚLÉ INVAZE ASCARIDIA GALLI U RŮZNĚ STARÝCH KUŘAT TETRAMISOLEM, PIPERAZINEM A METRIFONÁTEM

J. Pavlíček, I. Dyková

Parazitologický ústav CSAV, Praha

PAVLÍČEK J., DYKOVÁ I. *Léčba umělé invaze Ascaridia galli u různě starých kuřat tetramisolem, piperazinem a metrifonátem.* Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 353-358, 1976.

Sledovali jsme anthelmintickou účinnost jednorázové perorální aplikace tetramisolu (40 mg na 1 kg živé hmotnosti), piperazinu (500 mg na 1 kg živé hmotnosti) a metrifonátu (50 mg na 1 kg živé hmotnosti) při umělé invazi *Ascaridia galli*. V různém věku (6, 36 a 48 dnů) jsme jednorázově invadovali 118 kuřat plemene leghornka bílá, použili jsme dávky 3000 nebo 1500 invazních vajíček. Patnáctý den po invazi jsme posuzovali intenzefektivnost a extenzefektivnost léčebného zásahu zkoušených látek, a to podle nálezů škrkavek při helmintologické pitvě, uskutečněné za 48 hodin po terapii. Srovnávali jsme počty škrkavek u pokusných skupin s příslušnými kontrolami. Histologickým vyšetřením jsme sledovali tkáňovou reakci ve střevě, játrech, slezině, ledvinách, srdci a mozku. Jako nejúčinnější se jevil tetramisol. Intenzefektivnost dosahovala u mladších i starších kuřat 89 až 100 %. Piperazin měl dobrou účinnost u starších kuřat (61–83 %), u mladších kuřat byl naprosto neúčinný. Procento intenzefektivnosti u metrifonátu bylo téměř nulové. Extenzefektivnost tetramisolu se pohybovala v rozmezí 20 až 100 % (nízké hodnoty při silnějším průběhu invaze), piperazin vykazoval 17 až 67 % EE pouze u starších kuřat při slabší invazi, jinak byla nulová. Metrifonát byl naprosto neúčinný. Odraz askaridiózy ve tkáňové reakci hostitele se projevil granulomatózními změnami ve sliznici střeva, množением histiocytárních elementů a plazmatických buněk a zánětlivými lymfocytárními infiltráty v jaterním parenchymu.

askaridióza kura domácího; tetramisol; piperazin; metrifonát; extenzefektivnost a intenzefektivnost terapie; tkáňová reakce hostitele

Askaridióza drůbeže je jedna ze závažných helmintóz i v moderních velkochovech. Poláková (1964) např. uvádí průměrnou zamořenost drůbeže askaridiemi v ČSSR 31,3 %. Z komplexu účinných opatření, která zabraňují ztrátám při této parazitóze, je možné uvést postupy chemoprofylaxe, vypracované Lebduškou a Polákovou (1964); v poslední době přehledně zpracoval otázku léčby askaridiózy Enigk (1969). Ze škály antinematodózních látek se při napadení škrkavkami nejlépe uplatňují piperazinové soli a tetramisol, jsou však známé i údaje o účinnosti organofosforečné sloučeniny metrifonát (Jegizbajeva, 1969). U jmenovaných látek, které jsou u nás v současné době na trhu dosažitelné, jsme se rozhodli srovnat účinnost terapeutického zásahu na populaci škrkavek, a to při umělé invazi *Ascaridia galli* u různě starých kuřat.

MATERIAL A METODA

U zvolených anthelmintik, tj. u tetramisolu, piperazinu a metrifonátu, jsme testovali jejich terapeutickou účinnost při askarióze drůbeže v pokusech *in vivo*.

K pokusům probíhajícím ve dvou letech za sebou (1970 a 1971) jsme použili celkem 118 kuřat plemene leghornka bílá (LB) s umělou invazí *Ascaridia galli*. Kuřata jsme jednorázově invadovali v různém věku (6, 36 a 48 dnů) dávkou 3000 nebo 1500 invazních vajíček, kultivovaných metodou podle Bikorjukova (1967). Léčebnou dávku preparátu jsme aplikovali *per os* individuálně sondou do volete mírně naplněného krmivem v dávkách:

- tetramisol – 40 mg kg⁻¹ živé hmotnosti jako 0,25 % vodný roztok sp. Nilverm, 5,5 ml na 100 g hmotnosti kuřete,
- piperazin – 500 mg kg⁻¹ živé hmotnosti, 1 % vodná suspenze sp. Helmirazin, 5 ml na 100 g hmotnosti kuřete,
- metrifonát – 50 mg kg⁻¹ živé hmotnosti, 1 % vodný roztok ze substance čištěné rekrystalizací, 0,5 ml na 100 g hmotnosti kuřete.

Za 48 hodin po léčebném zásahu jsme kuřata utráceli a dělali helmintologickou pitvu střev podle Skrjabina (Hovorka, 1954). Střevo (2–3 cm excize jejuna, odebíraná z poloviční vzdálenosti mezi koncem vzestupné kličky duodena a diverticulum Meckeli) a parenchymatózní orgány jsme fixovali 10 % formolem a zpracovali obvyklou parafinovou technikou. Histologické řezy jsme barvili hematoxylinem-eosinem, v jaterním parenchymu jsme prokazovali glykogen (PAS reakcí podle McManuse s kontrolním natrávením slinami a lipidy ve zmrazovacích řezech Sudanem III).

Terapeutickou účinnost anthelmintik jsme posuzovali na základě srovnání nálezů askarií u skupin léčených kuřat s nálezy u skupin kontrolních kuřat. Vypočítávali jsme extensefektivnost (EE) a intensefektivnost (IE) léčebného zásahu, a to postupem podle Nepokloňova a Talanova (1966).

Charakteristiky pokusných skupin a přehled uspořádání pokusů uvádíme v tab. I.

VÝSLEDKY

Srovnáváme-li nálezy škrkavek u kontrolních kuřat v jednotlivých skupinách, jsou v roce 1971 vyšší u mladších kuřat (skupiny A a B) než u kuřat starších (skupiny C a D). Vysoké nálezy škrkavek u starších kuřat v roce 1970 (skupina F) svědčí o celkově intenzivnějším průběhu invaze v roce 1970 proti roku 1971.

Anthelmintická účinnost zkoušených látek spolu s přehledem uspořádání pokusů je uvedena v tab. I.

Ze srovnání počtů škrkavek po terapii v jednotlivých skupinách vyplývá, že u skupin léčených tetramisolem byly nálezy nižší než u skupin léčených piperazinem, a u těchto skupin zase nižší než po léčbě metrifonátem.

Při posuzování intensefektivnosti anthelmintického účinku zkouše-

ných preparátů se jevil jako nejlepší tetramisol. Procento IE se pohybovalo u mladších i starších kuřat v rozmezí 89 až 100 %. Piperazin měl dobrou účinnost u starších kuřat (61–83 %), u mladších kuřat byl však naprosto neúčinný. Rovněž metrifonát byl u mladších kuřat neúčinný, nepatrná byla účinnost tohoto preparátu i u kuřat starších (0–23 %).

V hodnocení procenta extensefektivnosti byl ze zkoušených preparátů opět nejlepší tetramisol, i když zjišťované rozmezí 56 až 100 % je velmi široké, navíc u skupiny F (starší kuřata v roce 1970 s intenzivnějším průběhem invaze) dosáhl pouze 20 % EE. Piperazin vykazoval nulovou EE, pouze v roce 1971 (slabší průběh invaze) u starších kuřat dosáhl 17 až 67 % EE.

V roce 1971 jsme u mladších kuřat (skupiny A a B) zaznamenali po léčbě piperazinem a metrifonátem vyšší počty škrkavek než u příslušných skupin kontrolních.

Rozdílná intenzita invaze se promítla i do charakteru tkáňové reakce. Se silnější invazí souvisely výraznější změny. Z vyšetřovaných orgánů se projevíly ve střevě a v játrech. Ve střevě byly vyjádřeny především v hlubších vrstvách sliznice granulomatózními změnami a množstvím histiocytů a plazmatických buněk jak v hlubších vrstvách sliznice, tak i ve stromatu klků. Mimo střevo jsme zjistili tkáňovou reakci pouze v jaterním parenchymu v podobě zánětlivých, převážně lymfocytárních infiltrátů, kde rovněž intenzivnější invazi odpovídá bohatší histopatologický nález.

DISKUSE

Pro terapeutický zásah jsme volili to období ve vývoji askaridií, kdy je parazit relativně hůře zasažitelný v důsledku svého těsnějšího vztahu ke sliznici. Z této tzv. „tkáňové fáze“, která spadá přibližně mezi 9. až 17. den vývoje škrkavek, jsme vybrali konec tohoto časového období. V tu dobu jsou již výrazně vyjádřeny klinické příznaky, v závislosti na intenzitě poškození hostitele začínají rovněž působit jako obranné mechanismy. Vývoj imunitních pochodů výrazně ovlivňuje účinnost terapeutického zásahu v pozitivním smyslu (K o š k i n a, 1971). Na druhé straně je známo, že prostupnost kutikuly u parazita je závislá na jeho vývoji. U askaridií je období kolem 15. dne věku charakteristické velmi nízkou prostupností kutikuly (P a v l o v, 1971). Tých autor uvádí, že v imunním hostiteli ovlivňují protilátky a eozinofily určitým způsobem kutikulu parazita a zvyšují prostupnost vůči určitým látkám. Zvolený interval spadá tedy do období, kdy intenzivní změny u hostitele i parazita mohou ovlivnit účinnost terapeutického zásahu.

Výši terapeutických dávek jsme stanovili na základě literárních údajů. U tetramisolu je dávka 40 mg kg⁻¹ živé hmotnosti považována za dostatečně účinnou na všechna stadia askaridií (E n i g k, 1969). Doporučené dávkování piperazinadipátu se pohybuje v rozmezí 200 až 500 mg kg⁻¹ živé hmotnosti; zvolili jsme horní hranici, kterou B i k o r j k o v (1967) ověřil jako vysoce účinnou při tzv. „tkáňové fázi“ askaridiózy. Dávka 50 mg metrifonátu na 1 kg živé hmotnosti je převzata ze způsobu dávkování při heterakidóze (E n i g k, 1969).

Ze srovnání průběhu umělé invaze v prvním a druhém roce konání pokusů vyplývá, že se nám nepodařilo ani při zachování stejných metodických postupů získat stejný obraz invaze askaridiemi, představovaný zde nálezy škrkavek u kontrolních skupin a rozsahem histopatologických změn. V roce 1970 probíhala invaze mnohem intenzivněji než v roce 1971. Nemůžeme zatím označit příčinu této skutečnosti. Zdá se ovšem, že uvedený jev ovlivnil úroveň terapeutické účinnosti sledovaných látek. Při slabším průběhu invaze se pohybovala extensefektivnost tetramisolu v rozsahu 56 až 100 %, zatímco při silnějším průběhu invaze byla EE tetramisolu pouze 20 %. Podobně piperazin vykazoval u starších kuřat při slabším průběhu invaze v roce 1971 extensefektivnost 17 až 67 %, v roce 1970 byl při silnější invazi neúčinný.

Zajímavé je i porovnání terapeutické účinnosti mezi skupinami kuřat invadovanými askaridiemi v časnějším věku (5 dnů) se skupinami invadovanými později (36 a 48 dnů). Nápadná je tu např. dobrá účinnost piperazinu u starších kuřat a naprostá neúčinnost u kuřat mladších.

Hodnocením nálezů škrkavek jsme dále zjistili, že po léčbě metrifonátem se objevily u tří z pěti skupin významně vyšší nálezy škrkavek ve srovnání se skupinami kontrolními. Interval mezi léčebným zásahem a helmintologickou pitvou, kdy jsme počty škrkavek zjišťovali, byl pouze 48 hodin. Předpokládáme, že aplikací metrifonátu byly narušeny obranné mechanismy hostitele, které u kontrolních kuřat v uvedeném časovém rozpětí snížily počty škrkavek. U léčených kuřat k tomuto jevu poškození zřejmě nedošlo.

Literatura

BIKORJUKOV, A. A.: Izučeniye dějstviya piperazina na ličinek i molodych askaridij v kišečnike cypljat. [Dissertacija.] Leningrad 1967. Vsesojuz. nauč. issled. inst. po boleznam ptic.

ENIGK, K.: Behandlung und Vorbeuge des Helminthenbefalls beim Hausgeflügel. Die tierärztl. Wschr., 76, 1969, č. 3, s. 64-68.

HOVORKA, J.: Helmintologická diagnostika. Vydavatelstvo SAV, Bratislava 1954.

JEGIZBAJEVA, CH. I.: Chlorofos pri kišečných gelmintozach pticy. Veterinarija, 8, 1969, s. 50-51.

KOŠKINA, L. A.: K voprosu ob izmeneniji i pronicajemosti kutikuly *A. galli* v zavisimosti ot fiziologičeskogo sostojanija organizma chozjajina. Trudy VIGIS, XVII, 1971, s. 165-167.

LEBDUŠKA, J. — POLÁKOVÁ, M.: Výzkum nových vhodnějších prostředků a postupů pro prevenci a léčbu parazitárních chorob, zvláště se zřetelem na anthelmintika a na novou technologii chovu hospodářských zvířat. [Závěrečná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1964.

NEPOKLONOV, A. A. — TALANOV, G. A.: O metodach registracii effektivnosti primeněnija insekticidov pri borbe s podkožnymi ovodami krupnogo rogatogo skota. Veterinarija, 3, 1966, s. 58-60.

PAVLOV, A. V.: Pronicajemost kutikuly i transport vėščestv čerez něgo u nematod. Trudy VIGIS, XVII, 1971, s. 159-164.

POLÁKOVÁ, M.: Zamořenost hrabavé drůbeže askaridiózou a její chemoprophylaxe. [Kandidátská disertační práce.] Brno 1964. — Výzkumný ústav veterinárního lékařství.

Došlo dne 19. 12. 1972

ПАВЛИЧЕК Й., ДЫКОВА И. (Паразитологический институт ЧСАН, Прага, Чехословакия). Лечение искусственной инвазии *Ascaridia galli* у цыплят разного возраста тетраметисолом, пиперазином и метрифонатом. Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 353-358, 1976.

