

VĚDECKÝ ČASOPIS



VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

12

ROČNÍK 22 (L)
PRAHA
PROSINEC 1977
CENA 10 Kčs

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚĚLSKÁ
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ
PRO ZEMĚĚLSTVÍ

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., doc. MVDr. Ladislav Polák, CSc., MVDr. Jiří Srna, prof. MVDr. Jaroslav Vrtiak, DrSc.

Za vedení časopisu odpovídá prof. MVDr. Antonín Holub, DrSc.

Redaktorka ing. Jovanka Václavíčková

© Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, Praha 1977

■
Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA uveřejňuje studie, rozbor a vědecká pojednání o vyřešených úkolech výzkumu z oboru veterinární medicíny. Vydává Československá akademie zemědělská — 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 Чехословацкая сельскохозяйственная академия — 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 Czechoslovak Academy of Agriculture — 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 der Tschechoslowakischen landwirtschaftlichen Akademie — Institut für wissenschaftlich-technische Information der Landwirtschaft. Erscheint monatlich. Redaktion 120 56 Prag 2, Slezská 7.

HODNOTENIE METABOLICKÝCH PROFILOVÝCH TESTOV SAMOČINNÝM POČÍTAČOM

I. Beseda, J. Válka

BESEDA, I. — VÁLKA, J. (Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice) : *Hodnotenie metabolických profilových testov samočinným počítačom*. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (12) : 705-712.

Vypracovali sme program na vyhodnotenie metabolických profilových testov u dojníc samočinným počítačom TESLA-200 v programovacom jazyku FORTRAN IV. Počítač vyhodnocuje a zakresľuje metabolický profil zo vstupných údajov nadierovaných v kóde IBM na diernu pásku elektronickým organizačným automatom CONSUL-253. Metabolický profil je znázornený vo forme stĺpcového diagramu (histogramu), pričom sa hladiny jednotlivých parametrov metabolického profilu konfrontujú s referenčnými hladinami v intervale spoľahlivosti 95 % a odchýlky sa vyjadrujú v jednotkách, definovaných ako $\frac{1}{2}$ intervalu spoľahlivosti pre každý parameter. Týmto postupom volený výpočet umožňuje zostrojenie takého profilového záznamu, kde prekročenie intervalu spoľahlivosti 95 % akéhokoľvek parametru je veľmi názorné. Počítač súčasne vyhotovuje tabuľku presne vypočítaných hodnôt odchýlok od referenčných hladín a umožňuje tiež určiť počty abnormalít pre jednotlivé parametre u testovaných zvierat.

metabolický profil; samočinný počítač; dojnice; interval spoľahlivosti 95 %; parametre biochemického profilu; histogram

Metabolické testy predstavujú dôležitú časť informácií, ktoré sú odrazom zdravotného stavu testovaných zvierat. Počet diagnosticky významných parametrov sa stále rozširuje a dopĺňa vzhľadom k napredujúcemu intenzívnemu štúdiu biochemických procesov pri rôznych patologických stavoch organizmu v predklinickom alebo klinickom štádiu.

Vývoj laboratórnej techniky smeruje jednoznačne k automatizácii, čo v klinickej chémii umožňuje získať doteraz nepoznaným spôsobom veľké množstvo informácií, ktoré sa nebudú stačiť vyhodnocovať tradične. Preto sa ukazuje ako nevyhnutné použiť výpočtovú techniku na spracovanie všetkých potrebných údajov do ľahšie interpretovateľnej formy pre uľahčenie stanovenia diagnózy. Presnejšie to znamená poskytnúť koncentrovaný a diagnosticky vysokocenný informačný materiál, ktorý umožní čo najobjektívnejšie zhodnotiť zdravotný stav organizmu.

Ako prví použili samočinný počítač na vyhodnotenie metabolických testov u dojníc Rowlands a Pocock (1971), keď vyhodnotili metabolický profil dojníc opísaný Paynem a i. (1970) v tzv. histogramoch (stĺpcových diagramoch).

Ako je známe z uvedenej práce, v histogramoch porovnávali priemerné hodnoty každého parametra metabolického profilu (napr. obsah vápnika, fosforu, horčíka atď.

v krvnom sére) v testovanom súbore dojníc a ich rozdiel vyjadrili v jednotkách smerodajnej odchýlky. Toto umožnilo znázorniť v jednom diagrame všetky sledované parametre a ich prípadné odchýlky od priemerných hodnôt populácie.

V našej práci sme zostavili program na vypočítanie a zakreslenie metabolického profilu vo forme stĺpcového diagramu v programovacom jazyku FORTRAN IV pre samočinný počítač TESLA-200, s využitím organizačného automatu CONSUL-253 na prípravu vstupných údajov. Metabolický profil sa hodnotí v intervale spoľahlivosti 95 % pre každý sledovaný parameter, pričom odchýlky od referenčných hodnôt sa vyjadrujú v jednotkách, definovaných ako $\frac{1}{2}$ intervalu spoľahlivosti 95 %.

MATERIÁL A METÓDY

VÝBER PARAMETROV METABOLICKÉHO PROFILU

Na vyhodnotenie metabolického profilu samočinným počítačom sme vybrali tieto parametre: vápnik, fosfor, horčík, sodík, draslík, celková bielkovina, GOT, GPT, glukóza krvného séra, nárazníková kapacita krvnej plazmy (NK), pH moču a čistý acidobázický výlučok moču (ČABV).

Na základe štatistického spracovania výsledkov profilových testov v nami sledovaných chovoch sme určili pre každý parameter ako referenčné údaje hranice hodnôt v intervale spoľahlivosti 95 %. Koeficientom asymetrie sme zhodnotili u viacerých parametrov typ rozdelenia hodnôt v ich súborech (tab. I.) Intervaly spoľahlivosti

I. Referenčné hodnoty parametrov krvného séra, plazmy, resp. moču metabolicky zdravých kráv v intervale spoľahlivosti 95 % a koeficient asymetrie niektorých súborov — The reference values of the parameters of the blood serum, plasma and/or urine in metabolically normal cows in a 95% confidence interval; the coefficient of asymmetry of some sets

Parameter	Materiál	Interval spoľahlivosti 95%	Jednotka histogramu	Koeficient asymetrie
Ca mg na 100 ml	sérum	8,0 — 11,2	1,60	0,423
P mg na 100 ml	sérum	5,1 — 7,9	1,40	0,081
Mg mg na 100 ml	sérum	1,7 — 3,0	0,65	—
Na mg na 100 ml	sérum	307,0 — 341,0	17,00	—
K mg na 100 ml	sérum	17,2 — 22,8	2,80	0,242
NK obj % CO ₂	plazma	46,0 — 59,0	6,50	—
CB g%	sérum	5,8 — 8,1	1,15	0,380
Gluk mg na 100 ml	sérum	49,0 — 73,0	12,00	0,340
GOT μ mol na ml	sérum	1,0 — 2,2	0,60	—
GPT μ mol na ml	sérum	0,8 — 1,7	0,45	—
pH	moč	8,02 — 8,03	0,18	—
ČABV mmol l ⁻¹	moč	100,4 — 203,4	51,50	—

v prípadoch, v ktorých je určený koeficient asymetrie, sú počítané pre množiny hodnôt náhodného výberu $n = 230$ až 280 ; v ostatných prípadoch $n = 150$.

Pri hodnotení parametrov metabolického profilu na základe referenčných hodnôt sa v danom prípade neberú do úvahy stádové rozdiely, laktačné štádium, vek zvierat, resp. geneticky podmienené rozdiely. Uvedený spôsob spracovania údajov umožňuje však aj vyhodnotenie metabolického profilu jedného stáda, ak sa do vstupu pre počítač vložia – ako referenčné – údaje týkajúce sa zdravých jedincov stáda, čo by malo zvlášť význam pri dlhodobom sledovaní dynamiky zmien koncentrácie rôznych metabolitov a enzymatických aktivít v danom stáde.

SPRACOVANIE VSTUPNÝCH ÚDAJOV

Vstupné údaje pre vyhotovenie záznamu metabolického profilu sa nadierajú v stanovenom poradí na diernu pásku v kóde IBM automatom CONSUL-253 (tab. II).

II. Vstupné údaje pre vyhotovenie záznamu metabolického profilu, dierované a kontrované pomocou CONSULU-253 – Input data for metabolism profile record, punched and controlled by means of the CONSUL-253 automatic device

1 +++++Metabolický test JRD C 25. 3. 1976 13 5 0.25 42											
2 CA	9.6	1.6	8	8.6	8.4	8.8	8.5	8.9	8.6	8.1	8.7
2 P	6.5	1.4	8	5.7	5.4	5.5	5.9	6.0	6.1	5.3	5.6
2 MG	2.4	0.7	8	2.7	2.9	3.1	2.4	2.6	2.3	3.0	2.6
2 NA	324	17	8	325	349	332	315	326	300	317	335
2 K	20.0	2.8	8	26.3	25.8	26.8	27.0	26.2	26.3	26.4	25.6
2 CB	6.9	1.2	8	6.2	6.4	6.0	5.9	6.3	5.8	6.1	6.4
2 NK	52.5	6.6	8	48	50.2	45.8	53.3	42.7	50.1	47.9	46.9
2 GLUK	51.0	12.0	8	76.8	73.7	79.9	75.7	68.8	84.8	76.3	78.9
2 GOT	1.6	0.6	8	2.0	2.6	2.1	2.2	1.9	1.4	1.9	1.8
2 GPT	1.2	0.4	8	1.4	1.1	1.3	1.0	1.2	1.8	1.5	1.8
2 PH	8.2	0.18	8	7.5	8.0	7.6	7.6	7.3	7.4	7.7	7.3
2 ČABV	151.8	51.5	8	28.8	41.8	31.9	25.7	33.6	15.8	24.0	28.7

RIADKY

V prvom riadku je názov meraného súboru, dátum odberu biologického materiálu a údaje súvisiace s merítkom histogramu. Druhý až trinásty riadok obsahuje údaje o jednotlivých parametroch metabolického profilu.

STĽPCE

V prvom stĺpci sú uvedené identifikátory viet pre počítač.

V druhom stĺpci sú zaznamenané názvy sledovaných parametrov biochemického profilu krvi a moču. Môžu obsahovať maximálne osem znakov.

Tretí stĺpec obsahuje ako referenčné hodnoty pre každý parameter stredné hodnoty intervalu spoľahlivosti 95 % (aritmetické priemery sledovaných parametrov metabolického profilu jedincov bez klinických príznakov onemocnenia).

Štvrtý stĺpec obsahuje merné jednotky pre každý parameter, definované ako $\frac{1}{2}$ jeho intervalu spoľahlivosti 95 %. Jednotka (J) má rozmer koncentrácie.

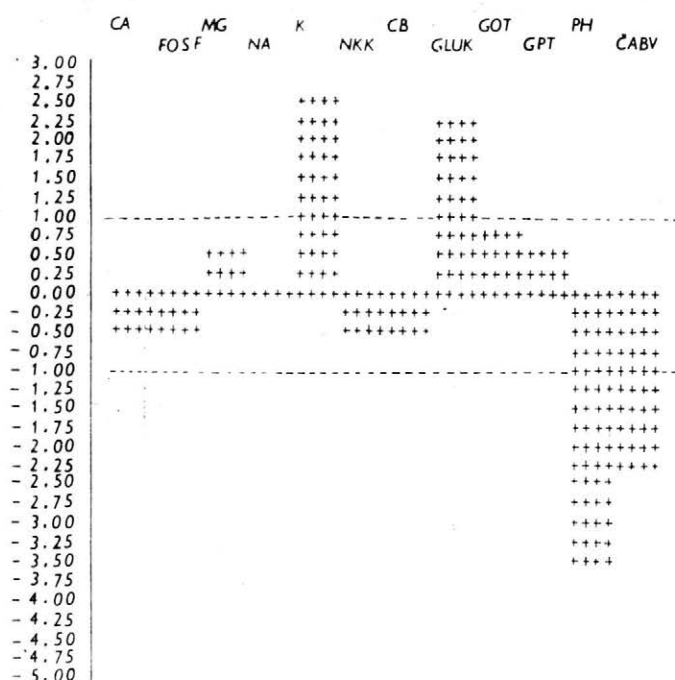
Piaty stĺpec určuje počet nameraných hodnôt.

Šiesty až posledný stĺpec (v danom prípade ôsmy) obsahuje jednotlivé namerané hodnoty parametrov. Ich poradie zodpovedá poradiu vyšetrovaných jedincov.

Počet parametrov aj počet meraní môže byť ľubovoľne veľký. Z diernej pásky prevezme počítač TESLA-200 všetky údaje snímačom, vyhotoví profilový záznam, a to tak, že konfrontuje aritmetické priemery nameraných hodnôt parametrov s referenčnými a vyjadrí ich odchýlky v predom stanovených, už definovaných jednotkách (J).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Uvedeným postupom volený výpočet umožňuje zostrojenie takého profilového záznamu, v ktorom prekročenie intervalu spoľahlivosti 95 % akéhokoľvek parametru je veľmi názorné. Originálny záznam z počítača vyzerá takto (obr. 1):



1. Pôvodný grafický záznam metabolického profilu, vyhotovený počítačom TESLA-200 — The original graphical record of metabolism profile from the TESLA-200 computer

Na ordináte je nanosená v plus a mínus smere stupnica jednotiek (J), ktorej delenie je voliteľné. V našom prípade má jednotka štvrtinové delenie. Nulovým bodom stupnice prechádza základná čiara, ktorá reprezentuje referenčnú hladinu pre každý parameter. Presné hodnoty odchýlok počítač natlačí pre každý parameter pod diagram ako samostatnú tabuľku (tab. III). Výšky stĺpcov udávajú veľkosť odchýlok aritmetických priemerov meraných súborov v už určených jednotkách od referenčných hodnôt. Je zrejmé, že čím má parameter väčšiu odchýlku od referenčnej hodnoty, tým je v plus alebo mínus smere stĺpec vyšší.

V porovnaní s prácou Rowlandsa a Pocockovej (1971) v našom histograme zvolená merná jednotka odchýlok umožňuje priamo ich vyjadrenie vzhľadom na referenčné hranice. Program počítača je možné

III. Presné hodnoty odchýlok a aritmetických priemerov pre jednotlivé parametre súboru, vypočítané zo vstupných údajov pre počítač — Exact values of deviations and arithmetic means for individual parameters of the set, as calculated from the computer input data

Parameter	Priemer súboru	Priemer referenčný	Jednotka J	Odchýlka vyjadrená v jednotkách J
Ca	8.57	9.6	1.6	-0.64
P	5.68	6.5	1.4	-0.58
Mg	2.70	2.4	0.7	0.43
Na	324.8	324.0	17.0	-0.05
K	26.3	20.0	2.8	2.25
NK	48.1	52.5	6.6	-0.67
CB	6.2	6.9	1.2	-0.58
GLUK	76.86	51.0	12.0	2.15
GOT	1.98	1.6	0.6	0.63
GPT	1.37	1.2	0.4	0.43
pH	7.55	8.2	0.18	-3.61
ČABV	28.70	151.8	51.5	-2.39

lahko doplniť tak, aby súčasne vyhodnocoval aj počet jedincov označených poradovým číslom, u ktorých sa zistili prekročenia referenčných hladín niektorých parametrov.

Rowlands a Pocock (1971) vo svojej práci vyhodnocujú abnormality v stáde, a to takých jedincov, ktorí v ľubovoľnom z parametrov prekračujú populačné priemery o viac ako ± 3 smerodajné odchýlky. Týmto výpočtom napr. pre anorganický fosfor v krvnom sére pri populačnom priemere 5,4 mg na 100 ml a $s = 0,90$ mg na 100 ml im vychádzajú hranice ako kritériá abnormality 2,7 až 8,1 mg na 100 ml. Autori neuvádzajú, či testovali typ rozdelenia hodnôt vo vyšetrovaných súboroch parametrov.

Pri zisťovaní populačných priemerov a smerodajných odchýlok je dôležité poznať typ rozdelenia hodnôt v testovanom súbore. Treba brať do úvahy, že toto rozdelenie je obvykle len približne normálne, súmerné. To znamená, že počítanie $s \pm 3$ smerodajnými odchýlkami, ktoré zahŕňa 99,73 % hodnôt súboru, platí len pre ideálny priebeh Gaussovej krivky, definovanej (Šmelko, 1963) ako:

$$f(X) = \frac{1}{s\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{X_t - \bar{X}}{s} \right)^2}$$

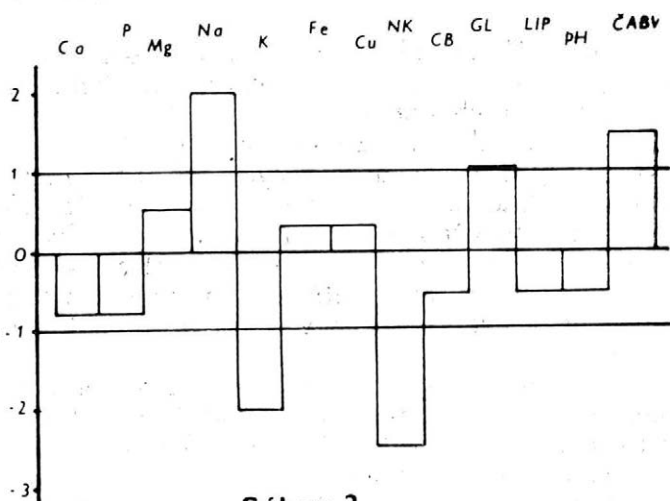
Vzhľadom na to sme testovali súbory hodnôt niektorých parametrov (vápnik, draslík, fosfor, celková bielkovina, glukóza) a stanovili sme pre ne asymetrický koeficient. Najnižšiu hodnotu asymetrického koeficientu sme zistili u anorganického fosforu v krvnom sére, a to 0,081, čo v danom prípade poukazuje na približne normálne rozdelenie početnosti hodnôt súboru (Šmelko, 1963). Ostatné parametre podľa asymetrického koeficientu zodpovedali mierne lavostrannému rozdeleniu (tab. I).

Podľa našich výsledkov pri referenčnej hodnote pre fosfor – 6,5 mg na 100 ml $\pm$ 3 s vychádzajú hranice 4,35 až 8,60 mg na 100 ml, čo dobre zodpovedá údajom viacerých autorov: Slanina a i. (1976) – 4,0 až 8,2 mg na 100 ml, Jagoš a i. (1975) – 4,8 až 7,0 mg na 100 ml, Willer, Rossow (1976) – 5,3 až 7,9 mg na 100 ml, Starý (1976) – 5,0 až 7,0 mg na 100 ml, Machýček a i. (1976) – 5,0 až 7,0 mg na 100 ml atď. Podobne by bolo možné rozobrať každý parameter.

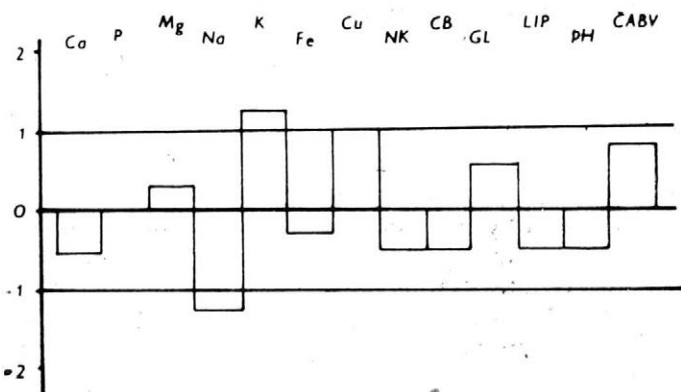
PRÍKLAD POUŽITIA HISTOGRAMU

V JRD B sa u dojnic jednalo o subklinickú metabolickú poruchu, vyvolanú nesprávnou kŕmnu dávkou, charakterizovanou prebytkom SNL (862 g na kus a deň) ako aj prebytkom ŠJ (2636 g na kus a deň). Pre komplexné vyšetrenie sa vybralo 12 dojnic. Krv a moč sa od nich odoberala opakovane, a to pred úpravou kŕmnej dávky a 18 dní po úprave na úroveň, zodpovedajúcej ČSN pre danú mliečnu produkciu a hmotnostnú kategóriu dojnic. Metabolický profil opakovane testovaných zvierat je vidieť na obr. 2. Pred úpravou dávky (súbor 1) sú zrejme výkyvy viacerých parametrov vysoko nad referenčné hladiny, resp. pod ne. Po úprave kŕmnej dávky (súbor 2) sa metabolický profil ustáluje na referenčných

Súbor 1



Súbor 2



2. Metabolický profil dojnic pred úpravou kŕmnej dávky (súbor 1) a 18 dní po úprave kŕmnej dávky (súbor 2) – The metabolism profile of dairy cows before a change in the feed ration (set 1) and 18 days after the change (set 2)

hodnotách. K uvedeným histogramom patria ešte tabulky početného vyčíslenia abnormalít, ako aj tabulky odchýlok, vyjadrených v jednotkách histogramu.

Súhrnne možno povedať, že predložená práca poukazuje zatiaľ len na počiatočné možnosti využitia samočinného počítača pri vyhodnocovaní metabolického profilu dojníc a je v súlade so všeobecnou snahou využívať čo najefektívnejšie metódy práce v záujme ochrany zdravia hospodárskych zvierat.