Изучалась антигельминтная эффективность однократного внутреннего применения тетраметисола (40 мг на 1 кг живого веса), пиперазина (500 мг на 1 кг живого веса) и метрифоната (50 мг на 1 кг живого веса) при искусственной инвазии *Ascaridia galli*. В разном возрасте (6, 36 и 48 дней) мы однократно инвадировали 118 цыплят породы леггорн белый дозой 3000 или 1500 инвазионных яиц. На пятнадцатый день после инвазии мы давали оценку интенсивности и экстенсивности лечебного мероприятия изучаемых веществ, а именно, по нахождению аскарид при гельминтологическом вскрытии, осуществляемом спустя 48 часов после терапии. Сравнивалось число аскарид в опытных группах с соответствующими контрольными. Гистологическим обследованием изучалась реакция тканей в кишках, печени, селезенке, почках, сердце и мозгу. Показалось, что самым эффективным является тетраметисол. Интенсивность у цыплят разного возраста достигала 89—100 %. Пиперазин обладал хорошей эффективностью у более старых по возрасту цыплят (61—83 %), у цыплят помоложе он был абсолютно неэффективным. Процент интенсивности у метрифоната был почти нулевым. Экстенсивность тетраметисола колебалась в пределах 20—100 % (низкие величины при более бурном процессе инвазии) пиперазин имел 17—67 ЕЕ только у старших цыплят при слабой инвазии, в ином случае она была нулевой. Метрифонат был абсолютно неэффективным. Отражение аскаридоза в реакции ткани хозяина проявилось в грануломатозных изменениях в слизистой кишок, в размножении гистиоцитарных элементов и плазматических клеток воспалительными лимфоцитарными инфильтратами в паренхиме печени.

аскаридоз куринных; тетраметисол; пиперазин; метрифонат; экстенсивность и интенсивность; реакция ткани хозяина

PAVLÍČEK J., DYKOVÁ I. (Parasitological Institute of the Czechoslovak Academy of Sciences, Praha, Czechoslovakia). The Tetramisol, Piperazine, and Metriphosphate Treatment of the Artificial Invasion by *Ascaridia galli* in Chickens of Different Age. Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 353-358, 1976.

The authors studied the anthelmintic effectiveness of a single peroral application of tetramisol (40 mg per 1 kg l. w.), piperazine (500 mg per 1 kg l. w.) and metriphosphate (50 mg per 1 kg l. w.) in the artificial invasion by *Ascaridia galli*. A set of 118 chickens of the White Leghorn breed were subjected to a single invasion by 3000 or 1500 invasive eggs at the age of 6, 36, and 48 days. The intensiveness and extensiveness of the treatment with the tested preparations were examined on the fifteenth day after invasion; the examination was based on the findings of ascarids in the helminthological dissection performed 48 hours after therapy. The numbers of ascarids in the tested animals were compared with those in the controls. A histological examination was carried out to study the tissue reaction in the intestine, liver, spleen, kidneys, heart, and brain. Tetramisol showed the highest effectiveness. The intensiveness of this substance reached 89—100 % in young as well as older chickens. Piperazine had a good effectiveness in older chickens (61—83 %); in young chickens it was entirely ineffective. The intensiveness percentage of metriphosphate was almost at a zero level. The extensiveness of tetramisol ranged between 20 and 100 % (the low values are characteristic of a severe course of invasion). Piperazine showed an extensiveness ranging from 17 to 67 % only in older chickens in cases of a mild invasion; otherwise it was equal to zero. Metriphosphate was entirely ineffective. The reflection of ascaridiasis in the tissue reaction of the host manifested itself as granulomatous changes in intestinal mucous membrane, as multiplied histiocytic elements and plasma cells, and inflammatory lymphocytic infiltrates in the liver parenchyma.

ascaridiasis of domestic fowl; tetramisol; piperazine; metriphosphate; intensiveness and extensiveness of therapy; tissue reaction of the host

PAVLÍČEK J., DYKOVÁ I. (Parasitologische Anstalt der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Praha, Tschechoslowakei). Therapie der künstlichen Invasion von *Ascaridin galli* bei verschieden alten Küken mit Applikation von Tetramisol, Piperazin und Metrifonat. Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 353-358, 1976.

Wir untersuchten den anthelminthischen Effekt einer einmaligen peroralen Applikation von Tetramisol (40 mg je 1 kg Lebendmasse), Piperazin (500 mg je 1 kg Lebendmasse) und Metrifonat (50 mg je 1 kg Lebendmasse) bei künstlicher *Ascaridia-galli*-Invasion. In verschiedenem Alter invadierten wir einmalig 118 Kücken der Weißen Leghornrasse, wobei wir Gaben von 3000 oder 1500 Invasionseiern benutzten. Am 15. Tag nach der Invasion bewerteten wir die Intenseffektivität und die Extenseffektivität der therapeutischen Applikation der untersuchten Präparate, und zwar je nach dem Befund von Spulwürmern bei der helminthologischen Sektion in 48 Stunden nach der Therapie. Wir verglichen die Anzahl der Spulwürmer bei den Versuchsgruppen zu den Kontrollgruppen. Bei der histologischen Untersuchung verfolgten wir die Gewebereaktion im Darm, in der Leber, der Milz, den Nieren, dem Herz und Hirn. Als wirksamstes Präparat erwies sich das Tetramisol. Die Intenseffektivität erreichte bei jüngeren und älteren Kücken 89 bis 100 %. Piperazin wies eine gute Wirkung bei älteren Kücken (61–83 %) auf, während es bei jüngeren Kücken ganz unwirksam war. Der Prozentsatz der Intenseffektivität beim Metrifonat war fast gleich Null. Die Extenseffektivität des Tetramisols bewegte sich in den Grenzen von 20 bis 100 % (niedrige Werte bei stärkerem Invasionsverlauf), während das Piperazin 17 bis 67 % nur bei älteren Kücken und schwächerer Invasion und sonst eine Null-EE aufwies. Das Metrifonat war ganz unwirksam. Die Gewebereaktion des Wirtes bei der Askariose äußerte sich durch granulomatöse Veränderungen in der Darmschleimhaut, Vermehrung der histiozytären Elemente und Plasmazellen durch entzündliche lymphozytäre Infiltrate im Leberparenchym.

Askaridiose beim Haushuhn; Tetramisol; Piperazin; Metrifonat; Extenseffektivität und Intenseffektivität der Therapie; Gewebereaktion des Wirtes

Adresa autorů:

MVDr. Jiří Pavlíček, MVDr. I. Dyková, Parasitologický ústav ČSAV, Praha

MORFOLOGICKÁ STUDIE 70 PŘÍPADŮ BRUCÉLOZY ZAJÍCŮ VYVOLANÉ ZÁRODKY *BRUCELLA SUI*S

J. Vítovec, P. Vladík, Z. Záhoř, V. Slabý

Státní veterinární ústav, České Budějovice
Okresní veterinární zařízení, Písek

VÍTOVEC J., VLADÍK P., ZÁHOŘ Z., SLABÝ V. *Morfologická studie 70 případů brucelózy zajíců vyvolané zárodky Brucella suis*. Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 359-368, 1976.

Popisuje se 70 případů morfologicky rozvinuté brucelózy zajíců. Z nich 25 případů bylo ověřeno kultivačně a původce byl určen jako *Brucella suis*. U samic bylo sledováno 57 případů, u samců 13 případů. Brucelóza zajíců se vyznačovala chronicitou, nápadnou lokální progresí a převahou patologických změn v pohlavním aparátu u obou pohlaví. Samci měli změny především ve varlatech. U samic byla zvláště typická uzlovitá, solitární i četná ložiska v parametru při stěně děložní. Při hematogenní propagaci brucelózy byla nejčastěji postižena játra a slezina, ve kterých byly časté nápadně velké uzly s nepravidelnými okraji jako následek růstu ložisek apozicí. Mikroskopickou podstatou brucelózních změn byly granulomy histiocytárního charakteru s nápadně malou pyogenní složkou, prostoupené nekrózou kaseózního typu, bohatou na lipoidy. Ve srovnání s tuberkulózou je v brucelózním granulomatózním zánětu u zajíců nápadná buněčná i jaderná variabilita v histiocytární vrstvě granulomů, převážně karyolytický rozpad buněčných elementů, častý nálezy eosinofilů a nekonstantní výskyt obrovských, vícejaderných elementů typu Langhansových buněk.

zajíc; brucelóza; *Brucella suis*; granulom

Mezi závažné choroby s přírodní ohniskovostí patří brucelóza zajíců, která byla během posledních 30 let zjištěna v mnoha evropských zemích. Zatím byla popsána v Dánsku (Bendtsen aj., 1956), ve Francii (Jacocot a Vallée, 1954; Joubert aj., 1956; Goyon, 1958), Holandsku (Dorssen, 1957), Jugoslávii (Valentincic, 1964), Maďarsku (Kardeván a Kemenes, 1961), NDR (Becker, 1963; Fenske, 1963), NSR (Fritzsche, 1956), Polsku (Hay, 1960; Tropilo, 1967; Losiński aj., 1972), Rumunsku (Tudoríu aj., 1958), Sovětském svazu (Remencovová, 1959) a ve Švýcarsku (Roux a Bouvier, 1946; Burgisser, 1949). V našich podmínkách se brucelózou zajíců zabýval především Nižnánský (1956, 1958, 1962), který také v řadě prací přispěl zejména k otázkám bakteriologie brucelózy. Klimša (1965) a v poslední době Handl a Beneš (1974) věnovali pozornost především epizootologickým aspektům této choroby.

Z hlediska morfologie jen některé práce vynikají rozsahem materiálu

a kvalitou zpracování. V tomto smyslu patří mezi stěžejní práce popis 15 případů brucelózy u zajíců, který uveřejnili v Dánsku Bendtsen aj. (1956). Podrobný popis makroskopických změn v početnějším materiálu uvádějí Burgisser (1949), Nižnánsky aj. (1958), Fenske (1963) a Tropilo (1967). Otázkami histopatologie brucelózy se zabýval detailně Becker (1963).

Účelem naší práce bylo porovnat naše výsledky s výsledky práce těch nemnoha autorů, kteří se zabývali především otázkami morfologie brucelózy zajíců. Domníváme se, že nás relativně početná sestava opravňuje ke srovnání i k některým závěrům.

MATERIAL A METODY

Kasuistiku našeho sdělení tvoří 70 námi vyšetřených případů morfologicky rozvinuté brucelózy zajíců. V sestavě bylo 57 zvířat samičího pohlaví a 13 zvířat samčího pohlaví. Materiál odebraný k histologickému vyšetření jsme fixovali v 10% formolu a zpracovali jej běžnými histologickými postupy. Histologické preparáty jsme barvili v hematoxylin eosinu, podle Van Giesona a podle Grama. K průkazu vápenných substancí jsme použili metody podle Kossy, retikulinová vlákna jsme impregnovali podle Gomoriho. Šarlachem R jsme barvili lipidy. Kultivačně jsme ověřili 43 případy. Izolovali jsme zárodky rodu *Brucella*, které jeden z nás (P. V.) blíže identifikoval jako *Brucella suis*. O problémech bakteriologie pojednáváme na jiném místě.

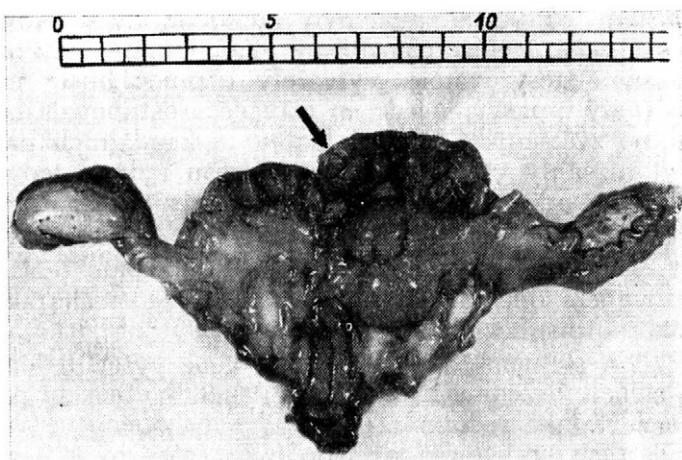
VÝSLEDKY

U samic jsme vyšetřili celkem 57 případů. Z hlediska topografického rozložení změn byl nejčastěji postižen pohlavní aparát (41X, tj. 71,9 % všech vyšetřených případů u samic), následovala slezina (21X, tj. 36,8 %), játra 16X (28,1 %), plíce 8X (14 %), podkoží 6X (10,5 %) a mízní uzliny 3X (5,3 %).

V pohlavním aparátu byly dvojí změny. Jednak to byly změny vázané na dělohu (18 případů, tj. 31,6 %), jednak solitární nebo četná brucelózní uzlovitá ložiska uložená v mesometriu a především v parametriu (23 případy, tj. 40,4 %). V devíti případech byl v luminu těla a rohů děložních (ve čtyřech případech dosahovaly až síly tužky) nápadně vodnatý, někdy mléčně zakalený exsudát s ojedinělými drobnými vločkami žluté barvy. Stěna dělohy byla povšechně zesílená, sliznice byla mohutně překrvená, ve dvou případech byly v endometriu četné drobné uzlíky, které se vyklenovaly pod sliznicí. Druhým anatomickým typem změn souvisejícím s pohlavním aparátem samic byly solitární a častěji četné uzly uložené především při úponu parametria ke stěně rohů děložních, méně časté byly uzly v mesometriu (obr. 1). Některá uzlovitá ložiska byla na pohmat tuhá, jiná byla konfluentní, v jejich obsahu byly mazlavé nekrotické hmoty vzhledu sýrovité nekrózy, šedožluté až žlutozelené barvy. Ve čtyřech případech uzly prostupovaly stěnou dělohy a ulcerovaly na

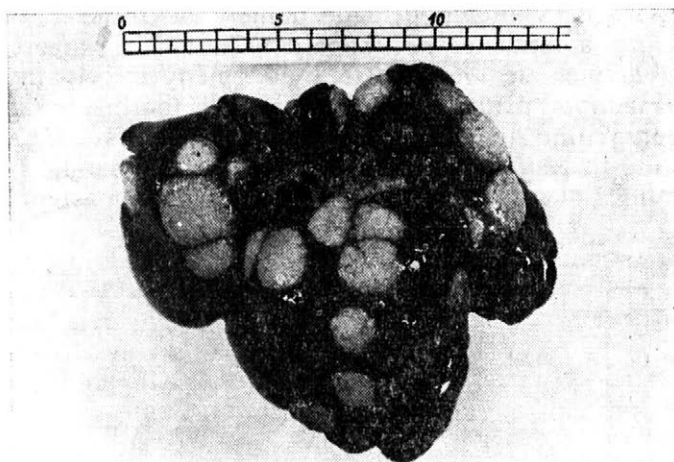
sliznici. Ložiska v parametriu a mesometriu nebyla nikdy nalézána souběžně s popsanou hydrometrou a mukometrou.

1. Uzlovitá ložiska brucelózy v mesometriu a parametriu. Typická je lokalizace uzlů v parametriu při stěně děložní (šipka)



Při hematogenní propagaci infekce byla z parenchymatózních orgánů nejčastěji postižena játra a slezina. V játrech byl anatomický nález pestrý, kolísal od řídkého, nepravidelného výsevu drobných i větších uzlíků špinavé žluté barvy až po izolované, solitární nebo častěji četné uzly morušovitého vzhledu, které dosahovaly maximálně až velikosti $2 \times 2 \times 2$ cm (obr. 2). Uzly nebyly zřetelně opouzdřené a nejčastěji obsahovaly mazla-

2. Velkouzlová forma brucelózy jater



vou, sýrovitou hmotu žlutošedé až žlutozelené barvy. Jen v některých lézích byly sýrovité hmoty při periferii zahuštěné a v centru nekroticky kolikovvané. Játra byla i při velkouzlových formách nezvětšená nebo jen mírně zvětšená, naproti tomu slezina byla v takových případech mnohonásobně zvětšená a rozměry ložisek sýrovitých nekrotéz byly ve srovnání s jaterními lézemi podstatně větší.

Plicní změny vyvolané brucelózou ležely téměř výhradně na kostální

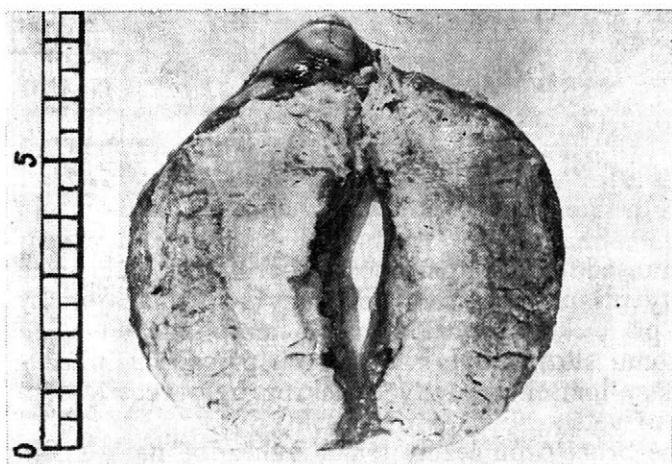
ploše diafragmatických laloků. Ložiska se plošně vyklenovala pod napjatou pleurou a při jejich periferii byl často hemoragický lem.

Uzlinové změny jsme pozorovali jen ve třech případech (5,3 %). Místem lokalizace změn byly mízní uzliny v páni a mízní uzliny para-aortální. Brucelózou postižené mízní uzliny byly mnohonásobně zvětšené, masivně zesýratělé, vytvářely růženec hustě nakupených uzlů, nebo splývaly v paket. V jednom případě prostupovala brucelózní infekce z mohutně zvětšených mízních uzlin do kaudálních partií pravé ledviny, kde byl rozsáhlý vřed prostupující korou i dření ledviny do pánvičky. V jiném případě byly navíc postiženy mízní uzliny bronchomediastinální.

V šesti případech (10,5 %) byla zesýratělá, ojedinělá i četná ložiska brucelózy v podkoží. Někdy jsme tato ložiska nalézali při generalizovaném onemocnění, jindy měla ložiska charakter izolovaného brucelózního onemocnění situovaného jen v podkoží.

Ve stejném časovém období jsme vyšetřili jen 13 případů brucelózy u samců. V sedmi případech (tj. 53,8 % všech případů celkem) byla postižena varlata, sedmkrát (53,8 %) byly změny ve slezině, pětkrát (38,5 %) v játrech, v jednom případě bylo solitérní ložisko v podkoží a jednou bylo relativně velké ložisko (5 × 4 × 4 cm) ovoidního tvaru v mesenteriu.

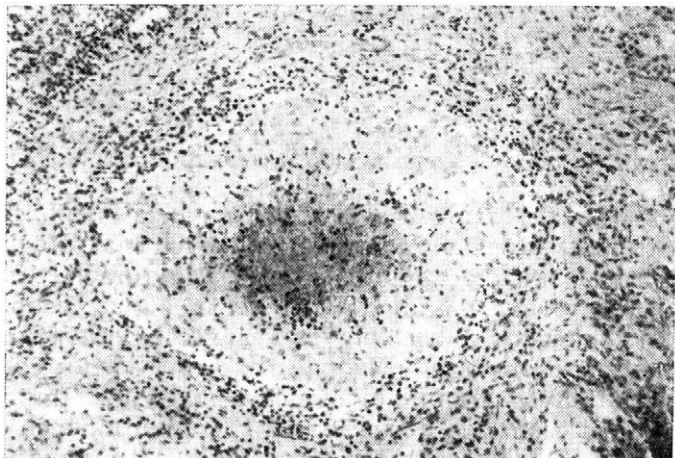
V samčích pohlavních orgánech se brucelózní změny lokalizovaly především ve varlatech, méně časté bylo postižení nadvarlat, přídatných pohlavních žláz, provazce semenného a někdy se infekce propagovala i do dutiny šourku. V našich případech byla varlata postižena oboustranně, i když někdy s různou intenzitou změn. Varlata byla zpravidla mohutně zvětšená, v některých případech byla na řezné ploše na místě parenchymu jen homogenní, suchá, nekrotická hmota šedožluté nebo šedozelené barvy (obr. 3), v jiných případech měly nekrotické hmoty vzhled sýrovité nekrózy s tendencí ke zkapalnění a tvorbě kaveren po jejich sekvestraci. Obdobné, ale méně časté byly změny v přídatných pohlavních žlázách. V jednom případě jsme pozorovali totální nekrotickou kolikvaci celého pohlavního aparátu. Změny v játrech, ve slezině a v podkoží byly v podstatě totožné s těmi, které popisujeme u samic. Ložisko v mesenteriu dosahovalo velikosti slepičího vejce a bylo masivně zesýratělé.



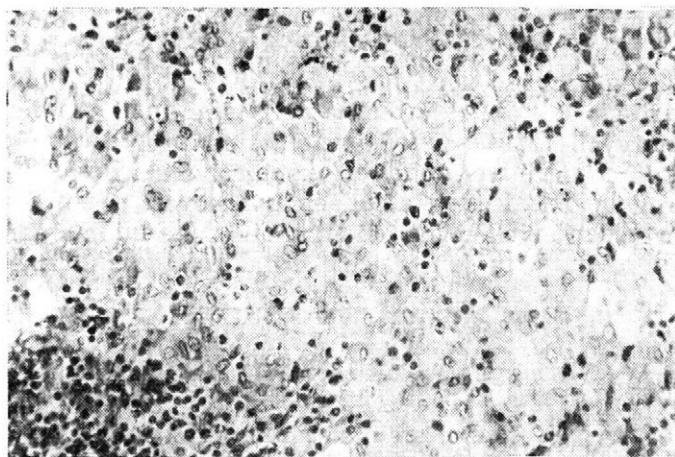
3. Totální koagulační nekróza parenchymu varlete

Mikroskopický obraz brucelózy zajíců byl v našich případech do značné míry uniformní. Základem byl granulom, který v typické formě tvořila ze zevnějšku úzká, někdy jen naznačená vrstva lymfocytů, plazmatických buněk a fibroblastů. K této periferní zóně přiléhala směrem dovnitř souvislá vrstva histiocytů se světlými okrouhlými, ovoidními či protáhlými jádry a včelku objemným, lehce eosinofilním a jemně granulárním plazmatem (obr. 4, 5). V úzké vrstvičce přiléhající k nekróze měly

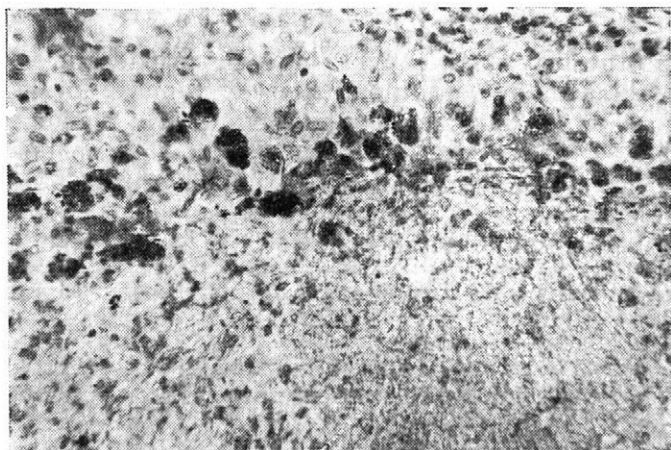
4. Brucelózní histiocytární granulom s centrální nekrózou. Na periferii granulomu je úzký lymfoplazmocytární lem. HE, 150×



5. Histiocytární vrstva téhož granulomu ve větším zvětšení. Histiocyty mají světlá jádra a lehce eosinofilní, jemně granulární plazma. HE, 400×

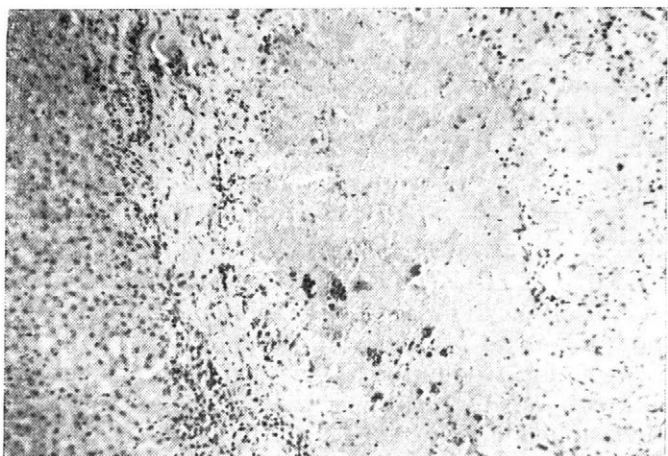


některé histiocyty vzhled lipofágů s pěnitým plazmatem, které v Šarlachu obsahovalo hojné kapénky lipidů (obr. 6). V některých granulomech se histiocyty vyznačovaly značnou jadernou variabilitou, v jiných byla jádra histiocytů vysunuta na periferii buněk. Centrální partie granulomatózních struktur prostupovala ložiska nekrotizace skládající se z homogenních nekrotických hmot, často s nápadně malou příměsí jaderného detritu (obr. 7). V nekrotizacích byly hojné kapénky lipidů, kterých přibývalo směrem k histiocytární vrstvě, při které kapénky tuku vytvářely často souvislý lem. V některých miliárních uzlících v játrech, uložených bez jakékoli



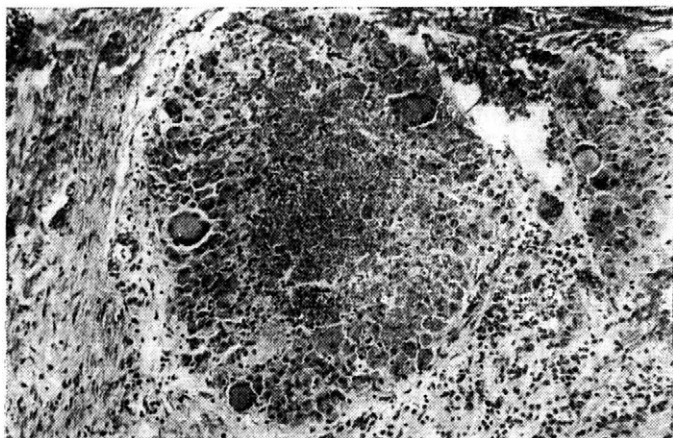
6. Drobné kapénky lipidů v plazmatu histiocy-
tů uložených v gra-
nulomech při nekróze.
Sarlach R, 400X

topografické lokalizace, nekróza chyběla, nebo byla jen naznačená po nekrotické přeměně centrálně uložených makrofágů. Pyogenní složka byla v brucelózních granulomatózních strukturách nápadně malá. Neutrofilové se vyskytovaly v granulomech jen ojediněle, nebo zcela chyběly. Eosinofilní leukocyty se vyskytovaly ve všech vrstvách granulomů s nevelkou periferní fibrotizací. Naopak nápadně málo eosinofilů bylo v dobře opouzdřených granulomatózních strukturách. Impregnační lze v nekrózách prokázat často dobře zachovalou síť retikulinových vláken. Jen v některých případech byla v histiocytární zóně granulomatózních struktur příměs obrovských, vícejaderných buněk Langhansova typu (obr. 8). Výraznější fibrotizaci až jizvení jsme pozorovali jen v některých případech, a to výhradně ve varlatech a v brucelózních lézích v parametriu a mezometriu. V těchto lézích jsme také nalézali depozita vápenatých solí v centrálních partiích nekróz. V játrech a ve slezině bylo pro větší léze typické splývání čerstvých ložisek s ložisky staršími při postupu chorobného procesu do okolí s nevelkou tendencí k fibróznímu opouzdření. Ve varlatech jsme v méně pokročilých změnách pozorovali šíření infekce porogenní cestou. Ve vyšetřených dělohách byl nález granulomatózního zánětu endometria výjimkou, a to jen v těch případech, kde se parametriální uzlovitá lo-



7. Amorfní nekrotické
hmoty s nápadně ma-
lou příměsí jaderné drti
ve větší brucelózní ja-
terní lézi. HE, 200X

8. Vícejaderné obrovské elementy typu Langhansových buněk v histiocytární zóně granulomu. Histiocyty mají tmavá, pleomorfní jádra vysunutá na periferii buněk. HE, 200×



žiska provalila na sliznici. V ostatních případech, včetně případů s hydrometrou a mukometrou, šlo o nespecifickou, chronickou endometritidu se zánětlivým infiltrátem ve sliznici pod epitelem složeným převážně z lymfocytů a plazmatických buněk.