Podakovanie

Dakujem prom. matematikovi Jánovi Váľkovi vo Výpočtovom stredisku VŠLD vo Zvolene za ochotnú výpomoc a rady pri zostavovaní programu pre počítač TESLA-200.

Zoznam skratiek a symbolov

ČABV	— čistý acidobázický výlučok moču
NK	— nárazníková kapacita krvnej plazmy
GOT	— glutamát-oxalacetátová transamináza
GPT	— glutamát-pyruvátová transamináza
n	— počet hodnôt použitých pre výpočet
J	— jednotka definovaná ako $1/2$ intervalu spoľahlivosti 95% pre každý parameter; má rozmer koncentrácie
X	— premenná veličina $f(X)$
$\bar{X}$	— aritmetický priemer
s	— smerodajná odchýlka
e	— prirodzené číslo $2,718282/$
SNL	— stráviteľné dusíkaté látky
SJ	— škrobové jednotky

Literatúra

- JAGOŠ, P. — BOUDÁ, J. — ILLEK, J. — HOFÍREK, B.: Rozpracování metabolických testů k určení skrytých poruch výměny látkové u dojníc v podmínkách průmyslových komplexů. [Závěrečná zpráva.] Brno, Vysoká škola veterinární 1975.
- MACHÝČEK, V. — ZÝKA, V. — ZIMA, P. — LEBEDA, M.: Metodika provádění a interpretace metabolického testu u skotu. Zprávy ÚSVÚ, Praha, VŠV Brno. 1976.
- PAYNE, J. M. — SALLY, M. D. — MANSTON, M. I. — FAUKLS, M.: The use of metabolic profile test in dairy herds. Vet. Rec., 87, 1970, č. 6, s. 150.
- ROWLANDS, G. J. — POCOCK, R. M.: A use of computer as an aid in diagnosis of metabolic problems of dairy herds. J. Dairy Res., 38, 1971, s. 353.
- SLANINA, L. — POLÁČEK, M. — LEHOCKÝ, J. — SOKOL, J. — GAJDOŠÍK, D.: Metabolický profil u hovädzieho dobytká a systém jeho vyhodnotenia. XIV. vedecká konferencia, VŠV Košice, 15.—16. 9. 1976.
- STARÝ, Z.: Komplexní vyhodnocení ZMT u skotu z nasávací oblasti Plzeň za období 1974—1975. [Odborná experimentální tematická práce.] Státní veterinární ústav, Plzeň 1976.
- ŠMELKO, Š.: Štatistické metódy v lesníctve. VŠLD Zvolen. Slov. vyd. pôdohosp. liter., Bratislava 1963.
- WILLER, H. — ROSSOW, N. — DUDZUS, M.: Stickprobenplanung in der Stoffwechselüberwachung von Milchviehherden. Mh. VetMed., 13, 1976, s. 497-502.

Došlo dňa 20. 7. 1977

БЕСЕДА, И. — ВАЛКА, Й. (Институт физиологии сельскохозяйственных животных АИ СССР, Кошице): Оценка метаболических профильных тестов с помощью ЭВМ. Vet. Med. Praha, 22, 1977 (12) : 705-712.

Составлена программа оценивания метаболических профильных тестов у коров с помощью ЭВМ ТЕСЛА-200 на программном языке ФОРТРАН. Машина оценивает и рисует ме-

таболический профиль на основе входных данных, перфорированных в коде IBM на перфоленте с помощью электронного орг. автомата КОНСУЛ-253. Профиль изображается в форме колончатой диаграммы (гистограммы), причем уровни параметров профиля конфронтируются с референтными уровнями в интервале надежности 95 %, а отклонения выражаются в единицах, дефинированных как 1/2 интервала надежности для каждого параметра. Таким образом, расчеты позволяют очертить такой профильный факт, где выход за рамки интервала надежности 95 % любого параметра сразу виден. В то же время машина изготавливает таблицу точных значений отклонений от референтных уровней, позволяя уточнить число абнормальностей у отдельных параметров тестируемых животных.

метаболический профиль; ЭВМ; коровы; интервал надежности 95 %; параметры биохимического профиля; гистограмма

BESEDA, I. — VÁLKA, J. (Institute of Animal Physiology of the Slovak Academy of Sciences, Košice): *Computer Processing of the Data from Metabolism Profile Tests*. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (12) : 705-712.

A programme has been developed for the evaluation of metabolism profile tests in dairy cows by means of the TESLA-200 computer in the FORTRAN language. The computer evaluates and plots the metabolism profile from input data punched on tape in the IBM code by the CONSUL-253 electronic organization automatic device. The metabolism profile is represented as a column graph (histogram), the levels of individual parameters being confronted with the reference levels with a 95 % confidence interval and the deviations are expressed in units defined as 1/2 of the confidence interval for each parameter. Calculation by this procedure enables the construction of a profile record in which any step beyond the 95 % confidence interval in any parameter is seen very clearly. The computer also produces a table of exactly calculated values of deviations from the reference levels and makes it possible to determine the numbers of abnormalities for individual parameters in the animals tested.

metabolism profile; computer; dairy cows; 95 % confidence interval; parameters of biochemical profile; histogram

BESEDA, I. — VÁLKA, J. (Institut für Physiologie der Wirtschaftstiere der Slowakischen Akademie der Wissenschaften, Košice) : *Bewertung der metabolischen Profile mittels automatischer Rechenanlage*. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (12) : 705-712.

Die Verfasser entwickelten ein Programm für Bewertung metabolischer Profilteste bei Milchkühen mit der Rechenanlage TESLA-200 in der Programmierungssprache FORTRAN. Die Rechenanlage bewertet und zeichnet das metabolische Profil aus den Eingangsdaten ein, die im Kode IBM auf das Lochband mittels elektronischer Organisationsmaschine CONSUL-253 gelocht werden. Das metabolische Profil wird in Form des Säulendiagramms (Histogramm) dargestellt, wobei die Niveaus einzelner Parameter des metabolischen Profils mit den Referenzniveaus im Zuverlässigkeitsintervall von 95 % konfrontiert werden; die Abweichungen werden in den als 1/2 des Zuverlässigkeitsintervalls für jeden Parameter definierten Einheiten ausgedrückt. Die durch diesen Vorgang erwählte Berechnung ermöglicht die Zusammensetzung einer solchen Profilaufnahme, wo die Überschreitung des Zuverlässigkeitsintervalls von 95 % jedweden Parameters sehr anschaulich ist. Die Rechenanlage erarbeitet gleichzeitig die Tabelle der genauen ermittelten Werte der Abweichungen von Referenzniveaus und ermöglicht auch die Anzahl der Abnormitäten für einzelne Parameter bei den untersuchten Tieren zu bestimmen.

metabolisches Profil; automatische Rechenanlage; Milchkühe; Zuverlässigkeitsintervall von 95 %; Parameter des biochemischen Profils; Histogramm

Adresa autorov:

Ing. Imrich Beseda, CSc., ing. Jozef Válka, Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice, laboratórium, 960 86 Zvolen

VYUŽITÍ HMOTOVÉ SPEKTROMETRIE PŘI CHEMICKÉ ANALÝZE ORGANOFOFOROVÝCH SLOUČENIN

F. Bartoníček, J. Hrušovský, L. Hanuš

BARTONÍČEK, F. — HRUŠOVSKÝ, J. — HANUŠ, L. (Vojenský veterinární výzkumný ústav, Praha; Fyzikální ústav ČSAV, Praha): *Využití hmotové spektrometrie při chemické analýze organofosforových sloučenin*. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (12): 713-721.

Studovali jsme možnost využití hmotové spektrometrie při chemické analýze vysoce biologicky aktivních organofosforových sloučenin. Výsledky ukazují, že ze všech studovaných látek má nejsložitější hmotové spektrum O-etyl-S- (2-dimethylaminoetyl) ester kyseliny metylthiofosforité. Ve spektru byly zjištěny charakteristické fragmenty o m/e: 42, 44, 58, 71 a 72 (odpovídají přítomnosti skupiny $(CH_3)_2NCH_2CH_2-$) a fragmenty o m/e 81, 95, 97, 105 a 125, charakteristické pro fosfoesterovou skupinu. Hmotová spektrometrická analýza ukázala, že MS metoda je použitelná při kvalitativní analýze vysoce biologicky aktivních organofosforových sloučenin, jakou je O-etyl-S-(2-dimethylaminoetyl)ester kyseliny metylthiofosforité.

pesticidy; hmotová spektrometrická analýza

Syntéza organických sloučenin fosforu s insekticidním účinkem otevřela cestu k výzkumu nových chemických látek a vysokou biologickou účinností. Jejich význam je podle Fedorova a Semenova (1962), Kiesilinskiho (1966), Sidella a Groffa (1974) a Stoechra (1963) velmi značný.

Výzkum látek s insekticidním účinkem pokračoval velmi intenzivně zvláště po skončení druhé světové války, a to hlavně ve Švédsku, Velké Británii a USA. Výsledkem byly sloučeniny s abnormálně vysokou toxicitou, připravené Goshem (1955) a Tammelinem (1957a, b, c, 1958).

Jednou z podobných látek, připravených Goshem (1955) a Tammelinem (1957, 1958), je i O-etyl-S-(2-dimethylaminoetyl) ester kyseliny metylthiofosforité. Z prací Bartoníčka (1974, 1975), Bartoníčka a Hrušovského (1970), Bartoníčka aj. (1975), Beneše aj. (1973) a Tulacha (1968) a dalších je známo, že tato substance není chemicky čistá sloučenina. Doprovodné nečistoty byly identifikovány chromatografickou metodou na tenké vrstvě (Bartoníček, Hrušovský, 1970; Beneš aj., 1973) a na papíru (Tulach, 1968). Jako směs neznámých látek se jevil tento organofosfát i při kvalitativní analýze plynovou chromatografií (Svojanovský 1967).

Při chemické analýze samotných organofosfátových sloučenin, resp jejich reziduálních zbytků, získaly v posledních letech významné místo metody hmotové spektrometrie. U velmi složitých směsí, u nichž jednotlivé složky nelze prakticky ani identifikovat a jejichž úplná analýza by byla v některých případech neproveditelná, může se často poměrně jednoduše a s postačující přesností hodnotit přítomnost sloučenin podle molekulové hmotnosti.

Předností zmíněné metody hmotové spektrometrie využil ve svých pracích Gunter (1962) při identifikaci metabolických štěpů organofosforových sloučenin. Obecný přehled se zřetelem na reziduální analýzu organofosforových sloučenin podali Kantner a Mumma (1966) a Westlake a Gunter (1967). Cavanah (1963) sledoval hmotové fragmenty organofosfátů používaných jako pesticidních látek, jakými jsou např. parathion, malathion, thio- a thionoizoméry Systoxu, dále Phosdrin, DDVP a Guthion. Obdobnými problémy se zabývali Damico (1966), Cooks a Gerrard (1968) a Jörg aj. (1966).

Sloučeniny, odpovídající přibližně strukturálně našemu studovanému typu organofosfátu, poskytují při kvalitativní analýze hmotovou spektrometrii typické štěpy s obsahem atomu fosforu o m/e 47, 79, 93 a 125. Vznikají rozštěpením molekuly sloučeniny ve vazbě C-S. Druh a velikost štěpených fragmentů silně ovlivňuje přítomnost různých druhů substituentů.

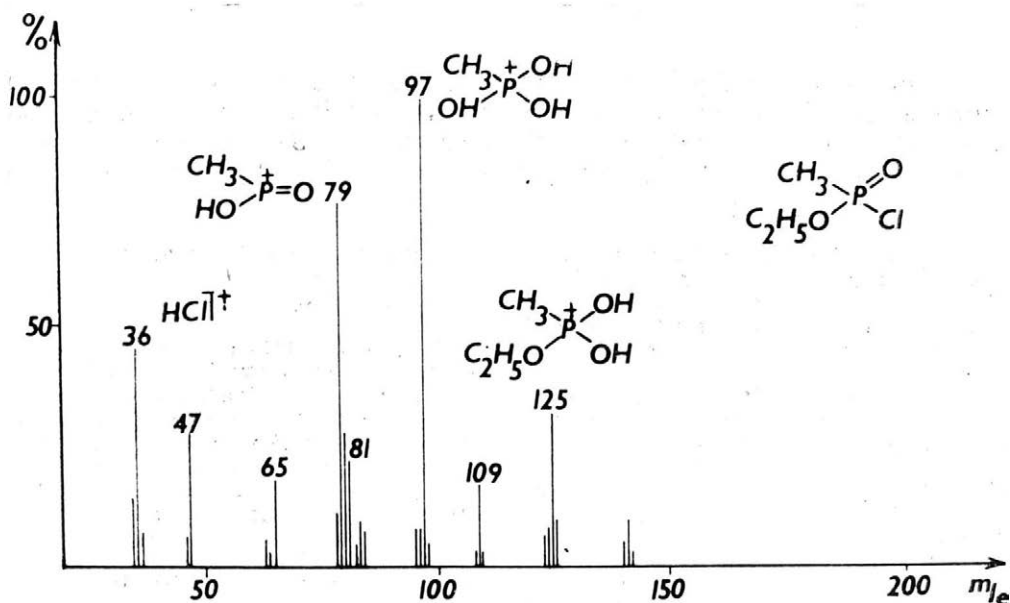
MATERIÁL A METODY

Hmotově-spektrometrickou analýzu jsme dělali na spektrometru s dvojitou fokovací japonské proveniencí typu JEOL-D 100 v kombinaci s plynovým chromatografem JEOL JGC 20 KFP doplněným DATA SYSTEMem pro zpracování výsledků.

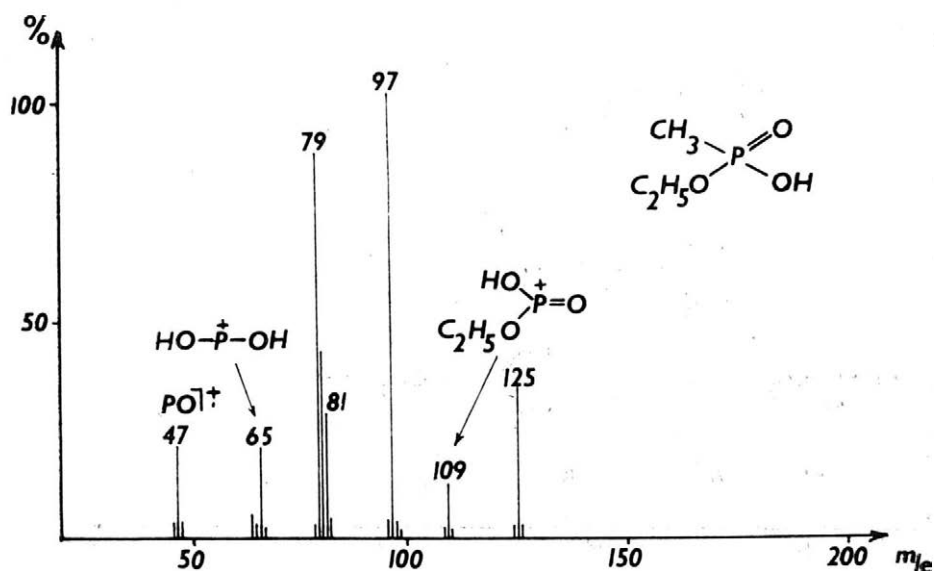
Vzorky studovaných látek byly analyzovány metodou „direct inlet“. Navážka na jednu analýzu činila maximálně 50 μg substance v 1 μl *n*-hexanu. Analyzované látky byly vloženy do speciálních tenkostěnných kapilár s maximálním obsahem 100 $\mu\text{g cm}^{-1}$.

Hmotově-spektrometrickému šetření byly podrobeny předpokládané degradační produkty, např. O-etyler ester kyseliny metylfosforité, O-etyler ester kyseliny metylchlorfosforité, O-etyler ester kyseliny metylthiofosforité, bis-(2-dimethylaminoetan)-disulfid včetně studované sloučeniny. 2-dimethylaminoetanthiol analyzován nebyl, protože má velmi nízký bod varu.

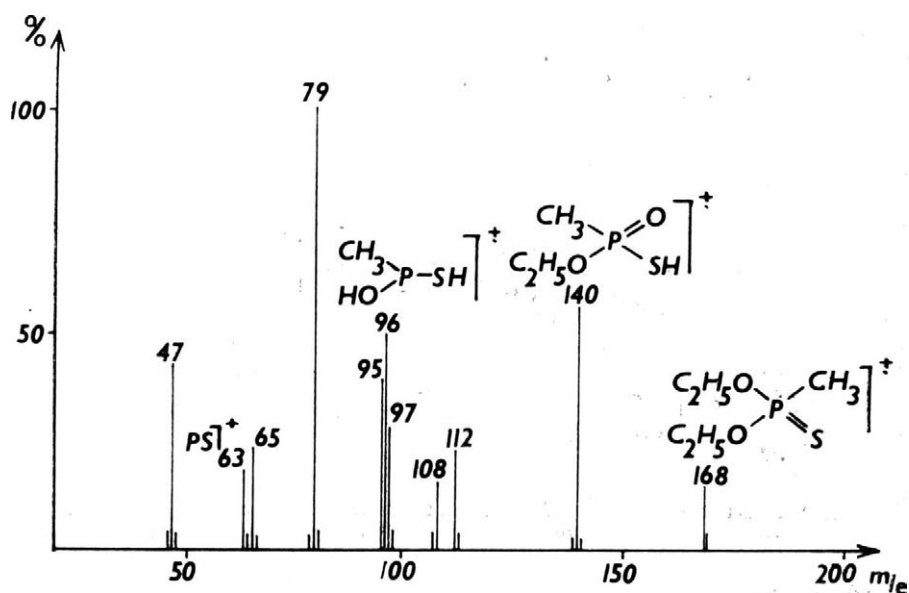
VÝSLEDKY



i. Hmotové spektrum O-etyler esteru kyseliny metylchlorfosforité — Mass spectrum of methylchlorphosphorous acid O-ethyl ester

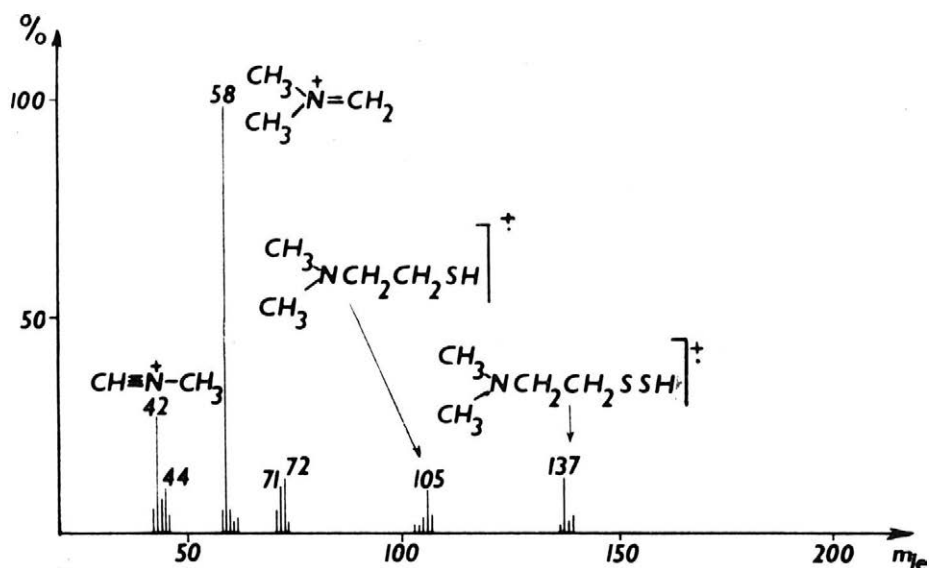


2. Hmotové spektrum O-etylésteru kyseliny metylfosforité — Mass spectrum of methylphosphorous acid O-ethyl ester

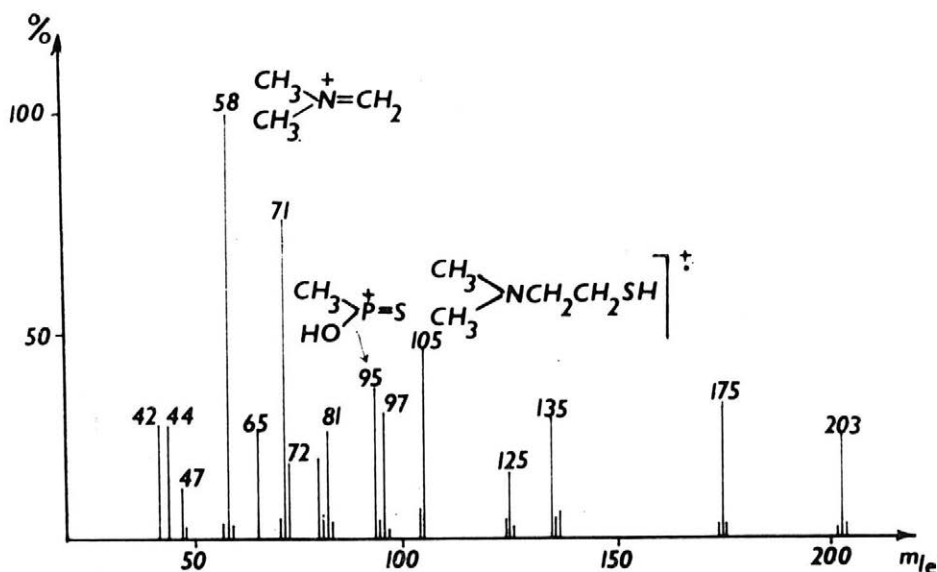


3. Hmotové spektrum O-etylésteru kyseliny metylthiofosforité — Mass spectrum of methylthiophosphorous acid O-ethyl ester

Ve hmotových spektrech byly vedle základních a charakteristických štěpných fragmentů identifikovány ionty, neodpovídající studovaným sloučeninám. Byly to především ionty o m/e 18 (voda), 28 a 32, příslušející vzduchu, a fragmenty o m/e 41, 43, 55, 67 a 71, charakterizující alkylové zbytky uhlovodíků. Ionty o m/e 186 a 262 tvořily pozadí přístroje.