DISKUSE

V našich případech měla brucelóza zajíců vyvolaná zárodky *Brucella suis* charakter chronického, převážně lokálně progredujícího onemocnění, u obou pohlaví se zřetelnou převahou změn v pohlavním aparátu. Mikroskopickou podstatou změn byly histiocytární granulomatózní struktury s nekrózou kaseózního typu. V makroskopickém nálezu byla pro brucelózu parenchymatózních orgánů zajíců typická rozsáhlá ložiska zesýrovatění s nevelkou tendencí ke zkapalnění nebo k inspizaci a kalcifikaci nekrotických hmot.

Porcinní brucelóza zajíců má při běžně přicházejícím protrahovaném průběhu řadu morfologických podobností s tuberkulózou, jak upozorňuje Becker (1963). V diferenciální diagnóze považujeme za nutné při brucelóze zajíců zdůraznit buněčnou i jadernou variabilitu histiocytů v granulomech, převážně karyolytický nekrotický rozpad buněčných elementů, jak o tom svědčí nápadně malá příměs jaderné drti v nekróze a konstantní výskyt eosinofilů v nepříliš výrazně opouzdřených granulomatózních strukturách. Také nálezy obrovských, vícejaderných elementů typu Langhansových buněk nebyly v našem materiálu nijak časté, i když je třeba poznamenat, že Bendtsen aj. (1956) a Becker (1963) je nalézali v brucelózních granulomech běžně.

Naše nálezy jsou co do anatomického rozložení změn do značné míry podobné popisům, které uvádějí Bendtsen aj. (1956). Při hematogenní propagaci brucelózy jsou nápadně často postižena játra a slezina, což souhlasí s výsledky experimentálních studií, ve kterých Braude a Spink (1951) prokázali prvořadý význam elementů RES v játrech a ve slezině při obraně organismu proti brucelózní infekci. V žádném případě jsme nezjistili brucelózní změny ve vaječnících, jak je popisují Nižnánsky aj. (1958) a Klimša (1965). V souhlasu s Fen-

s k e m (1963) jsme pozorovali predilekci plicních změn při brucelóze převážně na kostální ploše diafragmatických laloků.

K šíření brucelózy lymfatickou cestou nedochází pravěpodobně příliš často, soudě podle ne příliš častých popisů uzlinových změn. V našich případech u samic jsme celkem vzácně pozorovali masivní zesýrovatění mizních uzlin v páni a v mizních uzlinách paraaortálních a myslíme si, že k šíření uzlinového procesu docházelo spíše *per continuitatem* z ložisek brucelózy v mesometriu. To by také mohlo v našem materiálu vysvětlit absenci takto lokalizovaných uzlinových změn u samců.

Zvláště významný a do značné míry typický je makroskopický nález v pohlavních orgánech. U samců má brucelóza ráz izolované, ale progresivní orchitidy, při které tkáň varlat nahrazuje zahuštěná amorfní hmota suchého vzhledu, popřípadě varlata podléhají totální nekrotické kolikvaci. U samic je pozoruhodná nápadně častá přítomnost solitárních nebo četných brucelózních uzlovitých ložisek v mesometriu a zvláště typická je jejich lokalizace v parametriu při děložní stěně, kde jen zřídka ulcerují na sliznici. Lze soudit, že tato ložiska vznikají přestupem infekce ze zánětu v děloze a zůstávají zdrojem infekce. Zdá se, že tato ložiska jsou pro brucelózu zajců typická. Je zajímavé, že na jejich nápadně častý výskyt upozorňují jen B e n d t s e n a j. (1956), kteří jim přikládají velký význam v diferenciální diagnóze od pseudotuberkulózy a stafylokokózy.

Souhlasíme s B e c k e r e m (1963), který upozorňuje na nehnisavý charakter brucelózního granulomatózního zánětu. Z nesprávné představy o pyogenním charakteru těchto změn pak vyplývají chyby v používané nomenklatuře, které jsou pravděpodobně výsledkem neznalosti mikroskopické podstaty zánětlivého procesu při brucelóze zajců.

Poděkování: Za technickou spolupráci děkujeme P. Miláčkovi.

Literatura

- BECKER, C. H.: Zur Histopathologie und Differentialdiagnose der *Brucella suis* Infection bei natürlich infizierten Hasen. Zentbl. allg. Path., 105, 1963, s. 486-490.
- BENDTSEN, H. — CHRISTIANSEN, M. — THOMSEN, A.: *Brucella suis* Infection in Hares as the Cause of Enzootic Brucellosis in Pigs. Nord. VetMed., 8, 1956, s. 1-34.
- BRAUDE, A. I. — SPINK, W. W.: Studies in the pathology and pathogenesis of experimental brucellosis. III. Investigations pertaining to the function of the spleen. J. infect. Dis., 89, 1951, s. 272-276.
- BURGISSER, H.: Nouveaux cas de Brucellose chez les lièvres. Schweiz. Arch. Tierheilk., 91, 1949, s. 273-276.
- DORSEN, C. A.: Kot ook in Neederland bruceloose bij de haas voor. 82, 1957, s. 680-685.
- FENSKE, G.: Untersuchungen über Brucellose bei Hasen. Mh. VetMed., 18, 1963, s. 380-390.
- FRITZSCHE, R.: Die Hasenbrucellose in Rheinland-Pfalz. Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 69, 1956, s. 301-307.
- GOYON, M.: Nouveau cas de Brucellose du lièvre à *Brucella suis*, type danois. Recl. Méd. vét., 134, 1958, s. 533-541.
- HANDL, R. — BENEŠ, S.: K problematice diagnostiky brucelózy prasat. Veterinářství, 24, 1974, s. 413-414.
- HAY, J.: Brucelozja zajecy w Polsce. Medycyna wet., 16, 1960, s. 577-581.
- JACOCOT, H. — VALLÉE, A.: Quelques considérations sur la brucellose du lièvre

- a propos de huit cas identifiés en France. *Annls Inst. Pasteur, Paris*, 87, 1954, č. 2, s. 218-220.
- JOUBERT, L. — VALENTIN, F. — PONCET, L.: Orchite brucellique bi-latérale à *Brucella abortus* chez un lièvre. *Bull. Soc. Sci. vét., Lyon*, 58, 1956, s. 17-24.
- KARDEVÁN, A. — KEMENES, F.: A mezei nyulak brucellosis hazánkban. *Magy. Állatorv. Lap.*, 16, 1961, s. 59-61.
- KLIMŠA, R.: Brucelóza zajíců v Jihomoravském kraji v letech 1953 až 1964. *Veterinářství*, 15 1965, s. 449-452.
- LOSIŃSKI, T. — CHWALIBÓG, J. — KEMPSKI, W. — LEWKOWICZ, H. — OWA-DIUK, Z. — WIŚNIEWSKI, B.: Badania nad brucelozą zajecy. *Medycyna wet.*, 28, 1972, s. 331-334.
- NIŽNANSKY, F. — GMITTER, J. — OFÚKANÝ, L.: Príspevok k epizootológii a prírodnej ohniskovosti brucelózy poľných zajacov. *Vet. Čas.*, 5, 1956, s. 81-89.
- NIŽNANSKY, F. — GMITTER, J. — OFÚKANÝ, L.: Biologické vlastnosti brucelových kmeňov izolovaných v ČSR. II. časť. Ich výskyt u zajacov na Slovensku a výsledky typizácie. *Vet. Čas.*, 7, 1958, s. 3-17.
- NIŽNANSKY, F.: Prírodné zdroje brucel u zajacov. *Vet. Čas.*, 11, 1962, s. 15-22.
- REMENCOVOVÁ, M. M.: Bruceloz zajcev. *Veterinarija*, 36, 1959, č. 11, s. 26-28.
- ROUX, L. — BOUVIER, G.: Brucellose chez le lièvre. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 88, 1946, s. 507-519.
- TROPILO, J.: Rozpoznávání brucelozy zajecy na podstawie ogledzin poubojowych. *Medycyna wet.*, 23, 1967, s. 422-426.
- TUDORIU, C. D. — JONICA, C. S. — GAROIU, M. — CENRI, J. — VOLINTIR, V.: Probleme der Epizootologie, Microbiologie, Immunologie, Anatomie. In: *Patologica si Patologie generala*. VIII Editura Agro Silvica de Stat., Bucuresti 1958.
- VALENTINCIC, S.: Beitrag zur Kenntnis der Epizootologie der Brucellose beim Feldhasen. *Z. Jagdwiss.*, 10, 1964, s. 9-19.
- WILLINGER, H.: Brucellose bei Feldhasen in Österreich. *Wien. tierärztl. Mschr.*, 47, 1960, s. 661-669.

Došlo dne 8. 7. 1975

ВИТОВЕЦ Ё., ВЛАДИК П., ЗАГОРЖ З., СЛАБЫ В. (Государственный ветеринарный институт, Ческэ Будейовице; Районный ветеринарный пункт, Писек, Чехословакия). Морфологическое изучение 70 случаев бруцеллеза зайцев, вызванного зародышами *Brucella suis*. *Vet. Med. (Praha)* 21 (6) : 359-368, 1976.

Описывается 70 случаев морфологически развитого бруцеллеза зайцев. 25 из них проверялись при помощи культивации, а носителем был установлен *Brucella suis*. У самок изучалось 57 случаев, у самцов 13 случаев. Бруцеллез зайцев отличался хроничностью, заметной локальной прогрессией и преобладанием патологических изменений в половом аппарате у обоих полов. У самцов изменения наблюдались прежде всего в семенниках. У самок наблюдались особенно типичные узловатые, солитарные и многочисленные очаги в параметрии у влагалищной стены. При гематогенной пропаганде бруцеллеза чаще всего поражались печень и селезенка, где были часто весьма крупные узлы с неправильными краями, как следствие роста очагов и позиций. Микроскопической сущностью бруцеллезных изменений были грануломы гистиоцитарного характера с явно небольшим пиогенным компонентом, пропитанные некрозом казеинного типа, богатым на липиды. По сравнению с туберкулезом в бруцеллезном воспалении у зайцев заметная клеточная и ядерная изменчивость в гистиоцитарном слое гранулом, в большинстве случаев разложение элементов клеток, частое появление эозинофилов и нерегулярное появление крупных многоядерных элементов типа клеток Лангансона.

заяц; бруцеллез; *Brucella suis*; гранулома

VÍTOVEC J., VLADÍK P., ZÁHOR, Z., SLABÝ V. (State Veterinary Institute, České Budějovice; District Veterinary Station, Písek, Czechoslovakia). *Morphological Study of 70 Cases of Brucellosis of Hares Caused by the Germs of Brucella suis*. *Vet. Med. (Praha)* 21 (6) : 359-368, 1976.

Seventy cases of morphologically developed cases of brucellosis in hares are described. Twenty-five of the cases were tested by the cultivation methods and the

causative agent was identified as *Brucella suis*. In females the authors found 57 cases, in males 13 cases. Brucellosis of hares was characterized by a chronic course, by a conspicuous local progression, and by a predominance of pathological changes in the reproductive organs of both sexes. Males showed changes mainly on testes. Nodal, solitary as well as multiple lesions in the parametrium near the uterine wall were particularly typical of females. The hematogenous propagation of brucellosis affected mostly liver and spleen, frequently showing conspicuously large nodes with irregular sides resulting from the growth of the deposits through apposition. The microscopic basis of the changes due to brucellosis was represented by granulomas of histiocytic character with a conspicuously small pyogenic component penetrated by necrosis of a caseous character, rich in lipoids. In comparison with tuberculosis, the brucellosis inflammation in hares shows a conspicuous cellular and nuclear variability in the histiocytic layer of granulomas, prevalent carolytic disintegration of cellular elements, frequent finding of eosinophiles, and non-constant occurrence of giant multinuclear elements of Langhans cell type.

hare; brucellosis; *Brucella suis*; granuloma

VÍTOVEC J., VLADÍK., ZÁHOŘ Z., SLABÝ V. (Staatliche Veterinäranstalt, České Budějovice; Kreisveterinäreinrichtung, Písek, Tschechoslowakei). *Morphologische Untersuchungen von 70 Fällen der von Brucella-suis-Erregern verursachten Brucellose bei Hasen*. Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 359-368, 1976.

Es werden 70 Fälle einer morphologisch entwickelten Brucellose bei Hasen beschrieben. Davon wurden 25 Fälle durch Kultivierung überprüft und der Erreger als *Brucella suis* identifiziert. Bei Hasenweibchen wurden 57 Fälle, bei Hasenmännchen 13 Fälle verfolgt. Die Hasenbrucellose wies eine Chronizität, auffallende lokale Progression und ein Übergewicht pathologischer Veränderungen im Geschlechtsapparat bei beiden Geschlechtern auf. Die Hasenmännchen zeigten Veränderungen vor allem in den Hoden. Bei den Hasenweibchen wurden besonders typische knotenförmige, solitäre und vielfältige Herde im Parametrium an der Gebärmutterwand festgestellt. Bei der hämatogenen Propagation der Brucellose wurden am häufigsten die Leber und die Milz betroffen, wo häufige, auffallend große Knoten mit unregelmäßigen Rändern als Folge des Wachstums der Appositionsherde vorgefunden wurden. Bei der mikroskopischen Untersuchung der brucellosen Veränderungen wurden hauptsächlich Granulome histiozytären Charakters mit einer auffallend kleinen pyogenen Komponente, die von einer reichlich mit Lipoiden durchsetzten Nekrose des Kaseotyps durchdrungen war, festgestellt. Im Vergleich zur Tuberkulose fällt bei der brucellosen Entzündung bei Hasen die Zellen- und Kern-Variabilität in der histiozytären Granulomschicht, der vorwiegend kariolytische Zerfall der Zellelemente, der häufige Befund von Eosinophilen und das unkonstante Auftreten von riesigen, mehrkernigen Elementen des Typs der Langhanschen Zellen auf.

Hase; Brucellose; *Brucella suis*; Granulom

Adresa autorů:

MVDr. J. Vítovec, CSc., MVDr. P. Vladík, Státní veterinární ústav, tř. Obránců míru 79, 371 39 České Budějovice MVDr. Z. Záhoř, CSc., MVDr. V. Slabý, Okresní veterinární zařízení, 397 01 Písek

POROVNANIE CITLIVOSTI REAKCIE VÄZBY KOMPLEMENTU A LATEXFIXAČNÉHO TESTU PRI DÔKAZE MIGRAČNEJ FÁZY ASKARIDÓZY (ASCARIS SUUM) U NEŠPECIFICKÉHO HOSTITEĽA

M. Benková, Z. Borošková

Helmintologický ústav SAV, Košice

BENKOVÁ M., BOROŠKOVÁ Z. *Porovnanie citlivosti reakcie väzby komplementu a latexfixačného testu pri dôkaze migračnej fázy askaridózy (Ascaris suum) u nešpecifického hostiteľa.* Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 369-373, 1976.

Autori porovnali citlivosť reakcie väzby komplementu a latexfixačného testu pri dôkaze migračnej fázy askaridózy u nešpecifického hostiteľa (kráľika). Zistili väčšiu citlivosť latexfixačného testu v priemere o hodnotu jedného riedenia geometrického radu.

reakcia väzby komplementu; latexfixačný test; migračná fáza askaridózy; králik

Dôkaz migračnej fázy askaridózy u ošípaných pomocou sérologických reakcií sa v našich podmienkach zatiaľ nerobí, aj keď má svoj praktický význam pri diferenciálnej diagnostike rôznych ochorení. Súvisí to tak s kvalitou použitého antigénu, ako aj s voľbou vhodnej sérologickej reakcie.

V predkladanej práci sme porovnali citlivosť reakcie väzby komplementu a latexfixačného testu pri dôkaze migračnej fázy u experimentálne invadovaného nešpecifického hostiteľa.

MATERIAL A METÓDA

Antigén sme pripravili z invázných lariev *Ascaris suum*, ktoré sme získali inkubáciou vajíčok helminta v experimentálnych laboratórnych podmienkach podľa Costella (1961). Invázne larvy, izolované od vaječných obalov metódou Haskinsa a Weinsteina (1957), sme deštruovali ultrazvukom po dobu 40 minút pri intenzite 18–19 W cm⁻². Ako vlastný antigén sme použili supernatant získaný centrifugovaním suspenzie dezintegrovaných lariev. Antigén obsahoval 500 mikrogramov bielkovín na 1 ml.

20 králikov (čínčily oboch pohlaví o hmotnosti 2,5–3 kg) sme rozdelili do štyroch skupín. Každú skupinu sme invadovali perorálne sondou rôznymi dávkami invázných vajíčok *A. suum* (150, 1500, 50 000, 100 000 vajíčok na 1 kráľika). Pred pokusom sme všetky zvieratá vyšetrili na prítomnosť protilátok voči antigénu z invázných lariev *A. suum*, ako

aj koprologicky. Do pokusu sme zaradili len tie zvieratá, u ktorých bola vylúčená prirodzená helmintózna invázia a ktoré pred nakazením nedávali pozitívnu sérologickú reakciu. Vybrané skupiny zvierat boli pred pokusom 14 dní pozorované v karanténe.

Od zvierat sme odobrali vzorky krvi 3., 7., 11., 17., 24., 31., 38., 45., 52., 59., 66., 74. a 81. deň po invázii. Séra získané od králikov jednotlivých skupín sme zmiešali.

Protilátky v sére sme zisťovali reakciou väzby komplementu (RVK) podľa Deschiensa a i. (1961) a latexfixačným skúmavkovým testom (LFT) podľa Fischmana (1960) pre vyšetrenie echinokokózy, ktorý sme upravili pre použitie v sérologickej diagnostike askaridózy. V LFT sme použili základnú latexovú suspenziu o veľkosti polystyrénových častíc $0,81 \mu$ (Imuna, n. p., Šarišské Michaľany).

Za pozitívnu kontrolu v sérologických reakciách slúžili hyperimúnne séra, ktoré sme pripravili imunizáciou králikov larválnym antigénom schémou podľa Čermana (1974).

Na preverenie špecificity antigénu sme robili so sérami proti antigénu z invázných lariev *Ascaris suum* skrížené reakcie s použitím antigénov z iných druhov helmintov, a to z lariev *Trichinella spiralis*, zo skolexov *Echinococcus granulosus* (Čerman a i., 1967; Čerman, 1974) ako aj s antigénom z pohlavne zreých *Fasciola hepatica* (Grundlach, 1971).

VÝSLEDKY

Krivky dynamiky protilátok, hodnotené uvedenými sérologickými reakciami, mali paralelný priebeh. Malé rozdiely (o hodnotu jedného riedenia geometrického radu) sme pozorovali v prospech latexfixačného testu, čo je znázornené na obr. 1.

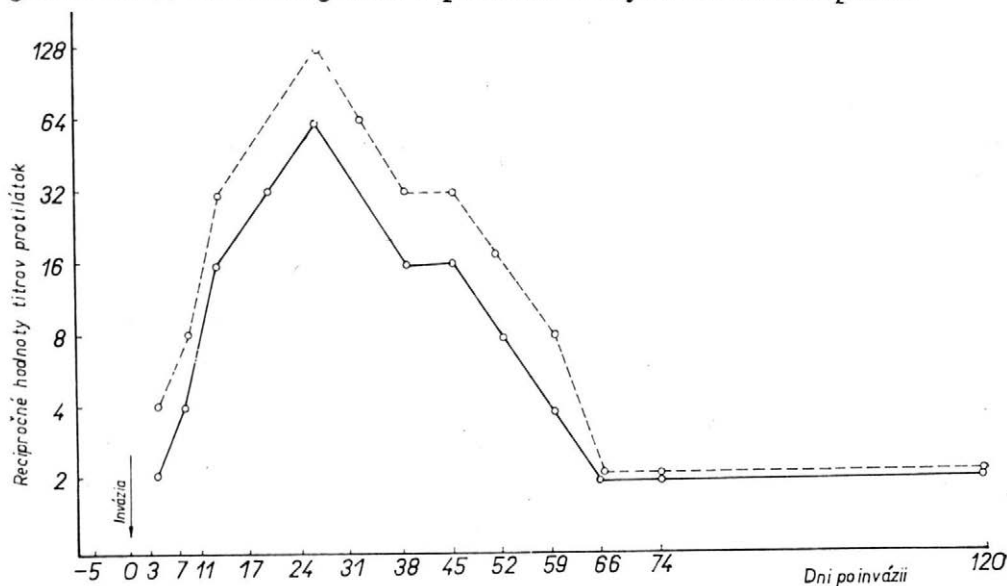
Objavenie sa prvých protilátok sme zaznamenali u všetkých skupín invadovaných králikov tretí deň pomocou obidvoch sérologických reakcií. Titre protilátok však v tomto čase dosahovali nízke hodnoty (1:1, 1:2). Je to v zhode s údajom Taffsa (1964), na rozdiel od iných autorov, ktorí pozorovali prvé protilátky v neskoršom období (Dalín, 1961; Zapart, 1970).

Maximálne hodnoty protilátok sme obidvoma reakciami zaznamenali 24. deň po invázii, a to v RVK 1:64 a LFT 1:128. V ďalšom mala krivka produkcie protilátok, hodnotená obidvoma sérореakciami, paralelný priebeh. Rozdiel hodnoty jedného riedenia geometrického radu bol v prospech LFT až do 66. dňa po invázii, keď obidve reakcie vykazovali zhodné výsledky – spoločnú výšku titrov 1:2, ktoré sa udržali až do skončenia pokusu, t. j. do 120. dňa u všetkých skupín zvierat. Pri najnižších invázných dávkach (150, 1500 vajčiek na králika) sme protilátky obidvoma sérologickými reakciami v celom priebehu dokazovali len v nízkych hodnotách (titre 1:1 – 1:8).

Výška preukazných titrov protilátok bola priamo úmerná veľkosti inváznej dávky, čo bolo dokázané tak inými autormi (Taffs, 1964), ako aj v našej predchádzajúcej práci (Borošková a i., 1974).

V pokusoch krížových reakcií s použitím RVK a LFT sme zistili, že

antigén z invázných lariev *A. suum* je do tej miery špecifický, že nedáva pozitívne reakcie ani so sérami králikov imunizovaných antigénmi z iných druhov helmintov (z lariev *Trichinella spiralis*, zo skolexov *Echinococcus granulosus*), ani s antigénom z pohlavne zrelých *Fasciola hepatica*.



1. Porovnanie citlivosti latexfixačného testu (LFT) a reakcie väzby komplementu (RVK) u králikov (čínčily) experimentálne invadovaných 50 000 vajíčkami *Ascaris suum* na 1 králika

— — — LFT
 ————— RVK

DISKUSIA

Diagnostika postinváznej — migračnej fázy askaridózy ošipáných je zatiaľ ťažko stanoviteľná, pretože sa ochorenie nedá rozpoznať ani klinicky ani koprologicky. Kožné alergické testy (Jeršov a i., 1953; Burdjev a Anikjejev, 1971) a precipitačná reakcia na živých larvách, používané ako v humánnej, tak aj vo veterinárnej medicíne (Lejkina, 1953), nenadobudli väčší praktický význam pri diagnostike včasného štádia škrkavčitosti ošipáných. Obe reakcie sú citlivé, avšak nie dostatočne špecifické a spoľahlivé (Naumyčeva, 1964; Šichobalova a Lejkina, 1966).

Keďže helmintózne ochorenia sú alergózy (Jeršov, 1966), nemožno nespomenúť nebezpečenstvo patologických symptómov pri každých alergických testoch. Aj krížové reakcie často komplikujú výsledky. Preto sa pri imunodiagnostike helmintóz uplatňujú zväčša klasické sérologické metódy (Šichobalova a Lejkina, 1966).

Výsledky našich pokusov ukázali, že latexfixačný test, v porovnaní s reakciou väzby komplementu, je pri dôkaze migračnej fázy askaridózy u nešpecifického hostiteľa citlivejší v priemere o hodnotu jedného riedenia geometrického radu. U obidvoch séroreakcií závisia výsledky od kvality použitého antigénu. Za vhodný pre obidve sérologické reakcie považujeme

antigén pripravený z lariev *in vitro*, lebo v porovnaní s antigénom z po hlavne zreých askaríd spĺňa všetky predpoklady citlivého antigénového materiálu, ktorý neobsahuje látky hostiteľského pôvodu (Borošková a i., 1974). Je špecifický do tej miery, že nedáva krížové séroreakcie s heterológnyimi antigénmi (*E. granulosus*, *T. spiralis*, *F. hepatica*). To však vyžaduje hlbšiu analýzu a porovnanie s antigénmi aj z iných druhov helmintov parazitujúcich na ošipáných.

I keď je latexfixačný test v porovnaní s reakciou väzby komplementu technicky náročný a o niečo citlivejší, jeho použitie pri včasnom rozpoznávaní postinváznej – migračnej fázy askaridózy je potrebné preveriť na špecifickom hostiteľovi. Dôvodom k tomu je častý výskyt zmiešanej invázie u ošipáných, čo značne komplikuje akýkoľvek diagnostický postup. Táto skutočnosť súvisí s antigénnou príbuznosťou systematicky blízkych helmintov (Kent, 1963).

Naše experimenty na nešpecifických hostiteľoch slúžili len ako modelový pokus pre jeho eventuálnu aplikáciu v terénnej praxi, kde škarkavčitosť ošipáných spôsobuje ešte stále značné, i keď nepriame národohospodárske straty. Predmetom našej ďalšej práce bude preskúšať citlivosť oboch metód u prirodzene a experimentálne invadovaných ošipáných.

Podakovanie: Za poskytnutie antigénov ako aj za cenné konzultácie pri práci ďakujeme MUDr. J. Čermanovi z Helminologického ústavu SAV v Košiciach.

Literatúra

- BOROŠKOVÁ, Z. – BENKOVÁ, M. – ČERMAN, J.: Použitie larválneho antigénu pri dôkaze migračnej fázy experimentálnej askaridózy u nešpecifického hostiteľa. *Folia vet.*, Košice, 1974, v tlači.
- BURDJEJEV, T. E. – ANIKJEJEV, A. P.: Diagnostika rannej stadiji askaridoza svinej. Sb. rabot po gel'mintol. k 90-letiju akad. K. I. Skrjabina. Izd. Kolos, Moskva, 1971, s. 42-45.
- COSTELLO, L. C.: A simplified method of isolating *Ascaris* eggs. *J. Parasit.*, 47, 1961, č. 2, s. 24.
- ČERMAN, J. – PUZOVÁ, H. – DUBAY, L.: Adsorbcia erytrocytami faktora echinokokového antigénu inhibujúceho latexovú reakciu. Prednesené na prac. schôdzi Slov. odbočky mikrobiologicko-epidemiologickej sekcie čs. lekárskej spoločnosti J. E. Purkyňa. Martin, 17. 11. 1967.
- ČERMAN, J.: Štúdium niektorých imunologických metód pri echinokokóze. [Rukopis kandidátskej dizertácie.] Helminologický ústav SAV, Košice 1974.
- DALIN, M. V.: Količestvennoje opredelenije protivoskaridnyh antitel pri legočnoj askaridoze. *Med. Parazitol. (Moskva)*, 30, 1961, č. 3, s. 337-340.
- DESCHIENS, R. – BENEX, J. – LAMBAULT, E.: Les conditions pratiques d'utilisation des antigènes parasitaires stabilisés dans le diagnostic immunologique des helminthiases. *Annls. Inst. Pasteur, Paris*, 101, 1961, č. 6, s. 951-954.
- FISCHMAN, A.: Flocculation tests in hydatid disease. *J. clin. Path.*, 13, 1960, s. 72-75.
- GUNDLACH, J.: Studies on the serological activity of *Fasciola hepatica* antigens. *Acta parasit. polon.*, 19, 1971, č. 2, s. 9-47.
- HASKINS, W. T. – WEINSTEIN, P. P.: The amine constituents from excretory products of *Ascaris lumbricoides* and *Trichinella spiralis* larvae. *J. Parasit.*, 43, 1957, s. 28-32.
- JERŠOV, V. S. – KRIKUNOV, M. S. – PLACHOTNJA, E. A. – GOROBEC, A. D.: Novyj metod diagnostiki askaridoza svinej. Sb. rabot po gel'mintol. k 75-letiju akad. K. I. Skrjabina. Izd. Kolos, Moskva, 1953, s. 240-243.
- JERŠOV, V. S.: Mechanizm immuniteta pri gel'mintozach seľskochozjajstvennyh životnych. Mater. k naučn. konf. VOG, 2, 1966, s. 76-98.
- KENT, N. H.: Fractionation, isolation and definition of antigens of parasitic helminths. *Am. J. Hyg. Monogr. Series*, 22, 1963, s. 30-45.