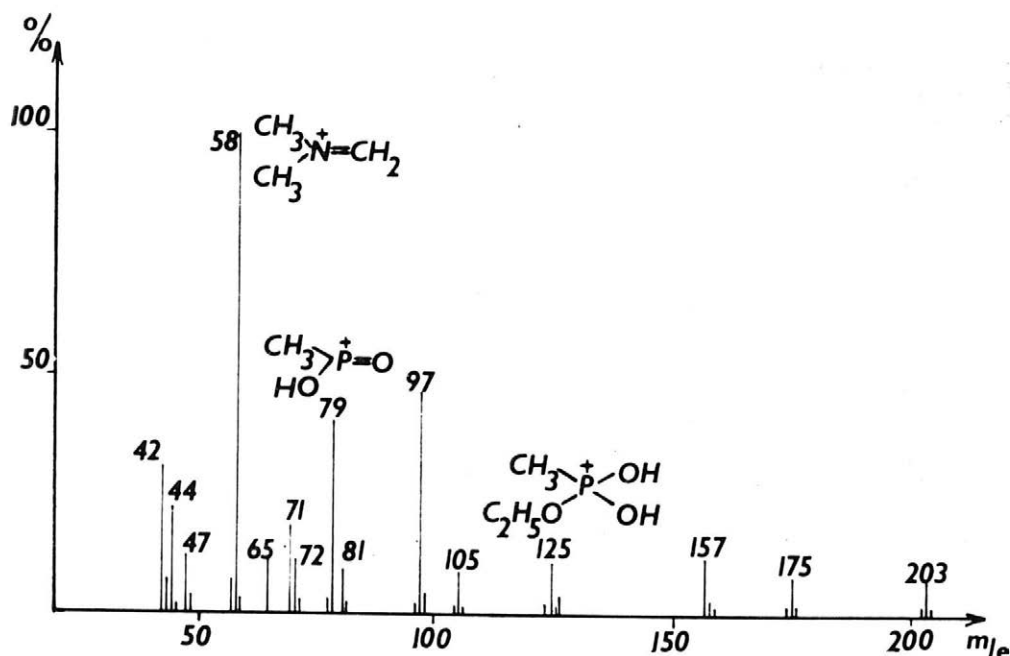
4. Hmotové spektrum bis-(2-dimethylaminoetan)disulfidu — Mass spectrum of bis-(2-dimethylaminoethane) disulphide



5. Hmotové spktrum O-etyl-S-(2-dimethylaminoetyl)esteru kyseliny metylthiofosforité ($t = 37^\circ\text{C}$) — Mass spectrum of methylthiophosphorous acid O-ethyl-S-(2-dimethylaminoethyl) ester ($t = 37^\circ\text{C}$)

Velmi často a intenzívně se v hmotových spektrech objevoval štěp o m/e 149, odpovídající zbytkům italátů z organických materiálů.

O-etyléster kyseliny metylchlorfosforité: Hmotové spektrum této sloučeniny obsahovalo značné množství iontových fragmentů od m/e 28 do m/e 262. Nejvýznamnějšími a charakteristickými štěpy této látky byly fragmenty o m/e 36, 47, 65, 79, 97, 109 a 125 (obr. 1).



6. Hmotové spektrum O-etyl-S-(2-dimethylaminoetyl)esteru kyseliny metylthiofosforité ($t = 92^\circ\text{C}$) — Mass spectrum of methylthiophosphorous acid O-ethyl-S-(2-dimethylaminoethyl) ester ($t = 92^\circ\text{C}$)

O-etyléster kyseliny metylfosforité, uvedený na obr. 2, se velmi podobá spektru předchozího esteru. S výjimkou iontového fragmentu o m/e 36 byly nalezeny stejné štěpy jako u předešlé sloučeniny.

Ve hmotovém spektru O-etylésteru kyseliny metylthiofosforité byly zjištěny navíc proti obdobným analogům iontové štěpy o m/e 63, 95, 108, 112, 140 a 168 (obr. 3).

Bis-(2-dimethylaminoetan)disulfid (obr. 4) poskytl zcela jiné složení hmot ve spektru. Identifikovány byly fragmenty o m/e 42, 44, 58, 71, 72, 105 a 137.

Ze všech studovaných látek bylo zjištěno nejsložitější hmotové spektrum u O-etyl-S-(2-dimethylaminoetyl) esteru kyseliny metylthiofosforité. Jedná se o fragmenty o následujícím m/e : 42, 44, 47, 58, 65, 71, 72, 79, 81, 95, 97, 105, 125, 135, 157, 175 a 203 (obr. 5 a 6).

DISKUSE

Z hlediska hmotově-spektrometrického byla hlavní pozornost zaměřena na identifikaci doprovodných nečistot, obsažených v O-etyl-S-(2-dimethylaminoetyl) esteru kyseliny metylthiofosforité. Přítomnost nečistot bez bližší specifikace byla potvrzena pracemi Bartoníčka a Hrušovského (1970), Bartoníčka aj. (1975), Beneše aj. (1973), Svojanovského (1967) a Záborského (1969) chromatografickou metodou na tenké vrstvě Silikagelu, resp. na papíře typu Whatmann č. 3 (Tulach, 1968). V dřívějších pracích (Bartoníček, 1974, 1975; Bartoníček aj., 1975) jsme identifikovali jednu z nečistot jako

bis-(2-dimethylaminoetan)disulfid (vrstva – Kieselgel G, 250 μ m, rozpouštědlová soustava – cyklohexan-butylacetát-diethylamin (12:6:1), doba vyvíjení – 45 minut, detekce – chemická 0,5% PdCl_2 v 0,5 M HCl , $R_F = 0,21$).

Každá ze studovaných sloučenin poskytovala při hmotově-spektrometrické analýze charakteristické iontové částice, typické pro daný druh a strukturu sloučeniny.

U O-etylésteru kyseliny metylchlorfosforité (obr. 1) ve spektru byly zjištěny fragmenty v rozmezí hmot od 36 do 142:

m/e 36 – odpovídá molekulárnímu iontu kyseliny chlorovodíkové, který charakterizuje všechny sloučeniny s obsahem atomu chlóru. Jiné štěpné fragmenty s chlórem ve hmotovém spektru této sloučeniny identifikovány nebyly,

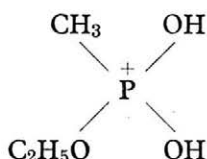
m/e 47 – tento zlomek byl charakterizován jako iont typu PO^+ ;

m/e 79 – tato hmota charakterizuje iontový štěp o složení $\text{CH}_4\text{O}_2\text{P}^+$, který v obdobných látkách vzniká,

m/e 81 – přítomnost této hmoty svědčí pro iont $(\text{OH})_2\text{P}^+\text{O}$, který je ve shodě s elementárním složením H_2PO_3 s chybou 0,0000 jednotky,

m/e 97 – odpovídá složení $\text{CH}_6\text{O}_3\text{P}^+$ a je ve shodě s iontem téhož složení (chyba 0,0002 jednotky),

m/e 109 – iontový fragment, vznikající při štěpení esterů pětimocného fosforu s pravděpodobnou strukturou



m/e 142 – pro iont o m/e 142 přichází v úvahu struktura ionizovaných molekul hydratované hmoty hydrolyzovaného produktu.

Z nalezených iontových radikálů a iontových fragmentů lze soudit, že O-etyléster kyseliny metylchlorfosforité je s největší pravděpodobností v hydrolyzované formě.

O-etyléster kyseliny metylfosforité (obr. 2) poskytuje tytéž fragmenty jako ester kyseliny metylchlorfosforité s výjimkou iontového zlomku o m/e 36.

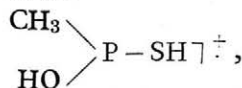
Hmotové spektrum O-etylésteru kyseliny metylthiofosforité odpovídá v hlavních rysech předchozím látkám (obr. 3). V analogii s předešlými úvahami lze jednotlivým iontovým druhům připsat následující formule:

m/e 47 – iont typu PO^+

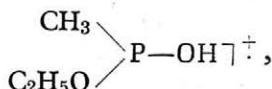
m/e 63 – analog fragmentu 47, v němž atom kyslíku je nahrazen atomem síry,

m/e 95 – iontový fragment o složení $\text{CH}_3\text{P}^+(\text{OH})\text{S}$,

m/e 96 – této hmotě lze připsat strukturu



m/e 108 – lze charakterizovat strukturou



m/e 112 – tomuto fragmentu přísluší složení $\text{CH}_3\text{PO}(\text{OH})_2^{\dagger+}$,

m/e 140 – iontový fragment vzniká s největší pravděpodobností při odštěpení postranního řetězce ve vazbě C–S z ionizované molekuly.

Hmotové spektrum potvrdilo, že vcelku jednoduchou sloučeninu, jako je O-etyler ester kyseliny metylthiofosforité, je z hlediska jeho štěpení v proudu elektronů velmi obtížné hodnotit. Identifikované štěpné fragmenty potvrdily, že v některých případech se vazba P–S štěpí (m/e 47, 65, 79 a 97). Způsob štěpení je silně závislý na druhu substituentů. Do dnešní doby se nepodařilo jednoznačně potvrdit, jak ovlivňují odlišné substituenty způsob štěpení.

Jako důkaz látky, která strukturálně neodpovídá tomuto typu esteru, je přítomnost štěpného zlomku o m/e 168. Fragment lze charakterizovat přítomností dvou etoxi-skupin, vázaných na centrální atom fosforu.

Ve spektru bis-(2-dimethylaminoetan)disulfidu (obr. 4) se objevilo značné množství fragmentů, jejichž hmota se pohybovala od m/e 28 do m/e 186. Pro charakter analyzované sloučeniny jsou nejvýznamnější druhy hmot o m/e 42, 44, 58, 71, 72, 105 a 137:

m/e 42 – doprovází vždy fragmenty o m/e 58, charakteristické pro skupinu $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2-$,

m/e 44 – přísluší iontům $(\text{CH}_3)_2\text{N}^+$,

m/e 58 – je jednoznačně přítomen ve sloučeninách obsahujících skupinu $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2-$,

m/e 71 a 72 – vyskytují se ve spektrech sloučenin se skupinou $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2-$,

m/e 105 – odpovídá iontradikálu, vzniklému z ionizované molekuly disulfidu přenosem vodíku,

m/e 137 – přítomnost fragmentu o m/e 139 naznačuje, že ionty o m/e 137 obsahují dva atomy síry.

Hmotové spektrum O-etyl-S-(2-dimethylaminoetyl) esteru kyseliny metylthiofosforité (obr. 5) je podle všech předpokladů značně složitě a obsahuje dosud zjištěné fragmenty předchozích sloučenin. Ve spektru byly zjištěny charakteristické fragmenty o m/e 42, 44, 58, 71 a 72 (odpovídající přítomnosti skupiny $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2-$), dále 81, 95, 97, 105 a 125, charakteristické pro fosfoesterovou skupinu.

Hmotové spektrum organofosfátu poskytuje tři molekulární ionty, které svojí hmotou neodpovídají degradačním produktům. Jsou to štěpné fragmenty o m/e 157, 175 a 203.

Iont o hmotě m/e 203 se nejvíce blíží hmotě samotného esteru. Druhý z trojice (m/e 175) vznikl z fragmentu 203 odštěpením C_2H_4 , který dále ztrátou jedné molekuly vody poskytuje poslední ze skupiny, iont o m/e 175.

Elementární analýzu uvedených molekulových iontů nebylo možné udělat, protože jejich množství bylo velmi malé.

Molekulární iont o m/e 203 může být s největší pravděpodobností výsledkem reakce dvou fosforových esterů, uvolněných při hydrolytickém odštěpení thiolu z molekuly esteru.

Hmotově-spektrometrické vyšetření potvrdilo, že organofosfát tohoto typu je termolabilní a za vyšší teploty se rozkládá. Důkazem je přítomnost fragmentu o m/e 157 ve spektru při teplotě 92 °C (obr. 6) a proměnné hodnoty poměru iontových zlomků 71/79 a 58/125.

Literatura

- BARTONÍČEK, F. — HRUŠOVSKÝ, J.: Chromatografické sledování O-ethyl-S-(2-dimethylaminoethyl) esteru kyseliny methylthiofosforité. In: Sborník vědeckých prací VVŠ, 1970, č. s. 45—50.
- BARTONÍČEK, F.: Příprava radioaktivního ^{35}S -thiocholinu o vysoké specifické aktivitě. In: Sborník vědeckých prací VVÚ. Praha 1974, s. 63—78.
- BARTONÍČEK, F.: Fosforylované deriváty thiocholinů, označené radioaktivní sírou ^{35}S . I. Syntéza ^{35}S -2-dimethylaminoethanthiolu. Voj. zdrav. listy, 1975, č. 1, s. 20-23.
- BARTONÍČEK, F. — HRUŠOVSKÝ, J. — BENEŠ, J. — PROKŠOVÁ, M.: Fosforylované deriváty thiocholinů, označené radioaktivní sírou ^{35}S . II. Příprava O-ethyl-S-(2-dimethylaminoethyl) esteru kyseliny methylthiofosforité. Voj. zdrav. listy, 1975, č. 1, s. 24—32.
- BENEŠ, J. — PROKŠOVÁ, M. — BARTONÍČEK, F. — HRUŠOVSKÝ, J.: Organová distribuce O-ethyl- ^{35}S -(2-dimethylaminoethyl) esteru kyseliny methylthiofosforité. I. Orientační pokusy na modelu krysy. In: Sborník vědeckých prací VVÚ. Praha 1973, č. 9, s. 73—88.
- CAVANAUGH, L. A.: Mass spectrometry of pesticides. S. R. I. Pest. Res. Bull., 1963, č. 3, s. 1—27.
- COOKS, R. C. — GERRARD, A. F.: Electron impact induced rearrangements in compounds having the P—S bond. J. chem. Soc., B, 1968, s. 1327-1334.
- DAMICO, J. N.: The mass spectra of some organophosphorus pesticide compounds. J. A. O. A. C., 49, 1966, s. 1027-1043.
- FEDOROV, V. — SEMENOV, E.: Otravljajuščie vėščestva armii SSA. Voennyj vestnik, 6, 1962, s. 121—123.
- GOSH, R.: Brit pat., 738839, 1955.
- GUNTHER, F. A.: Instrumentation in pesticide residue determination. Adv. Pest. Control Res., 5, 1962, s. 191-194.
- JÖRG, J. — HOURIERT, R. — SPITELLER, G.: Massenspektren von Pflanzenschutzmitteln. Mh. Chem., 97, 1966, s. 1064—1087.
- KANTNER, T. R. — MUMMA, R. O.: Application of mass spectroscopy to pesticide residues analysis. Residue Rev., 16, 1966, s. 138—167.
- KIESILINSKI, T.: O pewnych właściwościach toksykodynamicznych gazow fosforo-organicznych. Lekarz wojskowy, 42, 1966, s. 393—397.
- SIDDELL, R. F. — GROFF, W. A.: The reactivity of cholinesterase inhibited by VX and Sarin in man. Toxic. appl. Pharmac., 27, 1974, s. 241-252.
- STOEHR, R.: Die Kampfeigenschaften des „V“ Gases. Z. Militärwissenschaft, 7, 1963, s. 47—49.
- SVOJANOVSKÝ, V.: Možnosti kombinovaného detektoru s plamenoionizačním detektorem pro citlivé a selektivní stanovení nejdůležitějších OF. Civilní obrana, 4, 1967, s. 144—150.
- TAMMELIN, L. E.: Methyl-fluoro-phosphorylcholines. Two synthesis cholinergic drugs and their tertiary homologues. Acta chem. scand., 11, 1957a, s. 589—565.
- TAMMELIN, L. E.: Dialkoxo-phosphorylthiocholines, alkoxymethyl-phosphorylthiocholines and analogous choline esters. Acta chem. scand., 11, 1957b, s. 1340—1349.
- TAMMELIN, L. E.: Isomerisation of omega-dimethylaminoethyldiethyl thiophosphate. Acta chem. scand., 11, 1957c, s. 1738—1744.
- TAMMELIN, L. E.: Acetic propionic and butyric esters of 2-dimethylaminoethanol, 2-dimethylaminoethanthiol and 2-dimethylamino-1-methylethanol. Acta chem. scand., 11, 1958, s. 487—490.
- TULACH, J.: Mechanismus účinku OF na organismus. In: Sborník vědeckých prací VLVDÚ JEP, Hradec Králové 1968, s. 40—70.
- WESTLAKE, W. E. — GUNTHER, F. A.: Advances in gas chromatographic detectors illustrated from applications to pesticide residue evaluation. Residue Rev., 18, 1967, s. 175-203.
- ZÁBRANSKÝ, J.: [Dílčí závěrečná zpráva ČAZ — VÚPP.] Praha 1969.

Došlo dne 16. 3. 1977

БАРТОНІЧЕК, Ф. — ГРУШОВСКИ, Й. — ГАНУШ, Л. (Военный научно-исследовательский ветеринарный институт, Прага; Институт физики АН ЧССР, Прага): Применение масс-спектрометрии в химическом анализе органофосфорных соединений. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (12) : 713-721.

Мы изучали возможность использования масс-спектрометрии в химическом анализе биоло-

*Priloha 2. zpráva -
překladována za 8h. 7.00*

POLENOV, A. L.: O žizennem puti i sekretornom cikle nejrosekretornych kletok gipotalamusa. Arch. anat., gist., embryol., 1974, č. 7, s. 5-19.

SOROKIN, P. A. — SIMONENKO, V. V. — KOROLEV, B. A.: Kliničeskije nabljudenija pri dlitel'noj gipodinamii. Problemy kosmičeskoj biologii, XIII, 1969, s. 24-34.

TARMAS, J. — GALASIŇSKAJA-POMYKOLOVA, I.: Dvujadryškovyje, dvujadernyje i „dvojnyje“ nejrony v centralnoj nervnoj systeme. Arch. anat., gist., embryol., 1974, č. 10, s. 25-29.

VLADIMIROV, S. V. — IVANOVA, G. N.: Izmenenija aktivnosti supraoptičeskich jader gipotalamusa i distal'nych otделov gipotalamogipofyzarnoj nejrosekretornoj systemy morskych svinok pod vlijaniem vysokoj temperatury vnešnej sredy. Arch. anat., gistol., embryol., 1976, č. 9, s. 36-41.

Došlo dňa 24. 8. 1977

ДЕМЕТЕРОВА, М. — ШКАРДА, Р. (Институт ветеринарии, Кошице): Морфологическая картина невросекреторных клеток *nucleus supraopticus* и *paraventricularis* у цыплят при длительном гипокинезе. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (11) : 679-686.

Мы изучали морфологические изменения невросекреторных клеток *nucleus supraopticus* и *paraventricularis* у цыплят при длительном гипокинезе, продолжающемся 14, 28 и 42 дней. Мы фиксировали их мозги в 4% растворе нейтрального формалина, готовили серийные фронтальные парафиновые срезы гипоталамуса и окрашивали их гематоксилин-эозином. Морфологию клеток определяли с помощью светового микроскопа. Клеточные ядра измеряли при увеличении 3000 раз, чего мы достигли путем проектирования картины на молочном стекле микропроектором Пиктовал и объективным микрометром. Морфологическая картина клеток *nucleus supraopticus* во всех трех подонных группах осталась без изменений по сравнению с контролем. Обнаружено незначительное понижение объемов клеточных ядер, разница против контроля статистически незначима. Клетки *nucleus paraventricularis* отвечали на длительный гипокинетический стресс изменением функциональной активности, причем морфологическая картина клеток спустя 42 дня гипокинеза приближалась к контролю. Спустя 28 дней гипокинеза отмечено статистически значимое понижение объемов ядер клеток. Как видно, клетки *nucleus paraventricularis* выравниваются с гипокинетическим состоянием длительное время, или же их реакция замедлена по сравнению с *nucleus supraopticus*, и изменения морфологической картины в этот период заметнее.

nucleus supraopticus; nucleus paraventricularis; длительный гипокинезис; цыплята

DEMETEROVÁ, M. — ŠKARDA, R. (University of Veterinary Medicine, Košice): Morphological Picture of Neurosecretive Cells of the Nucleus supraopticus and paraventricularis in Chicken with Long-term Hypokinesia. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (11) : 679-686.