LEJKINA, E. S.: K voprosu ob immunodiagnostike rannich stadii askaridoza. Rab. po geImintol. k 75-letiju akad. K. I. Skrjabina. Izd. AN SSSR, Moskva, 1953, s. 357-365.

NAUMYČEVA, M. I.: Reakcija precipitaciji na živých ličinkách pri askaridoze svinej. Mater. k naučn. konf. VOG, 2, 1964, s. 19-24.

SICHOBALOVA, N. P. — LEJKINA, E. S.: Problemy immuniteta v geImintologii. Temat. sb. rabot po geImintol. sel'skochozjajstvennyh životnyh. Izd. Kolos Moskva, 12, 1966, s. 165-174.

TAFFS, L. F.: Immunological studies on experimental infection of guinea pigs and rabbits with *Ascaris suum* Goeze, 1782, III. The antibody response in rabbits demonstrated by means of the complement fixation and conglutinating complement absorption tests. J. Helminth., 38, 1964, č. 4, s. 325-348.

ZAPART, W.: Studies on the behaviour of some serological reactions in experimental animals, using the fractionated *Ascaris suum* antigens. Acta parasit. polon., 18, 1970, č. 2, s. 7-23.

Došlo dne 31. 10. 1975

БЕНКОВА М., БОРОШКОВА З. (Гельминтологический институт САН, Кошице, Чехословакия). Сравнение восприимчивости у реакции связи комплемента и латексфиксационного теста при выявлении миграционной фазы аскаридоза (*Ascaris suum*) у неспецифического хозяина. Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 369-373, 1976.

Авторы сравнивали восприимчивость реакции связи комплемента латексфиксационного теста при выявлении миграционной фазы аскаридоза у неспецифического хозяина (кролика). Была установлена высокая чувствительность латексфиксационного теста, в среднем выше на величину одного разбавления геометрического ряда.

реакция связи комплемента; латексфиксационный тест; миграционная фаза аскаридоза; кролик

BENKOVÁ M., BOROŠKOVÁ Z. (Helminthological Institute of the Slovak Academy of Sciences, Košice, Czechoslovakia). *Comparison of the Sensitiveness of the Complement-Fixation Reaction and Latex-Fixation Test in the Demonstration of a Migration Phase of Ascariasis (Ascaris suum) in a Non-Specific Host.* Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 369-373, 1976.

The authors compared the sensitiveness of the complement-fixation reaction and the latex-fixation test in the demonstration of a migration phase of ascariasis in a non-specific host (rabbit). The sensitiveness of the latex-fixation test was higher by the value of one dilution of the geometric series, on an average.

complement-fixation reaction; latex-fixation test; migration phase of ascariasis; rabbit

BENKOVÁ M., BOROŠKOVÁ Z. (Helminthologischer Institut der Slowakischen Akademie der Wissenschaften, Košice, Tschechoslowakei). *Vergleich der Sensibilität der Komplementbindungsreaktion und des Latexfixationstestes beim Nachweis der Migrationsphase der Askaridose (Ascaris suum) beim unspezifischen Wirt.* Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 369-373, 1976.

Die Autoren verglichen die Komplementbindungsreaktion und den Latexfixationstest vom Gesichtspunkt der Reaktionssensibilität beim Nachweis der Migrationsphase der Askaridose beim unspezifischen Wirtstier (Kaninchen). Es wurde eine größere Sensibilität des Latexfixationstestes, und zwar durchschnittlich um den Wert einer Verdünnung der geometrischen Reihe festgestellt.

Komplementbindungsreaktion; Latexfixationstest; Migrationsphase der Askaridose; Kaninchen

Adresa autorů:

MVDr. Magda Benková, MVDr. Zora Borošková, CSc., Helminologický ústav SAV, 040 00 Košice

Upozorňujeme čtenáře, že v čísle 7/1976 časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

budou uveřejněny následující články:

- M. Čapka: Dvacet let úspěšné práce Stálé komise RVHP pro zemědělství
- V. Šimon: Typová příslušnost streptokoků sérologické skupiny B izolovaných z mléčných žláz dojníc
- T. Svoboda, J. Bílek: Ejekce mléka u kozy a její ovlivnění krmivem
- J. Vítovec, P. Vladík, P. Frágnér: Hromadný výskyt paraventrikulární a ventrikulární mukormykózy u býků ve výkrmu
- M. Zibrín: Ultraštruktúrálné zmeny akrozomu a mitochondrií spermíí býka inkubovaných *in vitro*
- J. Vyhnálek, J. Kocman, J. Škaloud: Ověření přípravků Nilzan a Dovenix při motoličnatosti skotu a ovcí
- M. Splítek, V. Šandera, R. Hauba: Výsledky provozního pokusu s Tylanem Soluble při výkrmu brojlerů
- K. Holovská, V. Lenártová, I. Rosíval, J. Váradý: Vplyv močovinovej diéty na aktivitu glutamátdehydrogenázy a glutamínsyntetázy v niektorých orgánoch brojlerov

D. Arnaudov, V. Kozojed, J. Jíra, L. Štourač

Veterinární ústav Bulharské akademie zemědělských věd, Plovdiv
Parazitologický ústav CSAV, Praha

ARNAUDOV D., KOZOJED V., JÍRA J., ŠTOURAC L. *Imunoepizootologická studie ovčí toxoplazmózy*. Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 375-384, 1976.

Autoři vyšetřili nepřímou hemaglutinační reakcí na toxoplazmózu (NHR) 698 ovcí, chovaných na několika lokalitách v Bulharsku. Z nich reagovalo celkem 217 (= 31,1 %) pozitivně. U zmetajících ovcí byl výskyt pozitivitu významně vyšší (43,3 %) než u ovcí s normálními porody (21,0 %). Ovce z horských oblastí vykazaly významně vyšší pozitivitu (40,3 %) než z nížinných oblastí (18,3 %). Ze šesti zmetaných plodů byly izolovány tři cystogenní kmeny *Toxoplasma gondii*. Ze 493 ovcí vyšetřených v ČSSR reagovalo 33,3 % pozitivně v nepřímé hemaglutinační reakci, 29,7 % v nepřímé fluorescenční reakci a 11,6 % v mikroprecipitační reakci v agarovém gelu. Je upozorněno na epizootologický a ekonomický význam studia ovčí toxoplazmózy.

toxoplazmóza; aborty u ovcí; toxoplazmové protilátky

Hartley aj. popsali v r. 1954 dosud nepoznanou chorobu postihující ovčí plodové blány, kterou prozatímne nazvali New Zealand Type II Abortion. Jako příčina abortů u ovcí, provázených charakteristickými nekrotickými ložisky ve fetálních kotyledonech, byla později poznána toxoplazmóza. Tato nákaza se podílela na perinatální mortalitě v australské oblasti v 10 až 15 i více procentech (Hartley a Marshall, 1957). V mozcích plodů byla přítomna četná nekrotická ložiska, vyskytující se i v játrech, plicích a v srdci (Hartley a Kater, 1963). Vyšší incidence nákazy byla v podzimních a zimních měsících (Hartley, 1966). Nákaza se objevovala jak u ovcí ustájených, tak i pasených (Hartley a Moyle, 1968). Z dalších badatelů pracujících v této oblasti popsal epizootický výskyt abortů u ovcí v Queenslandu Osborne (1959). Cook (1961) stanovil dye testem toxoplazmové protilátky u 5,6 % z 485 ovcí. Nákaza byla častější v oblastech s vyššími srážkami.

Další oblastí intenzivního výzkumu ovčí toxoplazmózy, počínaje rokem 1957, byla Anglie, kde Beverley a Watson (1959) ukázali, že *Toxoplasma* není jen neškodný komenzál. U ovcí v Yorkshire, které zmetaly z tzv. neznámé příčiny, byly nacházeny vyšší titry toxoplazmových protilátek. Toxoplazmóza se vyskytovala v epizootiích působících zmetání ovcí. Parazit byl izolován v 21 případě z 31 mozku zmetaných

jehňat a v 11 případech z 20 vyšetřených placent. (Z nevhodně konzervovaného materiálu byl záchyt nižší.) Jiný patogen než *Toxoplasma* tu nebyl zjištěn (Watson a Beverley, 1971). Incidence nákazy kolísala podle farem (Beverley a Watson, 1962). Na pokusném základě zjistili Watson a Beverley (1971), že nákaza v polovině březosti má za následek onemocnění plodu a zmetání v 50 % případů. V pozdější době březosti pak k uhynutí plodu nedochází. U infikovaných jehňat jsou přítomny protilátky, které mají později ještě vzestupnou tendenci. Ovce jsou rezistentní proti reinfekci a jejich další jehňata jsou zdravá.

Na americkém kontinentu se patologií a prevalencí ovčí toxoplazmózy zabývali Cole aj. (1954), Hulland a Tobe (1961), McIlwain (1969) a jiní. Z řady dalších autorů zabývajících se prevalencí toxoplazmózy u ovcí uvádíme: jako první v SSSR Ševkunova aj. (1961) stanovili, že 27,5 % zdravých ovcí v Kalininské oblasti má komplementfixační protilátky. Golosov (1968) v Kazachstanu stanovil komplementfixační reakci (KFR) průměrné nakažení ovcí v 18,3 % (vyšetřeno 6568 sér) a izoloval několik kmenů *Toxoplasma gondii*. Rachimov aj. (1971) zjistili KF protilátky u 7,4 % ovcí vyšetřených v Uzbekistanu, Berdyev (1972) u 7,8 % v Turkmenské SSR, Jermakova (1974) také v Uzbekistanu zjistila KF protilátky u 13,2 % jednoletých až dvouletých ovcí, Melnik (1974) na Ukrajině u 27,5 ± 2,84 % ovcí. Elias aj. (1963) v Temešváru zjistili protilátky dye testu u 51,9 % ze 154 březích a zmetajících ovcí a u 44,5 % ze 137 kontrolních ovcí. Roever-Bonnetová (1963) zjistila protilátky dye testu v titru 16 a vyšším v 88,6 % ze 175 ovcí z různých oblastí Holandska. Janitschke aj. (1967) v Západním Berlíně stanovili pokusy na 50 jatečných ovcích pozitivitu dye testu v 88 %, KFR v 29 % a izolovali z tkání bránice šest kmenů *Toxoplasma*. Gill a Prakash (1970) v Indii stanovili hemaglutinační protilátky u 9,0 % z 488 vyšetřených jatečných ovcí. Punke aj. (1972) vyšetřili v Berlíně 101 jatečnou ovci, u 64,4 % stanovili dye testem přítomnost protilátek, ale z 65 pozitivních sér mělo pouze 26,2 % protilátky vážící komplement. Maronpot a Botros (1972) zjistili fluorescenční reakci v Egyptě 12 % pozitivních kusů z 389 ovcí.

V Bulharsku se jako první zabývali toxoplazmózou domácích zvířat včetně ovcí Angelov aj. (1957) a zjistili u 2,9 % vyšetřených ovcí pozitivní kožní alergickou reakci. Arnauudov (1972) upozornil v r. 1970 na etiologii zmetání domácích zvířat a izoloval kmen *Toxoplasma gondii* ze zmetaného jehněte. Arnauudov (1974) dále referoval o nálezech positivity precipitační reakce — z 1150 vyšetřených ovcí bylo 28,4 % pozitivních. Donev (1972) zjistil pozitivní KFR u 31,5 % z 968 ovcí. Na farmách, na kterých se vyskytovalo zmetání, bylo 41 %, na farmách bez abortů 30,8 % pozitivních reagentů.

V Československu nacházíme soubornou zprávu o výsledcích vyšetření ovcí na toxoplazmózu v publikaci Kouby aj. (1974). Ve vyšetřených souborech byly pozitivní: v 77,4 % dye test, v 25,9 % KFR, ve 27,9 % agarová precipitace a ve 13,0 % izolační pokus. Čatár (1974) podal zprávu o výsledcích vyšetření 429 ovcí na Slovensku, z nich mělo 26,3 % pozitivní KF protilátky. Izolační pokus byl pozitivní v 10,6 % z 86 vyšetřených.

Podle odhadu působí toxoplazmóza v Anglii 9,5 až 21,0 % abortů ovcí, což má za následek ztráty 50 až 125 tisíc jehňat ročně (Beverley, písemná zpráva). Tato z ekonomického a epidemiologického hlediska závažná fakta nás vedla k tomu, abychom nejprve studovali prevalenci toxoplazmózy ovcí na různých lokalitách v Bulharsku a Českoslo-

vensku. Dalším naším cílem bylo poznat, jak se tu toxoplazmóza podílí na zmetání ovcí. Konečně jsme se pokusili analyzovat některé faktory, které působí na mechanismy šíření nákazy.

MATERIAL A METODA

V letech 1972 až 1974 bylo sérologicky vyšetřeno 1091 ovcí. Šlo vesměs o ovce pasené. Séra testovaná v Bulharsku, celkem 698 vzorků, byla odebrána pracovníky veterinární služby a zaslána do laboratoře. Séra pocházela z různých osad thrácké nížiny a z horských oblastí Sredna Gora, Stara Planina a Rodopi v plovdivském a pazardžickém kraji. Séra testovaná v ČSSR, celkem 493 vzorky, byla odebrána na pastvinách v západních Čechách. Z toho bylo 448 dospělých ovcí a 45 jehňat. Séra byla testována čerstvá, nejdéle do dvou dnů, nebo po inaktivaci uchovávána při -20°C .

Nepřímá hemaglutinační reakce (NHR). Antigen jsme připravovali v pražské laboratoři. Je to extrakt z tachyzoitů *Toxoplasma gondii*, kmen „R“, izolovaný z orgánů dítěte zemřelého na kongenitální toxoplazmózu v r. 1958. K extrakci bylo použito tween-éterové preparace podle Pokorného aj. (1971). Pracovali jsme se sušenými formolizovanými a taninovanými beranými erytrocyty v 1% koncentraci. Jde o přípravek SEVATEST TK-HEM SEVAC Praha. Používali jsme mikrotitrátorové metody s dávkovači kapek a s ředicími klíčkami o objemu 0,025 ml jednak maďarské firmy Metrimpex, jednak firmy Cooke Engineering, USA.

Nepřímá fluorescenční reakce (NFR). Bylo použito techniky zavedené pro testování lidských sér (Zítová aj., 1973). Jako konjugátu bylo užito králíčího gamaglobulinu proti globulinové frakci ovčího séra značeného fluorescen-izotiocyanátem. Preparát byl připraven Ústavem sér a očkovacích látek.