We investigated morphological changes in neurosecretive cells of the *nucleus supraopticus* and *paraventricularis* of the hypothalamus in chicken with long term hypokinesia lasting 14, 28 and 42 days. We fixed the brains of the chickens in a 4% solution of neutral Formalin, performed serial frontal paraffin cuts on the hypothalamus and stained them with hematoxylin-eosine. We investigated the morphology of the cells under a light microscope. We measured the cell nuclei when enlarged 3000-times by projecting the picture onto milk-glass by a Pictoval microprojector and by a stage micrometer. The morphological picture of the *nucleus supraopticus* cells in all three test groups remained unchanged when compared with the control group. We determined a slight decrease in the size of the cell nuclei, the difference from the control group was statistically insignificant. The *nucleus paraventricularis* cells responded to the long-term hypokinetic stress by a change in functional activity while the morphological picture of the cells after 42 days of hypokinesia approached the control. After 28 days there appeared a statistically significant reduction in the size of the cell nuclei. It appears that the *nucleus paraventricularis* cells take a longer time to adapt themselves to the hypokinetic condition or their reaction is slower than in the *nucleus supraopticus* and the changes in the morphological picture in this period are more significant.

nucleus supraopticus; nucleus paraventricularis; long-term hypokinesia; chickens

DEMETEROVÁ, M. — ŠKARDA, R. (Veterinärmedizinische Hochschule, Košice): *Morphologischer Spiegel der Neurosekretionszellen Nucleus supraopticus und paraventricularis bei Hühnern während langfristiger Hypokinese*. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (11) : 679-686.

Es wurden morphologische Veränderungen der Neurosekretionszellen *Nucleus supraopticus* und *paraventricularis* des Hypothalamus bei Hühnern während langfristiger, 14, 28 und 42 Tage dauernder Hypokinese studiert. Hirne der Hühner wurden in einer 4⁰/₀-igen Lösung neutralen Formalins fixiert, es wurden serienmäßige frontale Parafinschnitte des Hypothalamus angefertigt und mit Hämatixylin-Eosin gefärbt. Zellenmorphologie wurde mit Lichtmikroskop studiert. Zellenkörnermessung erfolgte bei einer Vergrößerung von 3000X, die durch Projizierung des Bildes auf Milchglas mit Mikroprojektor Pictoval und Objektivmikrometer erzielt wurde. Morphologischer Spiegel der Zellen *Nucleus supraopticus* blieb bei allen drei Versuchsgruppen gegenüber der Kontrolle unverändert. Es konnte ein geringer Rückgang des Zellenkörnervolumens festgestellt werden, Unterschied gegenüber Kontrolle war statistisch unsignifikant. Zellen *Nucleus paraventricularis* reagierten auf langfristigen hypokinetischen Stress durch Veränderung der Funktionsaktivität, wobei sich nach 42 Tagen der Hypokinese der morphologische Spiegel der Kontrolle näherte. Nach 28 Tagen der Hypokinese erfolgte ein statistisch signifikanter Rückgang des Zellenkörnervolumens. Es scheint, daß die Zellen *Nucleus paraventricularis* sich mit hypokinetischem Zustand eine längere Zeit ausgleichen oder daß ihre Reaktion im Vergleich zu *Nucleus supraopticus* verspätet ist und daß Veränderungen des morphologischen Spiegels in diesem Zeitraum merkbarer sind.

Nucleus supraopticus; Nucleus paraventricularis; langfristige Hypokinese; Hühner

Adresa autorov:

MVDr. Mária Demeterová, doc. MVDr. Rudolf Škarda, CSc., Vysoká škola veterinárska, Komenského 71, 041 81 Košice

ÚČINNOST NĚKTERÝCH DEZINFEKČNÍCH PROSTŘEDKŮ NA VIRUS MARKOVY NEMOCI DRŮBEŽE V PRACHU

V. Jurajda

JURAJDA, V. (Vysoká škola veterinární, Brno): Účinnost některých dezinfekčních prostředků na virus Markovy nemoci drůbeže v prachu. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (11) : 687-692.

V práci jsme ověřovali účinnost některých dezinfekčních prostředků, doporučených při sanitaci prostředí zamořeného virem Markovy nemoci (MN), či nově zaváděných do praxe. V pokusech *in vivo* na kuřatech plemene Rhode Island Red (RIR) byly testovány: 3% roztok louhu draselného (KOH), 2,5% roztok Dikonitu, 5% roztok chloraminu B, 3% roztok louhu sodného (NaOH), 3% roztok Jodonalu A a 2% roztok formalinu. Jako testovacího substrátu bylo použito prachu odebraného v podniku s výskytem akutní formy Markovy nemoci. Se zřetelem na provozní podmínky a ekonomické požadavky drůbežnictví prokázal nejlepší účinnost na devitalizaci viru MN v prachu 3% roztok Jodonalu a 2% roztok formalinu. Dále účinnost klesala v pořadí – 5% chloramin B, 2,5% Dikonit a 3% louh sodný. Louh draselný v 3% koncentraci se projevil jako nejméně účinný.

Markova nemoc; dezinfekce; louh draselný; louh sodný; chloramin B; Dikonit; Jodonal A; formalin

Markova nemoc (MN) je vysoce infekční onemocnění drůbeže, které se šíří horizontálně, a to vzduchem, kontaktem s infikovanou drůbeží, či stykem se zamořeným prostředím. Třebaže Sevoian (1968) popsal transovariální přenos infekce, je tento způsob většinou vylučován (Rispen s aj., 1969; Solomon aj., 1970), či považován za bezvýznamný vzhledem k ubikvitárnímu výskytu herpesviru MN v chovech drůbeže (Purchase, 1974). Protože k replikaci viru Markovy nemoci (VMN) a jeho kompletizaci dochází v epitelu pérových folikulů (Calnek aj., 1970), za nejdůležitější zdroj infekce se všeobecně považují deskvamované, odlupující se epiteliální buňky keratinizující vrstvy kůže a peří, hojně se vyskytující v prostředí s chovanou drůbeží (Jurajda a Klimeš, 1970).

Virus MN, chráněný vysušenými epiteliálními buňkami pérových folikulů a jinými proteinovými komponentami obsaženými v prachu, podestýlce, trusu, zbytcích krmiva apod., si zachovává infekciozitu déle než jeden rok (Hložánek, aj., 1973). Stačí potom jenom i krátkodobé zvěření prachu v halách a dochází k aerogenní infekci či reinfekci ustájených zvířat. Z toho vyplývá nezbytnost důkladného mechanického vyčištění hal a celého technologického zařízení mezi jednotlivými zástavy. Po mechanickém vyčištění by měla následovat dezinfekce účinnými dezinfekčními prostředky, umocňujícími konečný výsledek sanitačního procesu.

Literární údaje o účinnosti některých dezinfekčních preparátů na VMN jsou jen ojedinělé (Tóoth, 1971; Calnek a Hitchner, 1973).

V práci jsme se pokusili ověřit účinnost některých doporučovaných dezinfekčních prostředků (Směrnice o veterinární péči v chovu zvířat MZVŽ) nebo prostředků nově zaváděných do praxe na virus Markovy nemoci přítomný v prachu.

MATERIÁL A METODA

ODBĚR VZORKU PRACHU

Prach byl odebrán ve dvou různých časových obdobích (vzorek 1 a 2) v halách podniku s trvalým výskytem akutní formy Markovy nemoci u výkrmových kuřat vždy těsně po jejich vyskladnění. Prach byl odebírán z okenních parapetních desek, s povrchu elektrických vyhřívacích těles a z technologického zařízení hal do polyetylenových sáčků, které byly po naplnění uzavřeny a skladovány při laboratorní teplotě ve tmě až do doby vyšetření.

DEZINFEKČNÍ PROSTŘEDKY

Z dezinfekčních prostředků byly testovány: 5% roztok chloraminu B (testován 3×), 3% roztok louhu draselného (2×) a louhu sodného (3×), 2% roztok formalinu (3×), 2,5% roztok Dikonitu (1×) a 3% roztok Jodonalu A (1×).

Jako dezaktivacího prostředku bylo použito vesměs 1% roztoku sirnatanu sodného, pouze u louhu sodného to byl 3% roztok kyseliny ledové octové.

Aktivitu dezinfekčních prostředků i potřebu dezaktivacíních roztoků s laskavostí stanovil dr. K. Kubíček, CSc., z Vysoké školy veterinární v Brně.

2% formalin (48 % formaldehydu) — dezaktivace 1 : 1

2,5% Dikonit (58,15 % aktivního chlóru na g) — dezaktivace 1 : 1,5

5% chloramin B (26,59 % aktivního chlóru na g) — dezaktivace 1 : 1,1

3% NaOH — dezaktivace 1 : 1

3% Jodonal A — dezaktivace 1 : 0,08

EXPERIMENTÁLNÍ KUŘATA

Testovali jsme jednodenní kuřata plemene Rhode Island Red (RIR), vnímavá k infekci VMN (Biggs a Payne, 1963), pocházející z chovu ÚMG-ČSAV Praha. Kuřata byla infikována aerogenně po dobu 60 min. (Jurajda, 1972) a po infekci byla umístěna do vyčištěných roštových boxů. Kontrolní kuřata byla ustájena za stejných podmínek v jiném objektu stájí. Pokusy byly ukončeny za 55 dní po infekci (PI).

POKUSY

Vzorek prachu č. 1 byl testován dvakrát — v prvním pokusu za 98 až 119 dní po odběru a v druhém pokusu za 195 dní po odběru. Vzorek prachu č. 2 byl testován jednou, a to v pokusu č. 3 za 96 až 125 dní po odběru v hale. Skladování prachu bylo vynuceno okamžitým nedostatkem vhodných pokusných kuřat.

Z prachu byla připravena mixací 10% směs s jednotlivými dezinfekčními roztoky a po vysušení při laboratorní teplotě (ca za 24 až 48 hodin) rehomogenizována a použita k infekci. Průměrná dávka na jedno kuře byla 1 g prachu. Aby byla doba expozice přesněji limitována, byl v třetím pokusu po dvouhodinovém působení dezinfekční prostředek deaktivován přidáním roztoku sirnatanu sodného (u NaOH 3% ledové kyseliny octové) do směsi.

Jako kontrol bylo použito směsi prachu v pufrovaném fyziologickém roztoku o pH 7,2 (PBS), neošetřeného prachu v původním stavu a skupiny kuřat neinfikovaných.

Pokusy se hodnotily na základě výskytu klinických příznaků onemocnění či úhynu a patologicko-anatomického vyšetření.

VÝSLEDKY

Výsledky jednotlivých pokusů *in vivo* jsou uvedeny v tab. I a jejich celkové zhodnocení v tab. II.

I. Výsledky dezinfekce prachu v jednotlivých pokusech *in vivo* — The results of dust disinfection in individual tests *in vivo*

Dezinfekce prachu	Pokus	Diagnostika Markovy nemoci			
		mortalita	%	tumory	%
—	1	0/9 ¹⁾		0/9	
	2	3/29	10,3	8/26	30,8
	3	6/37	16,2	4/31	12,9
PBS	1	0/9		2/9	22,2
	2	5/29	17,2	5/24	20,8
	3	3/39	7,7	5/36	13,9
3 % KOH	1	0/12		0/12	
	2	2/26	7,7	2/24	8,3
2,5 % Dikonit	3	1/31	3,2	0/30	
	1	0/5		0/5	
5 % chloramin B	2	0/27		1/27	3,7
	3	0/29		0/29	
	1	0/11		1/11	9,1
3 % NaOH	2	0/29		0/29	
	3	0/26		0/26	
3 % Jodonal A	3	0/33		0/33	
	1	0/5		0/5	
2 % formalin	2	0/21		0/21	
	3	0/32		0/32	
	1	0/10		0/10	
Kontrola	2	0/23		0/23	
	3	0/16		0/16	

¹⁾ počet pozitivních/počet vyšetřovaných kuřat

Výskyt klinických příznaků onemocnění MN s následným úhynem dosahoval v kontrolních skupinách infikovaných neošetřeným suchým prachem a zvlhčeným prachem 12,0 a 10,4 % s průměrnou dobou úhynu 43,8 a 48,7 dní PI. Specifická MN-mortalita ve skupinách infikovaných dezinfikovaným prachem byla pozorována pouze po dezinfikaci Dikonitem (úhyn jednoho kuřete za 30 dní PI) a louhem draselným (5,3 %) s dobou úhynu 55 dní PI. U všech uhynulých kuřat byly zjištěny viscerální lymfoidní nádory.

Výskyt viscerálních lymfoidních tumorů, zjištěných u kuřat po zabiti při ukončení pokusů, s MN-mortalitou představuje z praktického hlediska vlastní ekonomické ztráty. Ty pak činily ve skupinách infikovaných neošetřeným suchým a zvlhčeným prachem 28 % a 26 %, po dezinfekci louhem sodným a Dikonitem 10,5 % a 3,2 % a po dezinfekci chloraminem B a louhem sodným 1,6 % a 1,5 %. U skupin infikovaných prachem dezinfikovaným formalinem a Jodonalem A nebyla pozorována MN-mortalita ani výskyt lymfoidních nádorů při ukončení pokusů.

II. Celkové hodnocení účinnosti dezinfekčních prostředků na virus MN v prachu v pokusech *in vivo*¹⁾ — Over-all evaluation of the effectiveness of disinfectants on the MD virus in dust tests *in vivo*¹⁾

Dezinfekce prachu	Diagnostika Markovy nemoci			
	mortalita	%	tumory	%
—	9/75 ²⁾	12,0	12/66	18,2
PBS	8/77	10,4	12/69	17,4
3 % KOH	2/38	5,3	2/36	5,6
2,5 % Dikonit	1/31	3,2	0/30	
5 % chloramin B	0/61		1/61	1,6
3 % NaOH	0/66		1/66	1,5
3 % Jodonal A	0/33		0/33	
2 % formalin	0/58		0/58	
Kontrola	0/49		0/49	

¹⁾ Kuřata RIR; aerogenní infekce 60 min.; testovací období 55 dní

²⁾ Počet pozitivních/počet vyšetřovaných

DISKUSE

Výskyt Markovy nemoci (MN) v chovech drůbeže značně poklesl, když byla zavedena vakcinace krůtím herpetickým virem. Vakcinace jen snižuje výskyt nádorovitých forem onemocnění, ale nezabraňuje infekci nebo replikaci virulentního VMN u vakcinovaných kuřat (Eidson aj., 1972). Vakcinace tedy vyřešila ekonomické problémy drůbežářského průmyslu i chovatelů, ale nijak neovlivnila životní cyklus viru MN a navíc značně zkomplikovala epizootologii nemoci i její diagnostiku.

Jednou z možností, jak přispět k eradikaci patogenního viru MN z populace drůbeže, je účinná dezinfekce prostředí. Vzhledem k tomu, že již mnohokrát byla prokázána infekciozita prachu v prostředí s chovanou drůbeží (Beasley aj., 1970; Jurajda a Klimeš, 1970; Hložánek aj., 1973), ověřovali jsme schopnost některých dezinfekčních prostředků devitalizovat virus MN v prachu pocházejícím z podniku se stálým výskytem akutní formy MN.

Ekonomické ztráty, jako hlavní kritérium účinnosti dezinfekčních prostředků na VMN v našich pokusech, byly zjišťovány ve všech testovaných skupinách, výjma Jodonalu A a formalinu.

Calnek a Hitchner (1973) dělali obdobné pokusy s hrubým extraktem péřových folikulů od MN-pozitivních kuřat. Po desetiminutové expozici louhem sodným a chlornanem sodným zjišťovali naprostou ztrátu infekčnosti testovaného substrátu pro buněčné kultury, kuřecí embrya i vnímavá kuřata, zatímco formalinové páry vykazovaly poněkud nižší účinnosti. Naproti tomu Tóth (1971) zjistil úplnou ztrátu infekčnosti nádorových buněk po ošetření 0,1 % formalinem při 37 °C za hodinu.

Určitá rozdílnost v účinnosti jednotlivých dezinfekčních prostředků popisovaná v literatuře i v naší práci, může být způsobena použitím roz-

дильных концентраций и forem дезинфекčního prostředku a testovaného substrátu. Inaktivace viru v nádorových buňkách probíhá jistě rychleji než ve vysušeném extraktu péroých folikulů či dokonce v prachu, kde přítomnost velkého množství proteinových složek nejenže chrání dokonaleji virus před inaktivací, ale snižuje i účinnost použitého дезинфекčního prostředku.

Při známé vysoké infekciozitě viru Markovy nemoci není vhodné považovat дезинфекci prostředí za dostatečný činitel při ochraně před infekcí. Pouze komplexní opatření, zahrnující vakcinaci, selekci rezistentních zvířat, zajišťování optimálních zoohygienických podmínek s maximální izolovaností chovů a používání účinné дезинфекce může přispět k eradikaci viru Markovy nemoci z chovů drůbeže.

Literatura

- BEASLEY, J. N. — PATTERSON, L. T. — McWADE, D. H.: Transmission of Marek's disease by poultry house dust and chicken dander. *Am. J. vet. Res.*, 31, 1970, s. 339—344.
- BIGGS, P. M. — PAYNE, L. N.: Transmission experiments with Marek's disease (fowl paralysis). *Vet. Rec.*, 75, 1963, s. 177—179.
- CALNEK, B. W. — ADLINDER, K. H. — KAHN, D. E.: Feather follicle epithelium: a source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *Avian Dis.*, 14, 1970, s. 219—233.
- CALNEK, B. W. — HITCHNER, S. B.: Survival and disinfection of Marek's disease virus and the effectiveness of filters in preventing airborne dissemination. *Poult. Sci.*, 52, 1973, s. 35—43.
- EIDSON, C. S. — KLEVEN, S. H. — ANDERSON, D. P.: Vaccination against Marek's disease. In: *Oncogenesis and Herpesviruses*, IARC, Lyon, 1972, s. 147—151.
- HLOŽÁNEK, I. — MACH, O. — JURAIDA, V.: Cell-free preparations of Marek's disease virus from poultry dust. *Folia biol.*, Praha, 19, 1973, s. 118—123.
- JURAIDA, V. — KLIMEŠ, B.: Presence and survival of Marek's disease agent in dust. *Avian Dis.*, 14, 1970, s. 188—190.
- PURCHASE, H. G.: Marek's disease virus and the herpesvirus of turkeys. *Prog. med. Virol.*, 18, 1974, s. 178—197.
- RISPENS, B. H. — VLOTEN, J. v. — MAAS, H. J. L.: Some virological and serological observations on Marek's disease: a preliminary report. *Br. vet. J.*, 125, 1969, s. 445—453.
- SEVOIAN, M.: Egg transmission studies of type II leukosis infection (Marek's disease). *Poult. Sci.*, 47, 1968, s. 1644—1646.
- SOLOMON, J. J. — WITTER, R. L. — STONE, H. A. — CHAMPION, L. R.: Evidence against embryo transmission of Marek's disease virus. *Avian Dis.*, 14, 1970, s. 752—762.
- TÓTH, B.: Experiments on the mode of spreading of Marek's disease virus. *Acta vet. hung.*, 21, 1971, s. 255—259.

Došlo dne 23. 9. 1976

ЮРАЙДА, В. (Ветеринарный институт, Брно): Эффективность некоторых дезинфицирующих средств на вирус болезни Марка у птицы в пыли. *Vet. Med.*, Praha, 22, 1977 (11): 687—692.

В работе испытывали эффективность некоторых дезинфицирующих средств, рекомендуемых при асенизации среды, зараженной вирусом болезни Марка (БМ), или нововводимых в практику. В опытах с живыми цыплятами породы род-айленд-ред (РАР) тестировались: 3 % раствор едкого калия (KOH), 2,5 % раствор Диконита, 5 % раствор хлорамина Б, 3 % раствор едкого натра (NaOH), 3 % раствор Йодонала А и 2 % раствор формалина. В качестве тест-субстрата служила пыль, взятая в предприятии с наличием острой формы болезни Марка. С учетом производственно-эксплуатационных условий и экономических

требований птицеводства наибольшую эффективность умерщвления вируса БМ в пыли показали раствор Йодонала А и 2% раствор формалина. Далее эффективность понижалась в последовательности — 5% хлорамин В, 2,5% Диконит и 3% NaOH. Едкий кали в концентрации 3% оказался наименее эффективным.

болезнь Марека; дезинфекция; едкий кали; едкий натр; хлорамин В; Диконит; Йодонал А; формалин

JURAJDA, V. (University School of Veterinary Medicine, Brno): *The Effectiveness of Some Disinfectants in the Control of Dust-Borne Marek's Disease Virus*. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (11) : 687-692.

Tests were performed to examine the effectiveness of some disinfectants, recommended for the environment sanitation infested with Marek's disease (MD) virus or disinfectants newly introduced in practice. The following preparations were used in tests with Rhode Island Red (RIR) chickens *in vivo*: 3% caustic potash lye (KOH), 2.5% solution of Dikonit, 5% solution of chloramin B, 3% caustic soda lye (NaOH), 3% solution of Iodonal A and 2% solution of formaline. Dust collected on a farm infested with the acute form of Marek's disease was used as testing substrate. Taking into account the operational conditions and economic requirements of poultry farming, the 3% solution of Iodonal A and 2% solution of formaline gave the best results in the devitalization of MD virus in dust. These two disinfectants were followed, as to the effectiveness, by 5% chloramin B, 2.5% Dikonit and 3% NaOH. Caustic potash lye at 3% concentration showed the lowest effectiveness.

Marek's disease; disinfection; caustic potash lye; caustic soda lye; chloramin B; Dikonit; Iodonal A; formaline

JURAJDA, V. (Veterinärmedizinische Hochschule, Brno): *Wirkung einer Desinfektionspräparate auf das Virus der Marekschen Geflügellähme im Staub*. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (11) : 687-692.