Startovací ředění séra bylo 1:8, resp. 1:10, séra byla dále testována v dvojnásobku ředění až do nejvyššího ředění dávajícího pozitivní výsledek.

Mikroprecipitační reakci v agarovém gelu (MPA) jsme dělali v modifikaci podle Hübnera a Uhlíkové (1971).

Izolační pokus. Tkáň mozku byla suspendována ve sterilním fyziologickém roztoku a vstříkována v množství 1 ml intraperitoneálně šesti bílým myším. Inokulace byla opakována ze zbývajících suspenze chované v ledničce v témž množství ještě druhý den. Myši byly před pokusem sérologicky vyšetřeny (MPA). Po čtyřech týdnech byly myši vyšetřovány sérologicky (MPA) a mikroskopicky — tkáňové cysty byly hledány v mozku. Z pozitivních myší byly založeny další pasáže.

VÝSLEDKY

V Bulharsku bylo vyšetřeno celkem 698 ovcí, z nichž reagovalo v NHR 217 (= 31,1 %). Podrobné údaje vyplývají z tab. I, kde je rozdělení na jednotlivé skupiny, tj. ovce po abortu (43,0 % pozitivních), ovce s normálním porodem (21,0 % pozitivních) a beraní (31,8 % pozitivních). Abortující ovce byly vyšetřeny nejdéle do jednoho měsíce. Z tabulky dále vyplývá rozdělení naměřených titrů. Rozdíl mezi hodnotami u normálních a abortujících ovcí je statisticky významný na 0,1% hladině významnosti ($\chi^2 [1] = 27,03$).

Výsledky testování podle zeměpisné polohy vyplývají z tab. II. První skupina 404 ovcí pocházela z předhůří Rodop a Sredna Gora; z nich reago-

I. Výsledky nepřímé hemaglutinační reakce (NHR) u 698 ovčích sér testovaných v Bulharsku

	Celkem vyšetřeno	NHR pozitivní v titru						Celkem pozitivních	Procento
		10	20	40	80	160	320		
Abortující ovce	142	14	13	13	33	16	3	92	43,0
Neabortující ovce	267	15	7	16	10	6	2	56	21,0
Berani	217	6	9	18	36	—	—	69	31,8
Celkem	698	35	29	47	79	22	5	217	31,1

II. Výsledky nepřímé hemaglutinační reakce u 698 ovčích sér podle zeměpisné polohy

	Celkem vyšetřeno	Pozitivní	
		počet	procento
Horské oblasti	404	163	40,3
Nížinné oblasti	294	54	18,3
Celkem	698	217	31,1

valy 163 (= 40,3 %) pozitivně. Druhá skupina, 294 ovce, pocházela z thrácké nížiny. Z nich reagovaly 54 (= 18,3 %) pozitivně. Rozdíl mezi oběma skupinami je statisticky významný na 0,1 % hladině významnosti ($\chi^2 [1] = 38,38$). Izolační pokus byl proveden z mozkové tkáně šesti zmetaných ovčích plodů. Celkem ve třech případech se podařilo izolovat cystogenní kmen *Toxoplasma gondii*. Všechny vzorky pocházely z horské oblasti (předhůří Rodop).

V ČSSR byly na ovčích sérech srovnány tři sérologické testy. Z celkem vyšetřených 493 ovčích sér reagovalo pozitivně v NHR 164 (= 33,3 %). Sama jehňata reagovala v 37,8 % pozitivně — ze 45 vyšetřených bylo 17 pozitivních. V NFR reagovalo 117 (= 23,7 %) pozitivně. Analýza simultánního vyšetření NHR a NFR je uvedena v tab. III a IV. Koincidence výsledků byla zjištěna u 77,0 % sér, diskrepance výsledků ve 23,0 %. Oba testy ukázaly stejné titry v 6,3 %, vyšší NHR ve 4,4 %, vyšší NFR v 6,3 %.

Tab. V znázorňuje srovnání obou užitých kvantitativních protilátkových testů s MPA. Z celkového počtu 447 ovčích sér vyšetřených pomocí MPA byla 52 (= 11,6 %) pozitivní. Z 301 NHR-negativního séra bylo 13 (= 4,3 %) MPA-pozitivních, ze 146 NHR-pozitivních sér bylo 39 (= 26,7 %) MPA-pozitivních. Z 338 NFR-negativních sér bylo 17 (= 5,0 %), ze 109 NFR-pozitivních sér bylo 35 (= 32,1 %) MPA-pozitivních.

III. Srovnání výšek titrů u 493 ovčích sér (Československo) současně vyšetřených nepřímou hemaglutinační reakcí (NHR) a nepřímou fluorescenční reakcí (NFR) na přítomnost toxoplazmových protilátek

Titř	NHR									Celkem
	neg.	8	16	32	64	128	256	512	1024	
NFR	neg.	296	46	20	10	2	2			376
	10	15	16	5	2	2	1			41
	20	11	9	6	2	2				30
	40	4	8	5	5	5				27
	80	2	1	3	2	3	2		1	14
	160	1	1	1		1				4
	320			1						1
Celkem	329	81	41	21	14	6			1	493

IV. Koincidence a diskrepance nepřímé hemaglutinační reakce (NHR) a nepřímé fluorescenční reakce (NFR) u 493 simultánně testovaných ovčích sér

	Počet	Procento
Koincidence výsledků		
oba testy negativní	296	60,0
oba testy pozitivní	84	17,0
celkem	380	77,0
Diskrepance výsledků		
NHR negativní, NFR pozitivní	33	6,8
NHR pozitivní, NFR negativní	80	16,2
celkem	113	23,0
Vztahy titrů		
stejně	31	6,3
vyšší NHR (2 × až 16 ×)	22	4,4
vyšší NFR (2 × až 16 ×)	31	6,3

DISKUSE

a) IMUNODIAGNOSTIKA

Podle požadavků platných v lékařské sérologii má být k diagnostice infekční nemoci použit co největší počet protilátkových testů (M o r e n z, 1967). V předložené studii jsme aplikovali model z imunodiagnostiky humánní toxoplazmózy a simultánně pracovali se třemi imuno-

V. Srovnání výsledků nepřímé hemaglutinační reakce a nepřímé fluorescenční reakce s precipitací v agaru (MPA) u 447 ovčích sér

NHR									Celkem pozitivních
negativní	pozitivní v titru								
	8	16	32	64	128	256	512	1024	
301	71	35	19	14	6			1	146
MPA pozit. 13	20	9	3	4	2			1	52
NFR									Celkem pozitivních
negativní	pozitivní v titru								
	10	20	40	80	160	320			
338	35	39	27	14	3	1			109
MPA pozit. 17	7	6	13	8	1				52

logickými reakcemi. U ovčích sér ukázala větší zachytnost NHR – 33,3 % pozitivních proti 23,7 % pozitivních výsledků NFR. Výsledky MPA získané na ovčích sérech se blíží našim zkušenostem s lidskými séry (Jíra aj., 1975) ve smyslu korelace pozitivních výsledků. U NHR-pozitivních sér je výskyt positivity MPA 8,3× častější než u negativních; u NFR-pozitivních sér je výskyt positivity MPA 9,6× častější než u negativních.

b) EPIZOOTOLOGIE

Předložená studie ukázala na sérologicky a parazitologicky doloženou nakaženost ovčích populací, která může být analyzována ze dvou hledisek. První hledisko se týká zdroje nákazy ovčích populací toxoplazmózou a mechanismů šíření. Již Hartley (1966) předpokládal výskyt infekčního stadia původce toxoplazmózy na pastvinách. Tímto neznámým agens se ukázaly oocysty *Toxoplasma gondii* vylučované z kočičího střeva (Hutchison aj., 1969, 1970). Kutschmann aj. (1974) soudí na základě sérologických vyšetření, že každá druhá kočka je vylučovatelem oocyst. Podle Knocha aj. (1974) z 200 vyšetřených koček 4 (= 2 %) vylučovaly oocysty *Toxoplasma*. Vylučování bylo častější v letním období než v zimním. Podle Mundaye (1972) se toxoplazmóza v Tasmanii vyskytuje významně častěji u ovcí izolovaných na ostrovech s přítomností koček než bez nich. Podobně Bille (1974) zjistil u 208 ovcí v Grónsku z lokalit, kde nikdy nebyly přítomny kočky, nízké titry dye-testu pouze ve 2,9 %. Plant aj. (1974) popisují epizootii toxoplazmózy u ovcí, která byla vyvolána zrním kontaminovaným oocystami *Toxoplasma gondii* z kočičího trusu. Autoři naznačují ochranu krmiva před kočkami jako preventivní opatření.

Ovce se tedy mohou nakazit toxoplazmózou jak při ustájení, tak i na pastvinách, a to již jehňata. Toulající se kočky rozsévají svým trusem nákazu ve volné přírodě, jak o tom svědčí nálezy toxoplazmózy u volně

žijících obratlovců. Podle našich nálezů byl signifikantně vyšší výskyt ovčí nákazy v horských oblastech. Může to být v souvislosti s množstvím srážek. Nížinné oblasti jsou sušší a jak známo, suché prostředí nepůsobí příznivě na přežívání oocyst *Toxoplasma gondii*. Je tu jistá paralela s výskytem sarkosporidiosis v Bulharsku, kde je nákaza u ovcí v nížinných oblastech méně intenzivní (Meškov, 1973). K opačným výsledkům však dospěl I s m a i l o v (1971), který zjistil u 471 ovce v Tadžikistanu, v předhůří a dolinných oblastech, toxoplazmové protilátky v 21,6 %, kdežto v horských oblastech v 7,7 %.

Druhým hlediskem je zmetání ovcí vyvolané toxoplazmózou. Nálezy D o n e v a (1972) a naše vlastní nálezy, doložené sérologicky i izolacemi původce, nasvědčují tomu, že toxoplazmóza se může významně podílet na ztrátách jehňat. Ekonomickému dopadu abortů u ovcí v našich podmínkách a jejich prevenci je třeba věnovat dále pozornost.

Za pomoc při odběru a zpracování materiálu děkujeme MVDr. O. Koždoňovi a RNDr. D. Zítové.

Literatura

- ARNAUDOV, D.: Proučvane varchu resprostranieneto na toksoplazmozata po sel-skostopanskite životni. Treti simpozium na mladite naučni rabotnici v selskovo stopanstvo 26–28 oktombri 1970 g. 1972, s. 159–163.
- ARNAUDOV, D.: Specificity of the precipitation reaction in agar gel (APR) in the diagnosis of toxoplasmosis in farm animals. Toxoplasmosis symposium, Bratislava 2.–3. 9. 1974. Abstracta 7.
- BERDYEV, A. S.: Sostojanie i zadači izučeniya toksoplazmoza v Turkmenskoj SSR. Izv. Akad. Nauk Turkmenskoj SSR, Ser. biol., 6, 1972, s. 46–51.
- BEVERLEY, J. K. A. — WATSON, W. A.: Ovine abortion due to toxoplasmosis. Nature, 184, 1959, s. 2041.
- BEVERLEY, J. K. A. — WATSON, W. A.: Ovine abortion and toxoplasmosis in Yorkshire. Vet. Rec., 73, 1961, s. 6–11.
- BEVERLEY, J. K. A. — WATSON, W. A.: Further studies on toxoplasmosis and ovine abortion in Yorkshire. Vet. Rec., 74, 1962, s. 548–552.
- BILLE, T.: Antibodies against *Toxoplasma gondii* in sheep in Greenland. Third International Congress of Parasitology, Munich, August 25th — 31st. Proc., vol. 1, 1974, s. 307.
- COLE, R. C. — SANGER, V. J. — FARREL, R. L. — KRONDER, J. D.: The present status of toxoplasmosis in veterinary medicine. N. Amer. Vet., 35, 1954, s. 265–270.
- COOK, I.: Ovine toxoplasmosis. Aust. vet. J., 37, 1961, s. 451–456.
- ČATÁR, G.: Toxoplazmóza v ekologických podmienkach na Slovensku. Veda, Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, Bratislava 1974. 140 s.
- DONEV, A.: Proučvaniya varchu toksoplazmozata po selskopanskite životni v rusenski okrag. 1. Rasprostranenie. VetMed. Nauki, Sofia, 9, 1972, s. 63–68.
- ELIAS, M. I. — GLUHOVSKI, N. — PUČA-CIUDIN, M. — COSTIN, P.: Observații cu privire la un focar de toxoplazmoză ovină. Microbiol. Parazit. Epidem., 8, 1963, s. 133–138.
- GILL, H. S. — PRAKASH, O.: Toxoplasmosis in India. Survey of antibodies in sheep. J. trop. Med. Hyg., 73, 1970, s. 77–78.
- GOLOSOV, V. I.: Toksoplazmoz ovec i koz (po materialam issledovanija v Kazachstane). [Avtoreferat dissertacii.] Alma-Ata 1968. 26 s.
- HARTLEY, W. J.: Some investigations into the epidemiology of ovine toxoplasmosis. N. Z. vet. J., 14, 1966, s. 106–117.
- HARTLEY, W. J. — KATER, J. C.: The pathology of *Toxoplasma* infection in the pregnant ewe. Res. vet. Sci. 4, 1963, s. 326–332.
- HARTLEY, W. J. — MARSHALL, S. C.: Toxoplasmosis as a cause of ovine perinatal mortality. N. Z. vet. J., 5, 1957, s. 119–124.