In der vorliegenden Arbeit überprüften wir die Wirksamkeit einiger Desinfektionspräparate, die bei der Sanitation des mit dem Virus der Marekschen Geflügellähme verseuchten Milieus empfohlen oder neu in die Praxis eingeführt werden. In Versuchen *in vivo* mit Rhode-Island-Red-Küken (RIR) wurden getestet: die 3prozentige Kalilaugenlösung, die 2,5prozentige Dikonitlösung, die 5prozentige Chloramin-B-Lösung, die 3prozentige Natronlaugenlösung, die 3prozentige Jodonallösung und die 2prozentige Formalinlösung. Als Testsubstrat wurde der in einem Betrieb mit Auftreten der akuten Form der Marekschen Geflügellähme entnommene Staub benutzt. Mit Hinsicht auf die Betriebsbedingungen sowie ökonomischen Anforderungen wies die beste Wirkung auf die Virusdevitalisierung im Staub die 3% Jodonallösung A und die 2% Formalinlösung auf. Die Wirkung der übrigen Desinfektionspräparate nahm in folgender Reihenfolge ab: 5% Chloramin B, 2,5% Dikonit und 3% NaOH. Die Kalilaugenlösung in 3prozentiger Konzentration erwies sich als weniger wirksam.

Mareksche Geflügellähme; Desinfektion; Kalilauge; Natronlauge; Chloramin B; Dikonit; Jodonallösung A; Formalin

Adresa autora:

MVDr. Vladimír Jurajda, Vysoká škola veterinární, Palackého 1-3, 612 42 Brno

ZJIŠŤOVÁNÍ PŘÍTOMNOSTI AFLATOXINU B₁ VE VEJCÍCH

J. Bartoš, Z. Matyáš

BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Zjišťování přítomnosti aflatoxinu B₁ ve vejcích*. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (11) : 693-699.

Částečně modifikovanými metodami podle Jacobsona a Wisemana (1974) a Holadaye a Lansdena (1975) bylo vyšetřeno 39 vajec a šest vzorků krmiv na přítomnost aflatoxinu B₁. Ve vejcích ani v netradičních krmivech s různým obsahem prasečích výkalů nebyl aflatoxin B₁ zjištěn.

aflatoxin; metody stanovení; vejce; krmiva

Je všeobecně známé, že krmiva mohou obsahovat aflatoxin. Z nich především pokrutiny z dovozu mohou být značným zdrojem aflatoxinů. U nás vyráběný bílkovinný koncentrát pro nosnice SK obsahuje až 80 % extrahovaných pokrutinových šrotů I. jakostní skupiny (sójové, podzemnicové, slunečnicové, tykvové, sezamové, kokosové a palmojádrové). Kompletní směs pro nosnice N pak obsahuje 20 % bílkovinného koncentráту SK (Krmné směsi, 1976). Podzemnicové šroty dovážené z Indie obsahují téměř ve 100 % vzorků aflatoxin (Fleischer, 1971). Existuje tedy potenciální možnost nálezu aflatoxinů i ve vejcích.

Účelem této práce bylo vybrat vhodnou metodu pro zjišťování aflatoxinu B₁ ve vejcích, tj. metodu dostatečně citlivou a s použitím chemikálií dostupných na našem trhu.

Allcroft a Carnaghan (1963) nezaznamenali příznaky toxicity u kachňat, jimž zkrmovali vajíčka nosnic krmených toxickým krmivem. Brown a Abrams (1965) krmili nosnice krmivem s obsahem 0,5 mg aflatoxinu v jednom kilogramu krmiva. Po zkrmování vajec kachňatům neprokázali rozdíl mezi pokusnou a kontrolní skupinou. Kratzer aj. (1969) nezjistili chemickou analýzou přítomnost aflatoxinu ve vejcích, mase, játrech a krvi nosnic, bílých leghornek, jimž bylo zkrmováno 2700 µg aflatoxinu v 1 kg krmiva po dobu 48 dní. Použili analytickou metodu, kterou popsal Wiley (1966) a její citlivost se pohybovala v rozmezí 3 až 5 µg na kg. Ani Abrams (1965) nezjistil aflatoxiny ve vejcích nosnic, jimž bylo zkrmováno krmivo s obsahem 0,75 mg aflatoxinů v jednom kilogramu.

Naproti tomu Wiseman (1968) prokázal aflatoxiny ve vejcích nosnic při zkrmování krmiva s obsahem 0,4 mg aflatoxinu v 1 kg (cituje Sims aj., 1970 — jako osobní sdělení). Sims aj. (1970) vyšetřovali vejce a játra nosnic produkčního typu De Kalb, jimž byly zkrmovány 2, 4, 8 mg aflatoxinu na kg krmiva. V žádném případě nenašli aflatoxin ve vejcích ani v játrech, i když použili dvou

různých metod. Zjistili však sníženou produkci vajec, poškození jater a jejich zvětšení ve skupině s nejvyšší koncentrací aflatoxinu.

Armbrrecht (1972) zkrmoval nosnicím bílého plemene dietu obsahující 400 μg aflatoxinu B₁ v kg a zjistil, že její vejce obsahovala průměrně 2 μg kg⁻¹.

Jacobson a Wiseman (1974) popsali metodu, kterou lze stanovit koncentraci 0,1 μg aflatoxinu v jednom kg substrátu. Prokázali přibližně lineární vztah mezi hladinou aflatoxinu zkrmovaného nosnicím masného typu kmene Arbor Acre a průměrným množstvím aflatoxinu zjištěným ve vejcích. Většina snesených vajec byla analyzována do 60 dní po snesení; uchovávána byla při teplotě 3 °C. Přítomnost aflatoxinu B₁ ve vejcích detekovali již při obsahu 0,1 mg aflatoxinu v kg krmiva. Průměrný nález ve vaječné hmotě činil 0,23 μg kg⁻¹. V jednotlivých vejcích zjišťovali 0,009 až 0,017 μg aflatoxinu. Při zkrmování 0,2 mg aflatoxinu v kg bylo průměrně zjišťováno 0,78 μg aflatoxinu v kg vaječné hmoty a v jednotlivých vejcích se obsah aflatoxinu pohyboval od 0,010 do 0,110 μg . Nejvyšší hodnoty byly zjištěny při zkrmování 0,4 mg aflatoxinu v 1 kg krmiva. Průměrný nález ve vejcích byl 1,4 μg kg⁻¹ vaječné hmoty a v jednotlivých vejcích 0,021 až 0,175 μg . Nálezy ve žlutcích byly poněkud větší než v bílých. Ve vejcích nosnic krmných krmivem bez aflatoxinu nebyl zjištěn v žádném případě aflatoxin. Byla-li vejce z třetí pokusné skupiny (0,4 mg aflatoxinu v kg krmiva) uchovávána při teplotě 3 °C po dobu devíti měsíců, pak aflatoxin ve vejcích zjištěn nebyl.

Naproti tomu Löttsch a Leistner (1976) nezachytili aflatoxin B₁ a G₁ ve vejcích ani při zkrmování 1000 μg aflatoxinu B₁ a 310 μg aflatoxinu G₁ v kg krmiva. Rezidua prokázali ve vejcích až při zkrmování 3000 μg (bílé plemeno) a 5000 μg (hnědé plemeno) aflatoxinu B₁ v 1 kg krmiva. Ve žlutcích nalézali vyšší koncentrace než v bílých. Dále zjistili, že při zkrmování vysokých dávek aflatoxinu B₁ (10 000 μg kg⁻¹) se během několika dnů snáška zastavuje. Domnívají se, že při zkrmování krmiva s aflatoxinem B₁ v množství 40 μg kg⁻¹ se nedá předpokládat nález aflatoxinů ve vejcích a že schválená tolerance 20 μg aflatoxinu B₁ v 1 kg krmiva pro nosnice zabezpečuje nezávadnou produkci vajec.

MATERIÁL A METODY

a) VYŠETŘOVÁNÍ VAJEC

Za základ jsme použili metodu Jacobsonovu aj. (1971), která je určena pro zjišťování aflatoxinů B₁ a M₁ v mléce a metodu Jacobsona a Wisemana (1974), která byla použita pro analýzu vajec. Metodu jsme částečně upravili a zkrátili. Námí použitý postup byl tento: k 50 g vaječné směsi přidávali 400 ml metylalkoholu p.a. a míchali v mixéru Eta stabil asi dvě minuty, pak jsme přidali 25 g křemelinu Hyflo Super Cel (Johns Manville, USA) a směs míchali ještě asi půl minuty. Tekutinu jsme pak filtrovali za podtlaku přes Büchnerovu nálevku s filtračním papírem a asi 1 cm vysokou vrstvou Hyflo Super Cel. Kádinku a vrstvu Hyflo Super Cel jsme promyli ještě v 75 ml metanolu. Filtrát jsme přenášeli do jednotlivé dělicí nálevky a zředili v poměru 1:1 4% roztokem chloridu sodného. Alkoholický roztok jsme nejdříve extrahovali 4X200 ml petroleteru nebo směsí petroleteru:hexan:benzen 2:1:2 a pak 4 X 100 ml chloroformu. Chloroformové extrakty jsme spojili a třepali s 300 ml 4% roztoku chloridu sodného. K chloroformové části jsme přidali asi 10 g Hyflo Super Cel a filtrovali. Pak jsme vzorek odpařovali téměř do sucha na rotačním vakuovém odpařováku. Do baňky jsme přidali 3 ml chloroformu, přelili do malé lékovky, opět promyli 2 ml chloroformu a přidali do lékovky. Chloroform jsme odpařili na vodní lázni. Zbytek jsme rozpustili v 60 μl chloroformu a nanášeli na neaktivovanou tenkou vrstvu silikagelu (Silufol UV 254, Sklářny Kavalier, n. p.) v množství 30 μl (vzorek) a 30 μl (vzorek + standard). Na tři starty uprostřed fólie jsme mikrodávkačem nanášeli při současném vysušování fénem standard, vzorek a vzorek se standardem. Vyvíjeli jsme v kyvetách při laboratorní teplotě nejdříve v dietyléteru. Po odstřižení asi 1/4 fólie tak, aby byly odstraněny nečistoty putující s čelem vyvíjecí soustavy a dosahující Rf větší než 0,3, jsme vyvíjeli v obráceném směru v soustavě chloroform:aceton 9:1. Chromatogram jsme prohlíželi pod UV lampou při 360 nm přístrojem Fluotest universal (fy Original Hanau Quarzlampen, NSR) a srovnávali standard se zkoušeným vzorkem.

Vyšetřili jsme celkem osm kusů konzumních vajec (kvalita C) pocházejících

z obchodní sítě a 31 kus vajec nosnic (plemeno Shaver) krmných krmivem bez vepřových exkrementů (9 kusů) a s 2,5 % (osm kusů), 5 % (deset kusů) a 10 % (čtyři kusy) vepřových exkrementů. K jednomu vzorku byl přidán standard aflatoxinu B₁ v množství 50 ng. Pokusy jsme dělali v dubnu až září 1976.

b) VYŠETŘOVÁNÍ KRMIV

Krmiva s různým obsahem exkrementů a krmiva kontrolní jsme vyšetřovali na možnou přítomnost aflatoxinu námi modifikovanou metodou Holadaye a Lansdena (1975): ke 100 g krmiva jsme přidávali 200 ml roztoku metanolu a vody (80:20) a třepali na třepačce asi $\frac{3}{4}$ hodiny. Po zfiltrování jsme do zkumavky odměřili 10 ml filtrátu a přidali 10 ml solného roztoku tohoto složení: 600 g chloridu sodného, 600 g octanu zinečnatého a 15 ml ledové kyseliny octové ve 4000 ml destilované vody. Zkumavku jsme těsně uzavřeli a silně třepali pět až deset vteřin. Do další zkumavky jsme přefiltrovali 15 ml, přidali 3 ml benzenu, uzavřeli zkumavku zátkou a silně třepali deset vteřin. Vrstvy jsme nechali oddělit a pipetou jsme přenesli horní benzenovou vrstvu do lékovky, benzen jsme odpařili na vodní lázni do sucha, přidali 100 μ l chloroformu a nanášeli na neaktivovanou tenkou vrstvu silikagelu (Silufoj UV 254, Sklářny Kavalier, n. p.) v množství 50 μ l (vzorek) a 50 μ l (vzorek+standard). Další postup byl shodný s postupem při analýze vajec. Některé vzorky jsme vyšetřovali ještě metodami, které popsali Barabolak aj. (1974), Pons aj. (1973) a Velasco (1970, 1972a, b, 1975) a které jsme modifikovali stejně jako popsanou metodu Holadaye a Lansdena (1975).

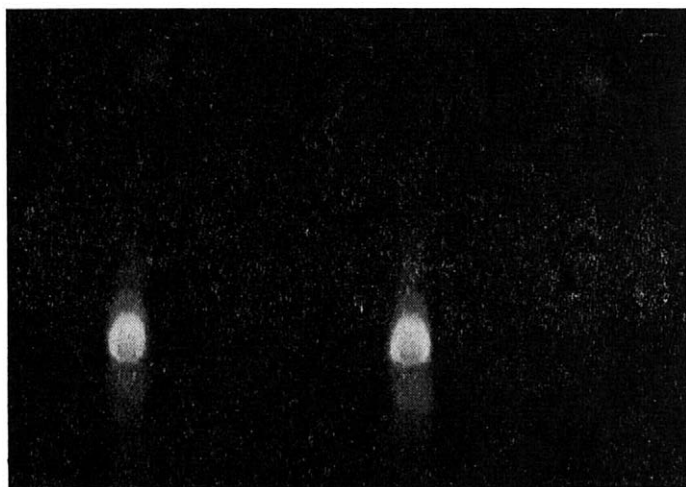
Vyšetřili jsme celkem šest vzorků krmných směsí pro nosnice s různým obsahem prasečích exkrementů (bez — dva vzorky; 2,5 % — jeden vzorek, 5 % — dva vzorky; 10 % — jeden vzorek). Celkem jsme udělali dvanáct testů. Ke dvěma vzorkům byl dále přidán standard aflatoxinu B₁ v množství 2 μ g a 0,5 μ g. Tyto vzorky byly vyšetřeny metodou podle Velasca. V obou případech byly skvrny aflatoxinu na fóliích velmi jasně patrné ve stejné výši jako vnitřní a vnější standard aflatoxinu B₁.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Námi použitá modifikace zjišťování aflatoxinu ve vejcích se lišila od metody Jacobsonovy aj. (1971) a Jacobsonovy a Wisemanovy (1974) v tom, že jsme pro nedostupnost na trhu použili místo celitu 545 Hyflo Super Cel, místo hexanu petroléter, eventuálně směs petroléter: hexan: benzen 2:1:2. Čištění uhlíčitánem měďnatým jsme vynechali. Dále jsme z týchž důvodů i pro možné ztracení aflatoxinů vynechali velmi pracné čištění na sloupcích a nahradili je jednodušším postupem, který spočívá v čištění přímo na tenké vrstvě silikagelu při vyvíjení v dietyléteru a po odstranění části fólie s nečistotami vyvíjení v obráceném směru ve směsi chloroform: aceton (9:1). Všechny uvedené modifikace se osvědčily, což jsme si ověřovali i přidáním standardu k rozmixovanému vzorku. Převážná většina nečistot zůstala v místě kolem startu, kdežto aflatoxin se podařilo oddělit — modré skvrny aflatoxinu v horní části (obr. 1, 2 a 3). Skvrny z vnějšího i vnitřního standardu jsou lokalizovány ve stejné výši, vzorek (uprostřed) je negativní.

Záchytnost metody byla dobrá. Při přidavku 50 ng aflatoxinu B₁ k 50 g vzorku jsme jej zjistili úplně (1 μ g kg⁻¹). Použitou metodou je možno stanovit i koncentraci 0,1 μ g kg⁻¹.

V našich orientačních předběžných pokusech se neosvědčila vyvíjecí soustava hexan: petroléter: benzen: chloroform: aceton (10:10:10:60:10), poněvadž vnitřní standard byl překrýván nečistotami. Obdobně se nám neosvědčil v analytickém postupu uhlíčitán měďnatý. K dispozici



1. Chromatogram vaječného extraktu po vyvíjení v dietyléteru, odstřížení části s největším množstvím nečistot a po vyvíjení ve směsi chloroform : aceton (9 : 1) v obráceném směru. Standard aflatoxinu, zkoušený vzorek, vzorek + standard (= vnitřní standard). Na odstranění nečistot byla použita směs petroléter : hexan : benzen (2 : 1 : 2) — Chromatogram of egg extract after developing in diethylether, cutting off the part with the biggest number of foreign bodies, and after developing in chloroform : acetone (9 : 1) mixture in inverse sense. Standard of aflatoxin, investigated sample, sample + standard (= inner standard). Petroleum-ether : hexane : benzene mixture used for removing foreign bodies

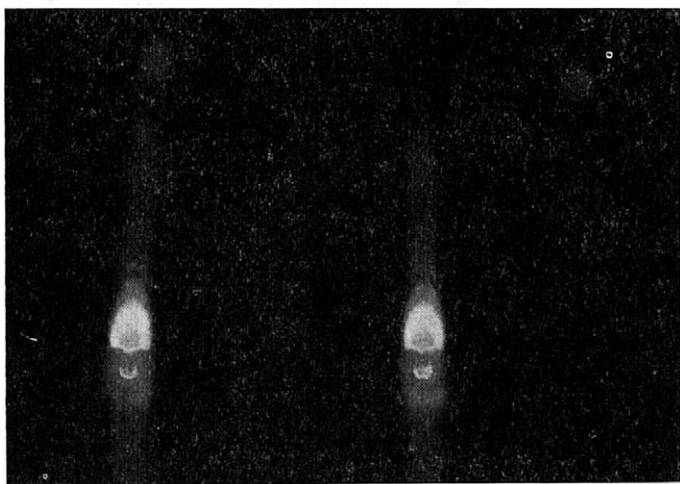
jsme měli dva starší vzorky — jeden byl modrý, druhý tmavě zelený. Při použití modrého vzorku byl vnitřní standard po vyvíjení ve směsi chloroform : aceton (9 : 1) překrýván nečistotami. Teprve po otočení fólie o 90° a dalším vyvíjení v dietyléteru byl vnitřní standard patrný. Při použití zeleného vzorku byl vnitřní standard po vyvíjení ve směsi chloroform : aceton dobře patrný.

Při použití směsi petroléter : hexan : benzen 2 : 1 : 2 k vytřepávání v dělicí nálevce se nečistoty lépe odstranily. Při nanášení na start bylo možné pozorovat méně hnědě zbarvených nečistot než po vytřepávání v samotném petroléteru. V obou případech jsme zjišťovali stejné množství žlutě zbarvených nečistot. Poněvadž po vyvíjení v dietyléteru a pak ve směsi chloroform : aceton (9 : 1) zůstaly nečistoty blízko startu (ne dále než 2 cm) a skvrny aflatoxinu byly dostatečně vzdáleny od nečistot, upustili jsme z důvodu šetření hexanu (dovoz) od směsi petroléter : hexan : benzen (2 : 1 : 2) a používali jsme k vytřepávání nečistot dále pouze petroléter samotný.

Námi použitá modifikace zjišťování aflatoxinu v krmivech se lišila od metody Holadaye a Lansdena (1975) i v tom, že jsme nepoužívali minisloupce s florisilem a neutrálním kysličníkem hlinitým. Zahuštěné extrakty jsme nanášeli na tenkou vrstvu silikagelu a purifikovali vyvíjením v dietyléteru. Jak florisil, tak i neutrální kysličník hlinitý se dováží ze zahraničí. Citovaní autoři uvádějí, že kysličník hlinitý může mít fluorescenční aktivitu, a tím ztěžuje identifikaci aflatoxinů. Za vhodné označují výrobky firem Merck a Woelm. Další výhoda nanášení vzorku přímo na tenkou vrstvu spočívá v možnosti provedení potvrzujících chemických testů pomocí různých reagensů, jako např. 20% kyseliny sírové aj.



2.-3. Chromatogram vaječného extraktu po vyvíjení v dietyléteru, odstřížení části s největším množstvím nečistot a po vyvíjení ve směsi chloroform:aceton (9:1) v obráceném směru. Standard aflatoxinu, zkoušený vzorek, vzorek+standard (= vnitřní standard). Na odstranění nečistot byl použit petroléter — Chromatogram of egg extract after developing in diethylether, cutting off the part with the biggest number of foreign bodies, and after developing in chloroform:acetone (9:1) mixture in inverse sense. Standard of aflatoxin, investigated sample, sample + standard (= inner standard). Petroleum-ether used for removing foreign bodies



V žádném z osmi vzorků vajec z obchodní sítě ani z 31 vzorku vajec nosnic, jimž byla zkrmována krmiva s různým obsahem prasečích výkalů, jsme nezjistili na chromatogramu skvrny, které by se barvou a polohou mohly blížit skvrnám aflatoxinovým. Tento nález je v souladu s negativním nálezem vzorků pokusných krmiv s různým obsahem vepřových exkrementů (2,5; 5; 10 %), jimiž byly kmeny pokusné skupiny nosnic. Vejce odebraná z obchodu pocházela od nosnic, jejichž krmivo jsme nemohli vyšetřovat.

Poněvadž v jiných pokusech jsme zjistili výskyt aflatoxinu B₁ i v bíl-

kovinném koncentráte pro nosnice SK, k němuž byly přidávány podzemnicové výlisky dovážené z Indie a které obsahovaly aflatoxin, bylo by účelné tuto problematiku i nadále sledovat.

Literatura

- ABRAMS, L.: Mycotoxicoses. J. S. Afr. vet. med. Ass., 36, 1965, s. 5–13.
- ALLCROFT, R. — CARNAGHAN, R. B. A.: Groundnut toxicity: an examination for toxin in human food products from animals fed toxic groundnut meal. Vet. Rec., 75, 1963, s. 259–263.
- ARMBRECHT, B. H.: Aflatoxin residues in food and feed derived from plant and animal sources. Residue Rev., 41, 1972, s. 13–54.
- BARABOLAK, R. — COLBURN, Ch. R. — SMITH, R. J.: Rapid screening method for examining corn and corn-derived products for possible aflatoxin contamination. J. Ass. off. analyt. Chem., 57, 1974, s. 764–766.
- BROWN, J. M. M. — ABRAMS, L.: Biochemical studies on aflatoxicosis. Onderstepoort J. vet. Res., 32, 1965, s. 119–146.
- FLEISCHER, I.: Studie o rozsahu kontaminace podzemnicových a sojových extrahovaných šrotů aflatoxinem. Krmivářství, 7, 1971, s. 101–104.
- HOLADAY, Ch. E. — LANSDEN, J.: Rapid screening method for aflatoxin in a number of products. J. agric. Fd Chem., 23, 1975, s. 1134–1136.
- JACOBSON, W. C. — WISEMAN, H. G.: The transmission of aflatoxin B₁ into eggs. Poult. Sci., 53, 1974, s. 1743–1745.
- JACOBSON, W. C. — HARMEYER, W. C. — WISEMAN, H. G.: Determination of aflatoxins B₁ and M₁ in milk. J. Dairy Sci., 54, 1971, s. 21–24.
- KRATZER, F. H. — BANDY, D. — WILEY, M. — BOOTH, A. N.: Aflatoxin effects in poultry. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 131, 1969, s. 1281–1284.
- LÖTZSCH, R. — LEISTNER, L.: Aflatoxin — Rückstände in Hühnereiern und Eiprodukten. Fleischwirtschaft, 56, 1976, s. 1777–1785.
- PONS, W. A. — CUCULLU, A. F. — FRANZ, A. O. — LEE, L. S. — GOLDBLATT, L. A.: Rapid detection of aflatoxin contamination in agricultural products. J. Ass. off. analyt. Chem., 56, 1973, s. 803–807.
- Receptury krmných směsí pro rok 1976. Ministerstvo zemědělství a výživy ČSR. Praha 1976. 171 s.
- SIMS, W. M. Jr. — KELLEY, D. C. — SANFORD, P. E.: A study of aflatoxicosis in laying hens. Poult. Sci., 49, 1970, s. 1082–1084.
- VELASCO, J.: Determination of aflatoxin in cottonseed by ferric hydroxide gel cleanup. J. Ass. off. analyt. Chem., 53, 1970, s. 612–616.
- VELASCO, J.: Modified ferric gel method for determining aflatoxin in cottonseed meals. J. Ass. off. analyt. Chem., 55, 1972a, s. 1359–1360.
- VELASCO, J.: Detection of aflatoxin using small columns of florisil. J. Am. Oil Chem. Soc., 49, 1972b, s. 141–142.
- VELASCO, J.: Fluorometric measurement of aflatoxin adsorbed on florisil in minicolumns. J. Ass. off. analyt. Chem., 58, 1975, s. 757–763.
- WILEY, M.: Note on the analysis for aflatoxin. J. Ass. off. analyt. Chem., 49, 1966, s. 1223–1224.
- WISEMAN, H. G.: Osobní sdělení, 1968. In: SIMS, W. M. Jr. — KELLEY, D. C. — SANFORD, P. E.: A study of aflatoxicosis in laying hens. Poult. Sci., 49, 1970, s. 1082–1084.

Došlo dne 22. 7. 1977

БАРТОШ, Й. — МАТИАШ, З. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): Определение присутствия афлатоксина В₁ в яйцах. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (11): 693–699.

С помощью частично модифицированных методов Якобсона и Визмана (1974 г.), а также Холадея и Лансдена (1975 г.) исследовали 39 шт. яиц и 6 образцов кормов на присутствие афлатоксина В₁. Афлатоксин В₁ не установлен ни в яйцах, ни в нетрадиционных кормах, содержащих разный % свиного навоза.

афлатоксин; методы его определения; яйца; корма

BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z. (Veterinary Research Institute, Brno): *Determination of Aflatoxin B₁ Occurrence in Eggs*. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (11) : 693-699.

39 eggs and 6 feed samples were investigated by means of partly modified methods of Jacobson and Wiseman (1974) and Holaday and Lansden (1975), in order to determine the occurrence of aflatoxin B₁; it was stated that the aflatoxin occurred neither in eggs nor in non-traditional feeds with various content of pig excrements.

aflatoxin; determination methods; eggs; feeds

BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): *Feststellung der Anwesenheit von Aphlatoxin B₁ in Eiern*. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (11) : 693-699.

Mit teilweise modifizierten Methoden nach Jacobson und Wieseman (1974) und Holaday und Lansden (1975) wurden 39 Eier und 6 Futterproben auf Anwesenheit von Aphlatoxin B₁ untersucht. Weder in Eiern noch in untraditionellen Futtermitteln mit verschiedenem Gehalt an Schweinekott konnte Aphlatoxin B₁ festgestellt werden.

Aphlatoxin; Bestimmungsmethoden; Eier; Futtermittel

Adresa autorů:

MVDr. Jaroslav Bartoš, CSc., prof. MVDr. Zdeněk Matyáš, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

Maximálně účinná terapie žaludečních, střevních
a plicních helmintóz u skotu, ovcí a koz.

NILVERM

orální nálev

Experimentální a terénní ověření v mnoha zemích
světa včetně Československa a stejně tak i
celosvětové přijetí tohoto preparátu
veterinárními lékaři a chovateli hospodářských
zvířat ukázaly, že Nilverm je vynikajícím
anthelmintikem.

Nilverm ničí široké spektrum gastrointestinálních
nematodů a hlísty druhu *Dictyocaulus*, přičemž
jeho účinnost proti nezralým nematodům nebyla
dosud překonána. Příznivý koeficient bezpečnosti
dovoluje i náhodné předávkování a také není
třeba činit žádná speciální opatření dávkování
preparátu nebo omezovat ostatní druhy
meditace.

Další předností je, že se Nilverm aplikuje v
jednotné dávce bez ohledu na stupeň nebo druh
invaze.

NILVERM

Orální nálev obsahuje 3% tetramisol hydro-
chloridu. Nilverm je chráněná známka.
Dodává se v balení po 1 litru. V licenci vyrábí
Bioveta Ivanovice na Hané a Bioveta Nitra.



Imperial Chemical Industries Ltd.,
Pharmaceuticals Division
Alderley Park Macclesfield
Cheshire, England

гически высокоактивных органофосфорных соединений и установили, что из всех испытанных нами веществ самым сложным масс-спектром обладает 0-этил-С-(2-диметиламино-этил) эфир метилтиофосфористой кислоты. В спектре обнаружены характерные фрагменты с m/e : 42, 44, 58, 71 и 72 (отвечающие присутствию группы $(CH_3)_2NCH_2CH_2-$), далее 81, 95, 97, 105 и 125, что характерно для фосфорэфирной группы. Как показал масс-спектрометрический анализ, MS методом можно пользоваться в количественном анализе биологически высокоактивных органофосфорных соединений, каков 0-этил-С-(2-диметиламино-этил) эфир метилтиофосфористой кислоты.

пестициды; масс-спектральный анализ

BARTONÍČEK, F. — HRUŠOVSKÝ, J. — HANUŠ, L. (Military Veterinary Research Institute, Praha; Physical Institute of the Czechoslovak Academy of Sciences, Praha): *Application of Mass Spectrometry to the Chemical Analysis of Organophosphorus Compounds*. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (12) : 713-721.

The authors studied the possibility of using mass spectrometry in the chemical analysis of biologically highly active organophosphorus compounds. The results show that methylthiophosphorous acid O-ethyl-S-(2-dimethylaminoethyl) ester has the most complex mass spectrum of all the substances under study. In the spectrum characteristic fragments were detected, having m/e values of 42, 44, 58, 71 and 72 [corresponding to the presence of the $(CH_3)_2NCH_2CH_2$ -group], and 81, 95, 97, 105 and 125 which are characteristic of the phosphoester group. Mass spectrometric analysis, performed in this study, proved that the MS method is suitable for a qualitative analysis of biologically highly active organophosphorus compounds such as methylthiophosphorous acid O-ethyl-S-(2-dimethylaminoethyl) ester.

pesticides; mass spectrometric analysis

BARTONÍČEK, F. — HRUŠOVSKÝ, J. — HANUŠ, L. (Militärforschungsinstitut für Veterinärmedizin, Praha; Physikalisches Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Praha): *Anwendung der Massenspektrometrie bei der chemischen Analyse der Organophosphorverbindungen*. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (12) : 713-721.

Die Verfasser untersuchten die Möglichkeit, die Massenspektrometrie bei der chemischen Analyse der Organophosphorverbindungen mit hoher biologischer Aktivität auszunutzen. Die Ergebnisse zeigen, daß der O-Äthyl-S-(2-Dimethylaminoäthyl) Ester der methylthiophosphorigen Säure das komplizierteste Massenspektrum von allen untersuchten Stoffen aufweist. Im Spektrum wurden charakteristische Fragmente von m/e : 42, 44, 58, 71 und 72 [sie entsprechen der Anwesenheit der Gruppe $(CH_3)_2NCH_2CH_2$] festgestellt; für die Phosphorestergruppe sind 81, 95, 97, 105 und 125 charakteristisch. Die spektrometrische Massenanalyse zeigte, daß die MS-Methode bei der qualitativen Analyse der Organophosphorverbindungen mit hoher biologischer Aktivität [wie der O-Äthyl-S-(Dimethylaminoäthyl) Ester der methylthiophosphorigen Säure] anwendbar war.

Pestizide; massenspektrometrische Analyse

Adresa autorů:

Ing. František Bartoníček, doc. MVDr. Jozef Hrušovský, DrSc., Vojenský veterinární výzkumný ústav, 150 06 Praha 5 - Motol

Ing. RNDr. Ladislav Hanuš, DrSc., Fyzikální ústav ČSAV, Budějovická 1083, 140 00 Praha 4 - Krč

Maximálně účinná terapie fasciolózy a
žaludečních, střevních a plicních helmintóz u
skotu, ovcí a koz.

NILZAN

orální suspenze

Spojuje všechny přednosti dvou vynikajících
anthelmintik v jednom přípravku.

Nilzan obsahuje jednak:

* tetramisol (Nilverm), vysoce účinné léčivo
proti širokému spektru gastrointestinálních
nematodů a proti hlístům druhu Dictyocaulus.
Má také dosud nepřekonanou účinnost proti
nezralým formám nematodů.

* oxyclozanid (Zanil), bezpečné a účinné
antifasciolikum, které ničí prakticky všechny
trematody žlučových cest bez ohledu na stupeň
jejich zralosti. Oxyclozanid též do jisté míry
pusobí na tasemnice druhu Moniezia.

V jediné společné dávce jsou obsaženy
jednotlivé terapeutické dávky obou léčiv a tak je
Nilzan anthelmintikem s nejširším spektrem
účinnosti pro přežvýkavce jakéhokoli stáří.

NILZAN

Obsahuje 1,7% levamisol hydrochloridu a 3,4%
oxyclozanidu ve vodné suspenzi.

Nilzan je chráněná známka.

Výrobu tohoto přípravku zahájil n.p. Galena v
Opavě pod názvem Helmisan a dodává se v 5
litrovém balení.

Výhradní zastoupení a
obchodní a vědecké informace
zajišťuje v CSSR
ZENIT/INEXCO ARGOSY LTD.
Jirečkova 11
170 00 Praha 7



Imperial Chemical Industries Ltd.
Pharmaceuticals Division
Alderley Park Macclesfield
Cheshire, England

VÝBĚR SCREENINGOVÝCH METOD PRO ZJIŠTOVÁNÍ AFLATOXINŮ V KRMIVECH

J. Bartoš, Z. Matyáš

BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Výběr screeningových metod pro zjišťování aflatoxinů v krmivech*. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (12) : 723-728.

V práci se porovnává pět různých screeningových metod na zjišťování přítomnosti aflatoxinu B₁ z hlediska použitelnosti u deseti různých krmiv, krmných koncentrátů a kompletních krmných směsí. Pro největší počet různých krmiv se jevila nejvhodnější metoda II, tj. námi modifikovaná metoda Ponse aj. (1973). Pozitivní nálezy aflatoxinu B₁ jsme zjistili u vzorků podzemnicových výlisků a bílkovinných koncentrátů a) pro nosnice a b) pro chovná prasata. Ostatní vzorky krmiv: sója, slunečnice, kukuřice, rybí moučka, kompletní krmné směsi — krmivo pro tržního pstruha, krmivo pro kapří násadu a tržního kapra, krmivo pro výkrm kachňat — aflatoxiny neobsahovaly.

aflatoxiny; krmiva; screeningové metody

V literatuře je popsáno nepřehledné množství různých metod na zjišťování aflatoxinů v krmivech. Některé z nich se podstatně liší od metod použitých jinými autory, některé se však odlišují pouze nepatrně. Přesné metody zjišťování přítomnosti aflatoxinů jsou velmi náročné z hlediska zařízení a vybavení laboratoří, pracnosti analytických postupů a nákladné z hlediska spotřeby chemikálií. Proto se na celém světě volá po vypracování velmi rychlých screeningových metod. Dříve byla práce v metodické oblasti zaměřena na zvyšování citlivosti a přesnosti s relativně malou snahou o zkrácení doby nutné pro analýzu. Goldblatt (1972) uvedl, že teprve nedávno se rozpoznalo, že i relativně málo citlivá metoda může být velmi užitečná, když je velmi rychlá, neboť je umožněno kontrolovat velké množství vzorků. I když také v ČSSR bylo publikováno mnoho prací zabývajících se problematikou analýzy aflatoxinů v krmivech, nebyla dosud schválena pro celostátní používání žádná jednotná metoda, která by byla vhodná pro běžné screeningové vyšetřování krmiv a krmných směsí ve vyšetřovacích ústavech, popřípadě i v běžných provozech. Z toho důvodu se krmiva v ČSSR průběžně nevyšetřují. Pouze podezřelé vzorky krmiv, které jsou odebírány v případě onemocnění zvířat, eventuálně uhynů, se vyšetřují na speciálních pracovištích VŠV a ÚSVU.

Úkolem této práce bylo vybrat, popřípadě upravit vhodné screeningové metody pro zjišťování aflatoxinu v krmivech.

Po prostudování literatury zabývající se analýzou aflatoxinů jsme zvolili pro screeningové testy celkem pět analytických postupů. Vycházeli jsme z metod, které popsali Velasco (1970, 1972a, b), Cuculli aj. (1972), Shanon aj. (1973), Pons aj. (1973), Shotwell a Stubblefield (1973), Juszkiewicz a Piskorska-Pliszczynska (1973), Velasco a Whitten (1973), Barabolak aj. (1974), Holaday a Lansden (1975), Velasco (1975), Strzelecki a Gasiorowska (1975), Romer (1975).

Všechny uvedené metody jsme modifikovali tak, aby byla umožněna analýza z hlediska dostupnosti chemikálií a aby práce byla relativně jednoduchá, a tím i levná.

Čištění extraktů na minisloupcích jsme ze všech použitých metod vypustili, neboť kysličník hlinitý může obsahovat fluorescenční látky, jak jsme se sami přesvědčili na začátku pokusů a jak uvádějí Holoday a Lansden (1975). Podle těchto autorů je vhodný kysličník hlinitý od fy Merck a Woelm. Tento postup jsme opustili také proto, že při něm není možné ověřit přítomnost aflatoxinu kyselinou sírovou a proto, že v nejasných případech jsme museli stejně nanášet extrakty ještě na silufolové fólie. Místo purifikace na minisloupcích a sloupcích jsme čistili vzorky přímo na tenké vrstvě silikagelu.

MATERIÁL A METODY

Metoda I: Do skleněné baňky se dá 100 g vzorku, přidá se 200 ml roztoku metanol + voda (80 + 20) a třepe na třepačce 60 minut. Do zkumavky se přefiltruje 10 ml extraktu, přidá se 10 ml solného roztoku (600 g chloridu sodného, 600 g octanu zinečnatého a 15 ml ledové kyseliny octové, rozpuštěné ve 4000 ml destilované vody). Zkumavka se uzavře uzavěrem z umělé hmoty, obsahem se třepe silně 5 až 10 sekund. Obsah zkumavky se přefiltruje do další zkumavky. Přidají se 3 ml benzenu, zkumavka se těsně uzavře a třepe se 10 sekund. Vrstvy se nechají oddělit a horní vrstva se odpipetuje do malé lékovky.

Další postup jsme modifikovali takto: reziduum jsme rozpustili v 60 až 100 μ l chloroformu a nanášeli na neaktivovanou tenkou vrstvu silikagelu (Silufol UV 254, Sklárný Kavalier, n. p.) na dvě místa vždy poloviční množství, tj. 30 až 50 μ l (vzorek + standard). Tím bylo na plotnu naneseno veškeré množství případného aflatoxinu. Na tři starty uprostřed fólie jsme mikrodávkačem nanášeli — při současném vysušování fénem — standard, vzorek a vzorek se standardem. Vyvíjeli jsme v kvyetách při pokojové teplotě nejdříve v dietyléteru. Po odsátí asi $\frac{1}{4}$ fólie tak, aby byly odstraněny nečistoty putující s čelem soustavy a dosahující Rf větší než 0,3, jsme vyvíjeli v obráceném směru v soustavě chloroform : aceton (9 : 1). Chromatogram jsme prohlíželi pod UV lampou při 360 nm přístrojem Fluotest Universal (fy Original Hanau Quarzlampe, NSR) a srovnávali standard se zkoušeným vzorkem. Semikvantitativní stanovení je umožněno porovnáním intenzity záření pozitivního vzorku se škálou více koncentrací aflatoxinu B₁. Nálezy jsme ověřovali postřikem skvrn 20% kyselinou sírovou.

Nanese-li se na jeden bod zahuštěný extrakt původního množství 2 ml, pak při nepřítomnosti skvrny obsahuje vyšetřovaný vzorek méně než 2 μ g kg⁻¹, při nanesení na dva body (tj. 1 ml na každý bod) při nepřítomnosti skvrny obsahuje vzorek méně než 4 μ g kg⁻¹ aflatoxinu. Různým množstvím nanášeného extraktu můžeme sledovat výskyt aflatoxinu od 40 μ g kg⁻¹ až do méně než 2 μ g kg⁻¹.

Metoda II: Z pečlivě rozmělněného a promíseného reprezentativního vzorku se odváží 50 g, přidá se 150 ml směsi acetonitril : voda (8 : 2) nebo aceton : voda (85 : 15) a 10 g křemelin Hyflo Super Cel a homogenizuje se na laboratorní třepačce 60 minut. Filtruje se přes filtrační papír. Filtrát (50 ml) se přenese do 250ml kádinky, přidá se 20 ml roztoku octanu olovnatého [200 g (CH₃COO)₂Pb.3H₂O se rozpustí v destilované vodě při zahřátí na vodní lázni, přidají se 3 ml ledové kyseliny octové a doplní se na 1 litr], 130 ml destilované vody, důkladně se promíchá a nechá ustát 2 až 3 minuty. Pak se přidá 10 g křemelin Hyflo Super Cel, opět se promíchá a filtruje přes filtrační papír. Do 125ml dělicí nálevky se přenese filtrát (100 ml), přidají se 3 ml benzenu a silně se třepe 1 minutu. Po oddělení fází se spodní vodná vrstva odleje. Do dělicí nálevky se přidá 50 ml destilované vody a jemně se 10X převrátí; musí se dávat pozor, aby se nevytvořila emulze. Po oddělení fází se spodní vodná část odstraní. Benzenový extrakt se přenese do malé lékovky nebo zkumavky a odpaří se na vodní lázni do sucha, popřípadě za použití dusíku. Malé množství vody se odstraní přidáním bezvodého síranu sodného. Další postup jsme upravili stejně jako u předchozí metody.

Metoda III: Homogenizovaný vzorek v množství 50 g se vpraví do 500ml Erlenmayerovy baňky se zábrusem, přidá se 250 ml směsi aceton : voda (85 : 15). Intenzivně se třepe na třepačce po dobu 60 minut. Filtrát (90 ml) se přeneso do 400ml kádinky obsahující 100 ml vody a 10 ml 10% chloridu železitého. Po pečlivém promíchání se přidá 14 až 16 ml 4% roztoku louhu sodného, aby se dosáhlo pH 4,6. Znovu se míchá po dobu asi 1 až 2 minut. Pak se filtruje přes složený filtr do 250ml kádinky. Filtrát (180 ml) se přeneso do 500 ml dělicí nálevky a zředí se 200 ml vody. Do dělicí nálevky se přidá 50 ml chloroformu, protřepává se asi 1 minutu, nechá se oddělit, spodní chloroformová část se odpustí do 250ml kádinky (nejlépe z nerezů pro snadnější odpařování). Chloroform se odpaří na vodní lázni při teplotě 60 °C. Na zbytek v kádince naléváme třikrát 2 ml chloroformu a sléváme do 10ml lékovky nebo zkumavky. Chloroform se odpaří a zchladí. Reziduum je ekvivalentní 15 g výchozího materiálu. Další postup jsme upravili stejným způsobem jako u předchozí metody. Po znásobení dvěma (při nanášení rezidua na dva body) je možné z množství, které odpovídá 15 g krmiva, vypočítat obsah aflatoxinu B₁ v 1 kg krmiva.