- HARTLEY, W. J. — MOYLE, G.: Observations on an outbreak of ovine congenital toxoplasmosis. *Aust. vet. J.*, 44, 1968, s. 105-107.
- HULLAND, T. J. — TOBE, S. B.: Toxoplasmosis as a cause of abortion in Ontario sheep. *Can. vet. J.*, 2, 1961, s. 45-51.
- HÜBNER, J. — UHLIKOVÁ, M.: Mikroprecipitační reakce v agarovém gelu (MPA) pro sérologickou diagnostiku toxoplazmózy. *Čs. Epidem. Mikrobiol. Imunol.*, 20, 1971, s. 97-101.
- HUTCHISON, W. M. — DUNACHIE, J. F. — SIIM, J. C. — WORK, K.: The life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Br. med. J.*, 4, 1969, s. 806.
- HUTCHISON, W. M. — DUNACHIE, J. F. — SIIM, J. C. — WORK, K.: Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. *Br. med. J.*, 1, 1970, s. 142-144.
- ISMAILOV, I. I.: Zonalnost toksoplazmoza v Tadžikistane. In: ŠEVKUNOVA, J. A. aj.: Vsesojuznyj simpozium po toksoplazmozu. Kratkie tezisi, Moskva 1971. s. 189-190.
- JANITSCHKE, K. — WEILAND, G. — ROMMEL, M.: Untersuchungen über den Befall von Schlachtkälbern und -schafen mit *Toxoplasma gondii*. *Fleischwirtschaft*, 2, 1967, s. 135-136.
- JERMAKOVA, S. A.: Serologičeskoe obsledovanie životnych na toksoplazmoz. *Med. Zh. Uzbek.*, 7, 1974, s. 113-114.
- JÍRA, J. — BARNETOVÁ, M. — PRINCOVÁ, D. — VALKOUN, A.: Agarová precipitace a její vztah k vazbě komplementu u toxoplazmózy. *Čs. Epidem. Mikrobiol. Imunol.*, 1975 (v tisku).
- KNOCH, W. — JUNGSMANN, R. — HIEPE, T.: Zum koprologischen Nachweis von *Toxoplasma gondii*-Oozysten bei der Hauskatze. *Mh. Vet. Med.*, 29, 1974, s. 247-250.
- KOUBA, K. — JÍRA, J. — HÜBNER, J.: Toxoplazmóza. *Avicenum, Praha* 1974. 306 s.
- KUTSCHMANN, K. — ALBRECHT, E. — WILDFÜHR, W.: Untersuchungen über das Vorkommen von *Toxoplasma gondii*-Infektionen bei Katzen. *Mh. VetMed.*, 7, 1974, s. 244-246.
- MARONPOT, R. R. — BOTROS, B. A. M.: Toxoplasma serologic survey in man and domestic animals in Egypt. *J. Egypt. publ. Hlth. Ass.*, 47, 1972, s. 58-67.
- McILWAIN, K.: Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in domestic animals in North Dakota. *Archs envir. Hlth*, 19, 1969, s. 885-886.
- MELNIK, M. N.: Epidemiologija i profilaktika toksoplazmoza v USSR. *Izd. Zdorovja, Kiev* 1974. 143 s.
- MEŠKOV, S.: Sarkosporidii i sarkosporidiozi po selskostopanskite životni. 1. Sarkosporidiiite po ovcete. *VetMed. Nauki, Sofia*, 10, 1973, s. 73-81.
- MORENZ, J.: Zur Beurteilung serologischer Reaktionsergebnisse. II. Serologisches Gesamtbild. *Z. Immunforsch.*, 132, 1967, s. 276-294.
- MUNDAY, B. L.: Serological evidence of *Toxoplasma* infection in isolated groups of sheep. *Res. vet. Sci.*, 13, 1972, s. 100-102.
- OSBORNE, H. G.: Abortion in sheep associated with *Toxoplasma*. *Aust. vet. J.*, 35, 1959, s. 424-425.
- PLANT, J. W. — RICHARDSON, N. — MOYLE, G. G.: *Toxoplasma* infection in sheep associated with feeding of grain contaminated with cat faeces. *Aust. vet. J.*, 50, 1974, s. 19-21.
- POKORNÝ, J. — FRÜHBAUER, Z. — ČUŘÍK, B. — ZÁSTĚRA, M.: Komplement-fixační antigen *Toxoplasma gondii* připravený tween-éterovou preparací. *Čs. Epidem. Mikrobiol. Imunol.*, 20, 1974, s. 73-74.
- PUNKE, G. — JUNGSMANN, R. — HIEPE, T.: Untersuchungen zum Vorkommen von *Toxoplasma gondii*-Infektionen beim Schaf. *Mh. VetMed.*, 27, 1972, s. 222-224.
- RACHIMOV, T. CH. — KASPAROV, R. L. — SADYKOVA, S. B. — ALAEV, J. A.: Někotorýe itogi izučeniya toksoplazmoza životnych. *Materialy pervogo sjezda Vsesojuznogo obščestva protozoologov, Baku*, 1971 s. 256-257.
- ROEVER-BONNET, H. de: Toxoplasmosis in sheep in the Netherlands. *Trop. geogr. Med.*, 15, 1963, s. 431-437.
- ŠEVKUNOVA, J. A. — MIŠČENKO, N. K. — ZASUCHIN, D. N.: Někotorýe dannye po obsledovaniju selskochozjastvennyh životnych na toksoplazmoz. *Zh. Mikrobiol. (Mosk.)*, 32, 1961, s. 125-128.
- WATSON, W. A. — BEVERLEY, J. K. A.: Ovine abortion due to experimental toxoplasmosis. *Vet. Rec.*, 88, 1971, s. 42-45.

WATSON, W. A. — BEVERLEY, J. K. A.: Epizootics of toxoplasmosis causing ovine abortion. Vet. Rec., 88, 1971, s. 120-123.

ZÍTOVÁ, D. — JÍRA, J. — PRINCOVÁ, D.: Nepřímá fluorescenční reakce a vazba komplementu: simultánní sérologické testy na toxoplazmózu. Čs. Epidem. Mikrobiol. Imunol., 22, 1973, s. 88-94.

Došlo dne 6. 11. 1975

АРНАУДОВ Д., КОЗОЕД В., ЙИРА Й., ШТОУРАЧ Л. (Ветеринарный институт Болгарской академии сельскохозяйственных наук, Пловдив; Паразитологический институт ЧСАН, Прага, Чехословакия). Иммуноэпизотологическое изучение токсоплазмоза овец. Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 375-384, 1976.

Авторы изучали косвенную гемагглютинационную реакцию на токсоплазмоз (NHR) 698 овец, выращиваемых в нескольких местах в Болгарии. 217 из них (= 31,1 %) реагировало положительно. У abortирующих овец положительность значительно выше (43,3 %), чем у овец с нормальными родами (21,0 %). Овцы горных областей отличались значительно более высокой положительностью (40,3 %), чем овцы низменных областей (18,3 %). Из шести abortированных плодов были изолированы три цистогенные штамма *Toxoplasma gondii*. Из 493 овец, обследованных в ЧССР, 33,3 % реагировало положительно в косвенной гемагглютинационной реакции, 29,7 % в косвенной флуоресцентной реакции и 11,6 % в микропреципитационной реакции в агаровом геле. Обращается внимание на эпизоотологическое и экономическое значение токсоплазмоза овец.

токсоплазмоз; аборт у овец; токсоплазмозовые антитела

ARNAUDOV D., KOZOJED V., JÍRA J., ŠTOURAC L. (Veterinary Institute of the Bulgarian Academy of Sciences, Plovdiv, Parasitological Institute of the Czechoslovak Academy of Sciences, Praha, Czechoslovakia). An Immunoepizootological Study of Ovine Toxoplasmosis. Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 375-384, 1976.

The authors examined for toxoplasmosis (by means of an indirect hemagglutination reaction) 698 sheep kept in different places in Bulgaria. Out of this total number, 217 (= 31.1 %) responded positively to the tests. In sheep delivering stillborn foetuses the positive response was much more frequent (43.3 %) than in sheep with normal parturitions (21.0 %). Sheep from montane regions showed a significantly higher positivity (40.3 %) than sheep from lowland regions (18.3 %). Three cystogenic strains of *Toxoplasma gondii* were isolated from six stillborn lambs. Out of the 493 sheep examined in Czechoslovakia, 33.3 % gave a positive response in an indirect hemagglutination reaction, 29.7 % responded in an indirect fluorescence reaction, and 11.6 % in a microprecipitation reaction in agar gel. Attention is drawn to the epizootological and economic importance of the study of ovine toxoplasmosis.

toxoplasmosis; abortions in sheep; toxoplasmosis antibodies

ARNAUDOV D., KOZOJED V., JÍRA J., ŠTOURAC L. (Veterinäranstalt der Bulgarischen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften, Plovdiv; Parasitologische Anstalt der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Praha, Tschechoslowakei). Immunoepizootologische Studie der Schaftoxoplasmose. Vet. Med. (Praha) 21 (6) : 375-384, 1976.

Die Autoren untersuchten durch indirekte Hämagglutinationsprobe die Toxoplasmose (NHR) bei 698 auf einigen Lokalitäten in Bulgarien gehaltenen Schafen. Von diesen Tieren reagierten 217 (= 31,1 %) positiv. Bei den abortierenden Schafen war die Positivität signifikant höher (43,3 %) als bei den Schafen mit normalen Geburten (21,0 %). Die Schafe aus Gebirgsgebieten wiesen eine signifikant höhere Positivität (40,3 %) als die Schafe aus Niederungsgebieten (18,3 %) auf. Aus sechs abortierten Früchten wurden drei zystogene *Toxoplasma-gondii*-Stämme isoliert. Von 493 in der ČSSR untersuchten Schafen reagierten 33,3 % positiv bei der indirekten Hämagglutinations-

probe, 29,7 % beim indirekten Fluoreszenztest und 11,6 % beim Mikropräzipitations-test auf Agargel. Es wird hingewiesen auf die epizootologische und ökonomische Bedeutung des Studiums der Toxoplasmose bei Schafen.

Toxoplasmose; Aborte bei Schafen; Toxoplasma-Antikörper

Rukopis odevzdán k tisku 6. 4. 1976 — Podepsáno k tisku 7. 10. 1976

Adresa autorů:

MVDr. D. Arnaudov, Veterinären Institut, Plovdiv, Bulharsko, V. Kozojed, prom. biol., MUDr. RNDr. J. Jíra, CSc., RNDr. L. Štourač, Parasitologický ústav ČSAV, Flemingovo nám. 2, 160 00 Praha 6

Zapletal O., Piskač A., Malá J., Dražan J. ml.: Izolace toxigenního kmene plísně <i>Aspergillus flavus</i> a charakteristika produkovaných aflatoxinů	321
Ingr I.: Rezidua perchlóretylénu a benzínu v kafilerních tucích a moučkách pro krmné účely	331
Beneš J., Prokšová M., Hrušovský J.: Terapie otrav organofosfáty u zvířat	343
Pavlíček J., Dyková I.: Léčba umělé invaze <i>Ascaridia galli</i> u různých starých kuřat tetramisolem, piperazinem a metrifonátem	353
Vítovec J., Vladík P., Záhoř Z., Slabý V.: Morfologická studie 70 případů brucelózy zajíců vyvolané zárodky <i>Brucella suis</i>	359
Benková M., Borošková Z.: Porovnání citlivosti reakce vázby komplementu a latexfixačního testu při důkaze migrační fázi askaridózy (<i>Ascaris suum</i>) u nespecifického hostitele	369
Arnaudov D., Kozojed V., Jíra J., Štourač L.: Imunoepizootologická studie ovčí toxoplazmózy	375

СОДЕРЖАНИЕ

Заплетал О., Пискач А., Мала Й., Дражан Й. юн.: Изоляция токсигенного штамма грибка <i>Aspergillus flavus</i> и характеристика производимых токсинов	329
Ингр И.: Остатки перхлорэтилена и бензина в кафилерных жирах и мучках для кормовых целей	340
Бенеш Й., Прокшова М., Грушовский Й.: Терапия отравления органифосфатами у животных	351
Павличек Й., Дыкова И.: Лечение искусственной инвазии <i>Ascaridia galli</i> у цыплят разного возраста тетраисолом, пиперазином и метрифонатом	357
Витовец Й., Владик П., Загорж З., Слабы В.: Морфологическое изучение 70 случаев бруцеллеза зайцев, вызванного зародышами <i>Brucella suis</i>	367
Бенкова М., Борошкова З.: Сравнение восприимчивости у реакции связи комплемента и латексфиксационного теста при выявлении миграционной фазы аскаридоза (<i>Ascaris suum</i>) у неспецифического хозяина	373
Арnaudов Д., Козоед В., Йира Й., Штоурач Л.: Иммуноэпизootологическое изучение токсоплазмоза овец	383

CONTENT

Zapletal O., Piskač A., Malá J., Dražan J. ml.: Isolation of the Toxicogenic Strain of the Fungus <i>Aspergillus flavus</i> and Characteristics of the Produced Aflatoxins	329
Ingr I.: Residues of Perchlórethylene and Petrol in Rendered Fats and in Feeding Meals	340
Beneš J., Prokšová M., Hrušovský J.: Therapy of Organophosphate Poisoning of Animals	352
Pavlíček J., Dyková I.: The Tetramisol, Piperazine and Metriphonate Treatment of the Artificial Invasion by <i>Ascaridia galli</i> in Chickens of Different Age	357
Vítovec J., Vladík P., Záhoř Z., Slabý V.: Morphological Study of 70 Cases of Brucellosis of Hares Caused by the Germs of <i>Brucella suis</i>	367
Benková M., Borošková Z.: Comparison of the Sensitiveness of the Complement-Fixation Reaction and Latex-Fixation Test in the Demonstration of a Migration Phase of Ascariasis (<i>Ascaris suum</i>) in a Non-Specific Host	373
Arnaudov D., Kozojed V., Jíra J., Štourač L.: An Immunoepizootological Study of Ovine Toxoplasmosis	383

INHALT

Zapletal O., Piskač A., Malá J., Dražan J. ml.: Isolierung eines toxischen Stammes des Schimmelpilzes <i>Aspergillus flavus</i> und Charakteristik der produzierten Aflatoxine	329
Ingr I.: Perchloräthylen- und Benzinresiduen in Kafillereifetten und -mehlen für Futterzwecke	341
Beneš J., Prokšová M., Hrušovský J.: Therapie von Organophosphatvergiftungen bei Tieren	352
Pavlíček J., Dyková I.: Therapie der künstlichen Invasion von <i>Ascaridia galli</i> bei verschiedenen alten Küken mit Applikation von Tetramisol, Piperazin und Metrifonat	357
Vitovec J., Vladík P., Záhoř Z., Slabý V.: Morphologische Untersuchungen von 70 Fällen der von <i>Brucella-suis</i> -Erregern verursachten Brucellose bei Hasen	368
Benková M., Borošková Z.: Vergleich der Sensibilität der Komplementbindungsreaktion und des Latexfixationstestes beim Nachweis der Migrationsphase der Askaridose (<i>Ascaris suum</i>) beim unspezifischen Wirt	373
Arnaudov D., Kozojed V., Jíra J., Štourač L.: Immunoepizootologische Studie der Schafttoxoplasmose	383