Metoda IV: Postup je stejný jako u metody II, liší se v tom, že se extrahuje směsí aceton : voda (85 : 15) a k filtrátu (50 ml) se přidá 20 ml 40% vodného roztoku síranu amonného.

Metoda V: 50 g vzorku se dá do skleněné baňky, přidá se 250 ml směsi aceton : voda (85 : 15) a třepe se na třepačce 60 minut, obsah se zfiltruje do skleněného válce, 150 ml se přeneso do 400ml kádinky. Do další kádinky o obsahu 600 ml se přidá 170 ml 0,2N louhu sodného a 30 ml chloridu železitého (20 g bezvodého FeCl₃ v 300 ml H₂O) a dobře se promíchá. K filtrátu v 600ml kádince se přidá 150 ml křemelinu Hyflo Super Cel (vhodná je 150ml kádinka jako odměrka) a obsah na dobře promíchá. Filtruje se přes Büchnerovu nálevku s filtračním papírem.

Filtrát (150 ml) se přeneso do 500ml dělicí nálevky, přidá se 150 ml 0,03% kyseliny sírové a 10 ml chloroformu p. a. Silně se třepe po dobu asi dvou minut, pak se nechá oddělit. Spodní chloroformová vrstva (13 až 14 ml) se dá do 125ml dělicí nálevky. Přidá se 100 ml roztoku (1,12 g KOH a 10 g KCl v 1 litru vodv), jemně se promísí a nechá oddělit. Vznikne-li emulze, odleje se do 10ml skleněného válce, přidá se asi 1 g bezvodého síranu sodného, uzavře se zátkou, třepe se 30 sekund a nechá se oddělit. Chloroformová fáze nemusí být úplně čirá. Trvá-li emulze i nadále, přeneso se do 125ml dělicí nálevky a promyje se přidáním 50 ml 0,03% kyseliny sírové a chloroformová vrstva se sbírá do 10ml válečku. Další postup jsme upravili stejně jako u předchozích metod.

Uvedenými metodami jsme zkoušeli: šest vzorků sóji (extrahovaný šrot, mouka, odtučněná mouka), osmnáct vzorků podzemnicových výlisků, dva vzorky slunečnice (extrahované šroty), čtyři vzorky rybí moučky, dva vzorky kukuřice, dva vzorky bílkovinného koncentrátu pro nosnice, pět vzorků bílkovinného koncentrátu pro chovná prasata, krmné směsi: jeden vzorek pro výkrm kachňat, osm vzorků krmiva pro tržního pstruha, dva vzorky krmiva pro kapří násadu a tržního kapra. Celkem jsme přezkoušeli 50 vzorků různých krmiv, krmných směsí a koncentrátů. Vzorky jsme odebírali z výroben krmiv. Provozovny průmyslových výroben krmiv byla krmiva považována za nezávaďná a nebyly vůči nim námitky. V žádném případě nebyla krmiva zjevně zaplísňená. Každý z deseti druhů krmiv byl přezkoušen všemi pěti metodami. Zjišťovali jsme, které metody jsou nejvhodnější pro nejlepší oddělení nečistot od aflatoxinů na tenké vrstvě silikagelu. Dále jsme posuzovali u jednotlivých metod náklady na chemikálie, nároky na laboratorní vybavení a časovou náročnost a práci s různě toxickými chemikáliemi. Pokusy probíhaly od února do září roku 1976.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Při porovnání pěti různých metod jsme zjistili, že ani jedna z nich nemůže být označena za nejlepší pro všechna zkoušená krmiva. Toto zjištění je o to závažnější, že v této práci popisujeme výsledky pokusů pouze s deseti různými krmivy, přičemž v praxi se mohou vyskytovat aflatoxiny v nesmírně široké paletě krmiv. Dosti značné rozdíly v použitelnosti různých metod jsme pozorovali i při vyšetřování různých vzorků stejných druhů krmiv. Přesto jsme sestavili přibližné pořadí nejvhodnějších metod

pro analýzu deseti různých krmiv (tab. I). Nejvhodnější metoda pro každé krmivo je označena číslem 1, metody, při nichž bylo přítomno více nečistot na chromatogramu, byly pak hodnoceny vyššími čísly. Kritériem pro hodnocení byl výskyt nečistot, které v některých případech mohly překrývat i vnitřní standard (metoda V u krmiva pro výkrm kachňat a metoda I u krmiva pro kapří násadu a tržního kapra – tab. I). V některých případech bylo těžké určit pořadí. Platí to především o kukuřici, u které se všechny metody jeví jako dobré, naproti tomu při testování rybí moučky se všechny metody jeví jako málo uspokojivé pro značné nečistoty. Také nečistoty u krmných koncentrátů pro nosnice a chovná prasata při použití všech metod ztěžovaly přesnější zařazení do 1. až 5. skupiny. Naproti tomu při testování podzemnicových výlisků byly tři metody téměř stejně dobré: I., II. a III. Kdybychom hodnotili pořadí 1 + 2 + 3 jako vyhovující, pak by metoda II byla vhodná pro devět krmiv z deseti, metoda IV a I pro sedm krmiv z deseti. Citlivost metod se pohybuje od 4 do 10 μg aflatoxinu v 1 kg v závislosti na druhu použitého krmiva.

Metoda I je z hlediska časové náročnosti a z hlediska laboratorního vybavení i čištění skla nejjednodušší. Ze zařízení vyžaduje pouze komoru s dlouhovlnným UV světlem, třepačku, vodní lázeň, chladničku nebo mrazničku pro přechovávání standardu, tenkou vrstvu silikagelu (Silufol UV 254), tenkou kapiláru nebo mikrodávkoč pro nanášení vzorků,

I. Posouzení metod podle vhodnosti použití u jednotlivých krmiv z hlediska čistoty míst v místě aflatoxinových skvrn na chromatogramu (číslo 1 představuje nejméně nečistot; vyšší čísla znamenají více nečistot a metody se jeví tedy jako méně vhodné) – Evaluation of the methods according to the suitability for use in different feeds as to the purity of aflatoxin spots on the chromatogram (No. 1 means the least amount of impurities, higher numbers mean more impurities, implying that the methods are less suitable)

Druh krmiva	Použitá metoda				
	I	II	III	IV	V
Podzemnicové výlisky	1	2	3	4	5
Sója	1	2	5	4	3
Slunečnice	1	4	5	2	3
Kukuřice	4	3	1	2	5
Rybí moučka	3	2	4	5	1
Bilkovinný koncentrát pro nosnice	3	1	4	2	5
Bilkovinný koncentrát pro chovná prasata	1	3	4	2	5
Krmivo pro tržního pstruha	3	1	5	2	4
Krmivo pro kapří násadu a tržního kapra	5	2	4	1	3
Krmivo pro výkrm kachňat	4	2	3	1	5

zkumavky s uzavěry, filtrační papír, skleněné nálevky, pipety s balónky a skleněné kyvety na vyvíjení chromatogramu. Z chemikálií pak standard aflatoxinu, metylalkohol *p. a.*, benzen *p. a.*, chlorid sodný, octan zinečnatý, ledovou kyselinu octovou, destilovanou vodu, pro dekontaminaci ještě chlornan sodný a louh sodný. Metody I a III jsou vhodné z hlediska snadné dostupnosti chemikálií, zatímco k metodám II a IV je zapotřebí filtrační křemeliny z dovozu.

Pozitivní nálezy aflatoxinu B₁ jsme zjistili u všech vzorků podzemnicových výlisků, i když při použití metod V a IV jsme u některých vzorků podzemnicových výlisků nezachytili aflatoxin. Po zpracování těchto vzorků dalšími metodami byl však výsledek pozitivní. Toto zjištění se zdá být v souladu s nerovnoměrným rozložením aflatoxinů v krmivech. Přítomnost aflatoxinu jsme dále zjistili ve dvou vzorcích bílkovinného koncentrátu pro nosnice (metoda II a IV) a ve stopových množstvích také ve třech vzorcích bílkovinného koncentrátu pro chovná prasata (metoda I a III). Do obou těchto koncentrátů byly přidávány podzemnicové výlisky dovezené z Indie, v nichž jsme zjistili přítomnost aflatoxinu B₁. V ostatních druzích krmiv jsme aflatoxin B₁ nezjistili.

Poněvadž se v celém světě prosazuje požadavek průběžně sledovat přítomnost aflatoxinů v krmivech, budou se i analytické screeningové metody nadále vyvíjet. Požadavek na vhodnou metodu spočívá v její použitelnosti pro co největší počty různých druhů krmiv, krmných směsí a koncentrátů, v dostatečné citlivosti, jednoduchosti, rychlosti, levnosti a spolehlivosti.

Poděkování: Za poskytnutí standardu aflatoxinu B₁ děkujeme ing. D. Veselému z Ústavu experimentální medicíny ČSAV. Za technickou spolupráci děkujeme s. L. Helánovi a s. B. Seidlové.

Literatura

- BARABOLAK, R. — COLBURN, Ch. R. — SMITH, R. J.: Rapid screening method for examining corn-derived products for possible aflatoxin contamination. *J. Ass. off. analyt. Chem.*, 57, 1974, s. 764-766.
- CUCULLU, A. F. — PONDS, W. A. — GOLDBLATT, L. A.: Fast screening method for detection of aflatoxin contamination in cottonseed products. *J. Ass. off. analyt. Chem.*, 55, 1972, s. 1114-1119.
- GOLDBLATT, L. A.: Learning to live with mycotoxins: Aflatoxin — A case history. In.: Control of mycotoxins, Symposium on the control of mycotoxins. Göteborg 21.-22. August 1972, s. 223-238.
- HOLADAY, CH. E. — LANSDEN, J.: Rapid screening method for aflatoxin in a number of products. *J. agric. Fd Chem.*, 23, 1975, s. 1134-1136.
- JUSZKIEWICZ, T. — PISKORSKA-PLISZCZYNSKA, J.: Szybka metoda kolumnowa oznaczania aflatoksyny B₁. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 6, 1973, s. 419-424.
- PONDS, W. A. — CUCULLU, A. F. — FRANZ, A. O. — LEE, L. S. — GOLDBLATT, L. A.: Rapid detection of aflatoxin contamination in agricultural products. *J. Ass. off. analyt. Chem.*, 56, 1973, s. 803-807.
- ROMER, T. R.: Screening method for the detection of aflatoxins in mixed feeds and other agricultural commodities with subsequent confirmation and quantitative measurement of aflatoxins in positive samples. *J. Ass. off. analyt. Chem.*, 58, 1975, s. 500-506.
- SHANNON, G. M. — STUBBLEFIELD, R. D. — SHOTWELL, O. L.: Modified rapid screening method for aflatoxin in corn. *J. Ass. off. analyt. Chem.*, 56, 1973, s. 1024-1025.
- SHOTWELL, O. L. — STUBBLEFIELD, R. D.: Collaborative study of three screening methods for aflatoxin in corn. *J. Ass. off. analyt. Chem.*, 56, 1973, s. 808-812.
- STRZELECKI, E. L. — GASIOROWSKA, U. W.: Aflatoksyna B₁ w paszach przemyslowach. Metoda minikolumnowa. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 8, 1975, s. 67-72.

VELASCO, J.: Determination of aflatoxin in cottonseed by ferric hydroxide gel cleanup. J. Ass. off. analyt. Chem., 53, 1970, s. 612-616.
 VELASCO, J.: Modified ferric gel method for determining aflatoxin in cottonseed meals. J. Ass. off. analyt. Chem., 55, 1972a, s. 1359-1360.
 VELASCO, J.: Detection of aflatoxin using small columns of florisil. J. Am. Oil Chem. Soc., 49, 1972b, s. 141-142.
 VELASCO, J.: Fluorometric measurement of aflatoxin adsorbed on florisil in mini-columns. J. Ass. off. analyt. Chem., 58, 1975, s. 757-763.
 VELASCO, J. — WHITTEN, M. E.: Evaluation of florisil tubes in detection of aflatoxin. J. Am. Oil Chem. Soc., 50, 1973, s. 120-121.

Došlo dne 20. 9. 1977

БАРТОШ, Й. — МАТИАШ, З. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): Отбор отсеочных методов определения афлатоксинов в кормах. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (12): 723-728.

В работе сравниваются 5 скрининг-методов определения присутствия афлатоксина В₁ с точки зр. употребимости в 10 разных кормах, кормовых концентратах и полнорационных комбикормах. Для максимального числа кормов оптимальным представляется метод II, т. е. модифицированный нами метод Понса и колл. (1973 г.). Положительные диагнозы афлатоксина В₁ обнаружены в образцах арахисового жома и белковых концентратов а) для несушек и б) для племенных свиней. Афлатоксины не обнаружены в образцах сои, подсолнечника, кукурузы, рыбьей муки, в полнорационном комбикорме, корме для товарной форели, для молоди карпа и товарного карпа, в корме для откорма утят.

афлатоксины; корма; скрининг-методы

BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z. (Veterinary Research Institute, Brno): *Selection of Screening Methods for the Detection of Aflatoxins in Feeds*. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (12): 723-728.

Five different screening methods of the detection of aflatoxin B₁ are compared as to their usability in ten feeds, feed concentrates, and complete feed mixtures. Method II, i. e. the authors' modification of the method of Pons et al. (1973) was found to be the best for the highest number of different feeds. Aflatoxin B₁-positive findings were obtained in samples of groundnut cake and protein concentrates a) for laying hens and b) for breeding pigs. No aflatoxins were detected in other feed samples: soya, sunflower, maize, fish meal, complete feed mixtures — table trout feed, carp stock feed, table carp feed, duckling fattening mixture.

aflatoxins; feeds; screening methods

BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): *Auswahl von Screening-Methoden für die Ermittlung der Aflatoxine in den Futtermitteln*. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (12): 723-728.

Die Arbeit befaßt sich mit dem Vergleich von fünf unterschiedlichen Screening-Methoden zur Bestimmung des Aflatoxins B₁ vom Gesichtspunkt der Anwendbarkeit bei zehn verschiedenen Futtermitteln, Futterkonzentraten und im Alleinfuttermisch. Für die meisten Futtermittel schien die Methode II am geeignetsten, d. h. die von uns modifizierte Methode von Pons u. a. (1973) zu sein. Die positiven Befunde des Aflatoxins B₁ wurden in den Proben von Erdnußkuchen und Proteinkonzentraten a) für Legehennen und b) für Zuchtschweine festgestellt. Andere Futtermittelproben: Sojabohne, Sonnenblume, Mais, Fischmehl, Alleinfuttermisch — Futtermittel für Marktforelle, Karpfensatz und Marktkarpfen, Futtermittel für Jungentenmast — enthielten keine Aflatoxine.

Aflatoxine; Futtermittel; Screening-Methoden

Adresa autorů:

MVDr. Jaroslav Bartoš, CSc., prof. MVDr. Zdeněk Matyáš, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

SCREENING NA PŘÍTOMNOST AFLATOXINU B₁ V KRMIVECH

J. Bartoš, Z. Matyáš

BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Screening na přítomnost aflatoxinu B₁ v krmivech*. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (12) : 729-735.

Screeningovými metodami jsme na tenkých vrstvách silikagelu vyšetřili na přítomnost aflatoxinu B₁ 67 vzorků krmiv (18 druhů), 8 vzorků bílkovinných koncentrátů (3 druhy), 22 vzorky krmných směsí pro skot (11 druhů, 16 vzorků krmných směsí pro prasata (8 druhů), 10 vzorků krmných směsí pro drůbež (8 druhů), 4 vzorky krmných směsí pro ovce (2 druhy), 2 vzorky krmných směsí pro zvěř a býložravce v zoologických zahradách (2 druhy), 15 vzorků krmných směsí pro ryby (4 druhy), 2 vzorky doplňků biofaktorů (2 druhy) a 7 vzorků netradičních krmiv s různým obsahem vepřových exkrementů. Dále jsme zkoušeli pět vzorků čtyř druhů běžně užívaných potravin (polohrubá mouka, loupaná rýže, arašidy, vlašské ořechy). Všechny vzorky byly hodnoceny provozovny průmyslových výroben krmiv jako nezávadné, v žádném případě nebylo pozorováno zjevné zaplísnění nebo jiné nedostatky. Pozitivní nálezy aflatoxinu B₁ byly zjištěny ve 26 vzorcích podzemnicových výlisků dovezených z Indie, ve dvou vzorcích bílkovinného koncentrátu pro nosnice, ve čtyřech vzorcích bílkovinného koncentrátu pro chovná prasata, ve dvou vzorcích doplňkové směsi pro výkrm jehňat, v jednom vzorku masokostní moučky, v jednom vzorku doplňkové směsi pro kojící prasnice, ve dvou vzorcích doplňkové směsi pro dojnice — bílkovinné, v jednom vzorku koncentrátu pro tvarované směsi pro výkrm skotu, v jednom vzorku bílkovinného koncentrátu pro kompletní směs s tukem pro výkrm brojlerů, v jednom vzorku řepkového šrotu, v jednom vzorku kakaových slupek a v jednom vzorku doplňkové směsi pro výkrm skotu — glycidové.

aflatoxin B₁; krmiva; krmné směsi; screeningové metody

V předchozí práci (Bartoš, Matyáš, 1977) jsme popsali pět screeningových metod (I–V) na zjišťování přítomnosti aflatoxinů v krmivech při použití tenké vrstvy silikagelu. Zjistili jsme, že není možné vystačit pro všechny různorodé druhy krmiv, krmných koncentrátů a kompletních krmných směsí pouze s jednou metodou. Proto je vhodné pracovat v laboratořích s větším počtem screeningových metod.

Účelem této práce bylo přezkoušet větší počet různých druhů krmiv, krmných koncentrátů a kompletních krmných směsí na možnou přítomnost aflatoxinu B₁.

MATERIÁL A METODY

Pro vyšetřování krmiv, krmných koncentrátů a kompletních krmných směsí na možnou přítomnost aflatoxinu B₁ jsme zvolili námi modifikovanou metodu Holadaye a Lansdena (1975), protože je velmi snadná a rychlá (metoda I). Nebyla-li tato metoda vhodná pro určitý druh krmiv (nemožnost zpracování vzorků, vnitřní standard překryt nečistotami, výsledek nebyl zřetelný) a v případech, kdy jsme ověřovali výsledky, jsme použili další tři metody, které popsali Pons aj. (1973) — metodu II, Velasco (1972, 1975) — metodu III a Barabolak aj. (1974) — metodu IV. Ve výsledcích uvádíme vždy nejdříve metodu vhodnější. Tyto metody i se svými modifikacemi jsme detailně popsali v předchozí práci (Bartoš, Matyáš, 1977). Sušené odstředěné mléko pro přidání do krmiv jsme testovali metodou podle Stubblefielda aj. (1973).

Vzorky jsme odebírali přímo z výrobních závodů, mísíren a skladů krmiv. Byly to jednak vzorky z čerstvě připravených krmných směsí, jednak vzorky skladované podnikovou OTK, které nepřesáhly expirační dobu. Provozovny průmyslových výroben krmiv byla krmiva považována za nezávadná a nebyly vůči nim námitky. V žádném případě nebyla zjevně zaplísňená.

Z krmiv jsme testovali (v závorkách je uveden počet vzorků): podzemnicové výlisky z Indie (27), sóju (extrahovaný šrot, mouka, odtučněná mouka) z USA, Argentiny a Brazílie (11), rybí moučku z Dánska a z Peru (5), slunečnici (extrahované šroty) (3), lněné pokrutiny (2), řepkový šrot (3), kukuřici (2), ječmen (1), pšenici (2), pšeničné klíčky (1), pšeničné otruby (1), kakaové slupky (1), ovesnou rýži (2), krmnou mouku pšeničnou (2), sennou moučku (1), krevní šrot (1), masokostní moučku (1), sušené odstředěné mléko (1).

Z bílkovinných koncentrátů jsme testovali: bílkovinný koncentrát pro chovná prasata (5), bílkovinný koncentrát pro nosnice (2), bílkovinný koncentrát pro kompletní směs s tukem pro výkrm brojlerů (1).

Z krmných směsí pro skot jsme testovali: doplňkovou směs pro telata do tří měsíců (2), doplňkovou směs pro telata od tří do čtyř a půl měsíce (3), doplňkovou směs pro výkrm telat Baby-beef do 100 dní (1), doplňkovou směs pro výkrm telat Baby-beef od 100 do 210 dní (1), doplňkovou směs pro odchov skotu (2), doplňkovou směs pro výkrm skotu — bílkovinnou (1), doplňkovou směs pro výkrm skotu — glycidovou (4), doplňkovou směs pro dojnice — bílkovinnou (4), doplňkovou směs pro dojnice — glycidovou (2), doplňkovou směs pro vysokoprodukční dojnice (1), koncentrát pro tvarované směsi pro výkrm skotu (1).

Z krmných směsí pro prasata jsme testovali: kompletní směs pro časný odstav selat — a) prestarter (3), — b) starter (2), kompletní směs pro výkrm prasat do 50 kg živé hmotnosti (2), kompletní sójo-obilní směs s lyzinem pro výkrm prasat od 50 kg ž. h. (3), doplňkovou směs pro březí prasnice (2), doplňkovou směs pro kojící prasnice (2), kompletní směs pro plemenné kance (1), kompletní směs pro odchov prasniček od 30 do 60 kg ž. h. (1).

Z krmných směsí pro drůbež jsme testovali: kompletní směs pro nosnice (1), kompletní směs pro plemenné nosnice (1), kompletní směs pro odchov kuřat (1), kompletní směs pro kuřice nosných plemen (2), kompletní směs pro předvýkrm kachňat (1), kompletní směs pro výkrm kachňat (1), kompletní směs pro předvýkrm housat (1).

Z krmných směsí pro ovce jsme testovali: kompletní směs pro časný odstav jehňat — prestarter (2), doplňkovou směs pro výkrm jehňat (2).

Z krmných směsí pro lesní zvěř a býložravce v zoologických zahradách jsme testovali: krmivo pro lesní spárkatou zvěř (1), krmivo pro býložravce v zoologických zahradách (1).

Z krmných směsí pro ryby jsme testovali: krmivo pro tržního pstruha (11), krmivo pro kapří plůdek (1), krmivo pro kapří násadu a tržního kapra (2), Clark — dovoz z Dánska (1).

Z doplňků biofaktorů jsme testovali: doplněk biofaktorů pro telata — Galacid (1), doplněk biofaktorů pro tržního pstruha (1).

Z netradičních krmiv jsme testovali sedm vzorků s různým obsahem vepřových exkrementů.

Z potravin jsme testovali: polohrubou mouku (2), loupanou rýži (1), arašidy (1), vlašské ořechy (1).

Celkem bylo vyšetřeno 158 různých vzorků a uděláno úhrnem 250 testů, z toho námi modifikovanými metodami Holadaye a Lansdena (1975) 123 testy, Ponse aj. (1973) 52 testy, Velasca (1972, 1975) 48 testů a Barabolaka aj. (1974) 27 testů. Pokusy probíhaly od února do prosince 1976.

VÝSLEDKY

V pokusech jsme zjistili, že metoda I byla vhodná pro mnohá krmiva, krmné koncentráty, kompletní krmné směsi, doplňky biofaktorů a ne-tradiční krmiva, neboť přidávaný vnitřní standard byl na tenké vrstvě silikagelu dobře patrný, mnohdy i za přítomnosti značného množství nečistot na tenké vrstvě, které se však lokalizovaly v jiné oblasti než aflatoxin B₁. U některých krmiv a krmných směsí bylo nutné zdvojnásobit množství extrakční směsi, jako např. u ječmene, pšenice, pšeničných klíčků, krmiva pro kapři plůdek, doplňkové směsi pro vysokoprodukční dojnice aj.

U některých druhů krmiv se vyskytovaly vzorky, které při uvedené metodě obsahovaly nečistoty zhoršující možnosti stanovení aflatoxinů. Platí to především o některých vzorcích různé provenience, ale také o různých výrobních šaržích stejného výrobního podniku. Do této skupiny patřila např. sója z Argentiny, rybí moučka z Peru, bílkovinný koncentrát pro chovná prasata, krmivo pro kapři násadu a tržního kapra a kompletní směs pro výkrm prasat do 50 kg ž. h. Pro všechna tato krmiva se jevila jako dobrá metoda II. Pro bílkovinný koncentrát pro chovná prasata a pro krmivo pro kapři násadu a tržního kapra byla vhodná metoda IV a pro poslední uvedené krmivo také metoda III.

U některých krmiv, u nichž nebylo možné použít metodu I, byly slibné další metody: pro ovesnou rýži metoda II, pro krmnou mouku pšeničnou metoda II (bylo zapotřebí dvojnásobného množství extrakční směsi) a metoda III, pro krmivo pro býložravce v zoologických zahradách metoda II, pro polohrubou mouku metody II, III a IV, pro vlašské ořechy a arašidy byla výhodnější metoda II, neboť umožňovala lepší extrakci. Při extrakci vlašských ořechů metodou I se tvoří velké shluky.

U některých krmiv se hodně nečistot vyskytovalo na tenké vrstvě silikagelu; přibližovaly se aflatoxinovým skvrnám, v některých případech se rozprostíraly až přes vnitřní standard a činily tudíž použité metody nevhodnými. Do této skupiny patří např. senná moučka, řepka a řepkový šrot, kompletní směs pro odchov prasniček od 30 do 60 kg ž. h. (nejpříjemnější byly metody II a IV). U kompletní směsi bylo místo výskytu aflatoxinu překrýváno červeně svítícími nečistotami.

Z tohoto přehledu je patrné, že jsme u převážné většiny různých druhů zkoušených krmiv vystačili s metodou I a II. Ve svých pokusech jsme použili krmiva z běžných provozů bez jakýchkoliv známek závadnosti. Je však nutné počítat s tím, že při analýze zaplísňených vzorků nemusí být uvedené analytické metody vhodné, poněvadž se nemusí podařit odstranit i další nečistoty, které vznikají jako metabolity různých druhů plísní. V těchto případech je možné použít metodu, kterou popsali Piskač aj. (1975), která je však podstatně časově náročnější:

extrakce po dobu 24 hodin a purifikace pomocí sloupcové chromatografie.

Z celkového počtu 27 vzorků podzemnicových výlisků jsme zjistili výskyt aflatoxinu B₁ ve 26 případech. V jedenácti vzorcích byl zjištěn aflatoxin do koncentrace 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, v devíti vzorcích se obsah aflatoxinu pohyboval od 10 do 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, dva vzorky byly zařazeny do rozsahu koncentrací 50 až 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a ve třech vzorcích jsme zjistili koncentraci vyšší než 100 μg aflatoxinu v 1 kg. Vzorky jsme testovali čtyřmi metodami: I, II, III a IV. Nejvyšší koncentrace aflatoxinu jsme zjistili při použití metody II a III.

Oba dva vzorky bílkovinného koncentrátu pro nosnice byly pozitivní, zjistili jsme koncentrace 4 a 8 μg aflatoxinu v 1 kg. Pozitivní nálezy byly zjištěny metodou II a IV.

V bílkovinném koncentrátu pro chovná prasata se vyskytl aflatoxin u čtyř vzorků z pěti. Jeden vzorek obsahoval 7,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, u dalších byly koncentrace nižší než 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Pozitivní vzorky byly vyšetřeny metodou I a III.

Oba dva vzorky doplňkové směsi pro výkrm jehňat obsahovaly 1,6 μg aflatoxinu v 1 kg. Tato koncentrace byla zjištěna při použití metody III. Nižší hodnoty jsme stanovili při použití metody II a ještě nižší při použití metody I. Další krmiva obsahovala méně než 1 μg aflatoxinu v 1 kg (v závorkách uvádíme počty vzorků): masokostní moučka (jeden vzorek z jednoho zkoumaného), doplňková směs pro kojící prasnice (jeden vzorek ze dvou), doplňková směs pro dojnice bílkovinná (dva vzorky ze čtyř), koncentrát pro tvarované směsi pro výkrm skotu (jeden vzorek z jednoho), bílkovinný koncentrát pro kompletní směs s tukem pro výkrm brojlerů (jeden vzorek z jednoho), řepkový šrot (jeden vzorek ze tří), kakaové slupky (jeden vzorek z jednoho), doplňková směs pro výkrm skotu – glycidová (jeden vzorek ze čtyř). Pozitivní nálezy u uvedených vzorků byly zjištěny metodou I. Pozitivní nález ve vzorku řepkového šrotu byl stanoven metodou III. V dalších druzích krmiv, bílkovinných koncentrátech, krmných směsích a v doplňcích biofaktorů, netradičních krmivech, potravinářských výrobcích jsme nezjistili na tenké vrstvě silikagelu přítomnost skvrn, které by barvou a polohou mohly odpovídat skvrnám aflatoxinu B₁.

DISKUSE

Nálezy 4 a 8 μg aflatoxinu v 1 kg bílkovinného koncentrátu pro nosnice odpovídají přibližně našim nálezům 10, 21 a 24 μg aflatoxinu v 1 kg podzemnicových šrotů, které se přidávaly k bílkovinnému koncentrátu pro nosnice v množství 29 %. Podobně nálezy aflatoxinu v bílkovinném koncentrátu pro chovná prasata, které byly nižší než 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$, odpovídají přibližně našim nálezům 5 μg aflatoxinu B₁ v 1 kg podzemnicových šrotů, které se přidávaly k bílkovinnému koncentrátu pro chovná prasata v množství 23 %.

Použije-li se vzorků podzemnice, u nichž jsme zjistili nejvyšší obsah aflatoxinu B₁, tj. 106 $\mu\text{g kg}^{-1}$, dosáhne se v bílkovinném koncentrátu pro nosnice s obsahem 29 % podzemnicového šrotu koncentrace 30 μg aflatoxinu B₁ v 1 kg krmiva. Kompletní směs pro nosnice v intenzívních

chovech (s 20 % bílkovinného koncentráту) by pak obsahovala 6 μg aflatoxinu B_1 v 1 kg.

Po přidání stejného vzorku podzemnice do bílkovinného koncentrátu pro chovná prasata (obsahoval 23 % podzemnicového šrotu) se dosáhne koncentrace 24 μg aflatoxinu B_1 v 1 kg. Tohoto koncentrátu se přidává do doplňkové směsi pro březí prasnice 7 % a do doplňkové směsi pro kojící prasnice 13 %. V prvním případě se zředí aflatoxin na 1,7 μg v 1 kg, v druhém případě by směs obsahovala 3,2 μg aflatoxinu v 1 kg.

Podle receptur krmných směsí na r. 1976 může doplňková směs pro březí prasnice obsahovat až 11 % a doplňková směs pro kojící prasnice až 17 % bílkovinného koncentrátu pro chovná prasata. V tomto případě by se obsah aflatoxinu zvýšil na 2,7 a 4,1 μg kg^{-1} .

Jestliže by se přidaly podzemnicové šrotky s obsahem 100 μg aflatoxinu B_1 v 1 kg, obsahovaly by některé kompletní směsi v 1 kg tato množství aflatoxinu B_1 :

kompletní směs pro časný odstav jehňat – prestarter 13 μg ,

kompletní směs pro časný odstav jehňat – starter 10 μg ,

doplňková směs pro telata 8 μg ,

krmivo pro kapři násadu a tržního kapra 8 μg ,

krmivo pro býložravce v zoologických zahradách 7 μg ,

kompletní směs pro králíky 5 μg ,

kompletní směs pro odchov prasniček od 60 do 120 kg ž. h. 4 μg .

Aflatoxiny se mohou dostat s podzemnicí i do dalších kompletních krmných směsí, neboť v jejich recepturách jsou uvedeny extrahované pokrutinové šrotky bez přesnějšího vymezení a jejich obsah se pohybuje od 11 do 32 %.

Při analýze arašídů (druhá jakost) a loupané rýže jsme mohli pozorovat vnitřní i vnější standard aflatoxinu již po vyvíjení v dietyléteru – nečistoty nebyly přítomny. Po odstřižení chromatogramu a vyvíjení v obráceném směru ve směsi chloroform – aceton (9:1) jsme u extraktů z arašídů pozorovali lokalizaci vnitřního standardu asi o 40 % níže než samotného standardu jak při použití metody I, tak i metody II. Tyto výsledky ukazují na nutnost používat při chromatografické metodě vždy vedle vnějších i vnitřní standardy.

Na základě našich výsledků by bylo velmi žádoucí zjišťovat screeningovými metodami přítomnost aflatoxinu B_1 v zásilkách podzemnicových výlisků, dovážených z Indie. Metoda podle Holadaye a Lansdena (1975) v naší modifikaci je velmi jednoduchá a snadná. Při zjištění vyššího obsahu aflatoxinu v podzemnicových pokrutinách by se pak mohlo učinit preventivní opatření, které by spočívalo v rozhodnutí, do kterých krmných směsí a v jakém množství by se mohla podzemnice přidávat, aby se snížilo nebezpečí vyplývající pro zdraví zvířat, ale především pro zdraví lidí. Podzemnice s vyšším obsahem aflatoxinů by neměla být v žádném případě přidávána do směsí pro dojnice, mláďata a do směsí určených pro zvířata před porážkou. Tato krmiva by měla být správně bez aflatoxinu.

Poděkování: Za poskytnutí standardu aflatoxinu B_1 děkujeme ing. D. Veselému z Ústavu experimentální medicíny ČSAV. Za technickou spolupráci děkujeme s. L. Helánovi a B. Seidlové.

Literatura

- BARABOLAK, R. — COLBURN, CH. R. — SMITH, R. J.: Rapid screening method for examining corn and corn-derived products for possible aflatoxin contamination. *J. Ass. off. analyt. Chem.*, 57, 1974, s. 764-766.
- BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z.: Výběr screeningových metod pro zjišťování aflatoxinů v krmivech. *Vet. Med.*, Praha, 22, 1977, č. 12, s. 723-728.
- HOLADAY, CH. E. — LANSDEN, J.: Rapid screening method for aflatoxin in a number of products. *J. agric. Fd Chem.*, 23, 1975, s. 1134-1136.
- 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. [Výzkumná zpráva.] Brno, Vysoká škola veterinární 1975.
- PONS, W. A. — CUCULLU, A. F. — FRANZ, A. O. — LEE, L. S. — GOLDBLATT, L. A.: Rapid detection of aflatoxin contamination in agricultural products. *J. Ass. off. analyt. Chem.*, 56, 1973, s. 803-807.
- Receptury krmných směsí pro rok 1976. Ministerstvo zemědělství a výživy ČSR. Praha 1976, 171 s.
- STUBBLEFIELD, R. D. — SHANNON, G. M. — SHOTWELL, O. L.: Aflatoxin M₁ in milk: Evaluation of methods. *J. Ass. off. analyt. Chem.*, 56, 1973, s. 1106-1110.
- VELASCO, J.: Modified ferric gel method for determining aflatoxin in cottonseed meals. *J. Ass. off. analyt. Chem.*, 55, 1972, s. 1359-1360.
- VELASCO, J.: Fluorometric measurement of aflatoxin adsorbed on florisol in minicolumns. *J. Ass. off. analyt. Chem.*, 58, 1975, s. 757-763.

Došlo dne 20. 9. 1977

БАРТОШ, Й. — МАТИАШ, З. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): Отсев на присутствие афлатоксина В₁ в кормах. *Vet. Med.*, Praha, 22, 1977 (12): 729-735.

С помощью скрининг-методов на тонких слоях силикагеля испытывали на присутствие афлатоксина В₁ 67 образцов кормов (18 видов), 8 образцов белковых концентратов (3 вида), 22 образца комбикорма для кр. р. скота (11 видов), 16 образцов комбикормов для свиней (8 видов), 10 образцов комбикормов для птицы (8 видов), 4 образца комбикормов для овец (2 вида), 2 образца комбикормов для дичи и травоядных в зоопарках (2 вида), 15 образцов комбикормов для рыбы (4 вида), 2 образца добавки биофакторов (2 вида) и 7 образцов нетрадиционных кормов с разным содержанием свиного навоза. Кроме того, испытано 5 образцов 4 видов текущего продовольствия (полугрубая мука, очищенный рис, арахис, волошские орехи). Все эти образцы признаны цехами производственных объектов безопасными для здоровья, ни в одном из случаев не отмечено внешней плесени или других недостатков. Положительные диагнозы афлатоксина В₁ обнаружены в 26 образцах арахисового жома из Индии, в 2 образцах белкового концентрата для несушек, в 4 таких же образцах для племенных свиней, в 2 образцах добавок для откорма ягнят, в 1 образце мясокостной муки, в 1 образце добавки для подсосных свиноматок, в 2 образцах добавки для коров (белковых), в 1 образце концентрата для фасонного комбикорма для откормочного кр. р. скота, в 1 образце белк. концентрата для полносоставного комбикорма для откорма бройлеров, в 1 образце рапсовых жмыхов, в 1 образце какаовой лузги и в 1 образце добавочной смеси для откормочного кр. р. скота (глицидной).

афлатоксин В₁; корма; комбикорма; скрининг-методы

BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z. (Veterinary Research Institute, Brno): *Screening for the Presence of Aflatoxin B₁ in Feeds*. *Vet. Med.*, Praha 22, 1977 (12): 729-735.

Screening methods on thin silica gel layers were employed in the examination of feeds for the presence of aflatoxin B₁. The set of specimens subject to examination comprised 67 samples of feeds (18 kinds), 8 samples of protein concentrates (3 kinds), 22 samples of cattle feed mixtures (11 kinds), 16 samples of pig feed mixtures (8 kinds), 10 samples of poultry feed mixtures (8 kinds), 4 samples of sheep feed mixtures (2 kinds), 2 samples of feed mixtures for game and herbivorous animals in zoological gardens (2 kinds), 15 samples of fish feed mixtures (4 kinds), 2 samples

of biofactor supplements (2 kinds), and 7 samples of non-traditional feeds with different contents of pig excrements. Further, four kinds of currently used food-stuffs (5 samples) were tested (semi-fine flour, hulled rice, groundnuts, walnuts). The industrial food plants characterized all these samples as safe, no visible fungus infestation or other defects were observed in any case. Aflatoxin B₁ was detected in 26 samples of groundnut cake imported from India, in two samples of the laying hen protein concentrate, in four samples of breeding pig protein concentrate, in two samples of supplement feed mixture for lamb fattening, in one sample of meat-bone meal, in one sample of supplement feed mixture for lactating sows, in two samples of protein supplement feed mixture for dairy cows, in one sample of concentrate for cattle fattening shaped mixture, in one sample of protein concentrate for complete mixture with fat for broiler fattening, in one sample of rape groats, in one sample of cocoa shells, and in one sample of glycide supplement feed mixture for cattle fattening.

aflatoxin B₁; feeds; feed mixtures; screening methods

BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): *Screening zur Bestimmung des Aflatoxins B₁ in den Futtermitteln*. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (12): 729-735.

Mit Hilfe von Screening-Methoden untersuchten die Verfasser auf den Dünnschichten des Silikagels folgende Futtermittelproben zur Bestimmung des Aflatoxins B₁: 67 Futtermittelproben (18 Arten), 8 Proben von Eiweißkonzentraten (3 Arten), 22 Proben von Mischfuttermitteln für Rind (11 Arten), 16 Proben von Mischfuttermitteln für Schweine (8 Arten), 10 Proben von Mischfuttermitteln für Geflügel (8 Arten), 4 Proben von Mischfuttermitteln für Schafe (2 Arten), 2 Proben von Mischfuttermitteln für Wild und Pflanzenfresser in Tiergärten (2 Arten), 15 Proben von Mischfuttermitteln für Fische (4 Arten), 2 Proben von Biofaktorenergänzungen (2 Arten) und 7 Proben von nicht traditionellen Futtermitteln mit unterschiedlichem Gehalt an Schweineexkrementen. Weiter wurden fünf Proben von vier Arten der gebräuchlichen Lebensmittel (halbgrobes Mehl, geschälter Reis, Erdnüsse, Walnüsse) untersucht. Die industriellen Erzeugungsstellen der Futtermittel bewerteten alle angeführten Proben als einwandfrei; offenbare Verschimmelung oder andere Mängel wurden keinesfalls beobachtet. Positive Befunde des Aflatoxins B₁ wurden festgestellt: in 26 Proben der aus Indien importierten Erdnußkuchen, in 2 Proben des Eiweißkonzentrates für Legehennen, in 4 Proben des Eiweißkonzentrates für Zuchtschweine, in 2 Proben der Ergänzungsmischfuttermittel für Lämmernast, in einer Probe des Fleischknochenmehls, in einer Probe des Ergänzungsmischfutters für säugende Sauen, in 2 Proben des eiweißhaltigen Ergänzungsmischfutters für Milchkühe, in einer Probe des gepreßten Mischfutters für Rindernast, in einer Probe des Eiweißkonzentrates für Alleinfutter mit Fett für Broilernast, in einer Probe des Rapsschrots, in einer Probe der Kakaoschalen und in einer Probe des Glyzidergänzungsmischfutters für Rindernast.

Aflatoxin B₁; Futtermittel; Mischfutter; Screening-Methoden

Adresa autorů:

MVDr. Jaroslav Bartoš, CSc., prof. MVDr. Zdeněk Matyáš, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

Výběr z přírůstků
Ústřední zemědělské a lesnické knihovny ÚVTIZ
z úseku veterinární medicína

Uvedené publikace je možné si vypůjčit 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.

D 55.950/23

Bjulleten Vsesojuznogo ordena Lenina instituta eksperimentalnoj veterinarii. Vyp. 23. Problemy infekcionnoj patologii svinej. Moskva, VASCHNIL 1975. 68 s. tab. (Prasnice — nemoci nakažlivé — sborník — SSSR)

D 66.514/1975

Infekcionnyje bolezni ovec. Materialy naučnoj konferencii. Frunze, Ilim 1976. 219 s. (Ovce — nemoci nakažlivé — sborník — SSSR — Kirg. SSR)

BÜNING, U.

E 38.066/98 int.

Auswertung der im Tiergesundheitsamt der Landwirtschaftskammer Hannover bei Schafen diagnostizierten Listeriosefälle. Inaug.-Diss. d. Tierärztl. Hochschule Hannover. Hannover, Tierärztl. Hochschule 1975. 59 s. obr. tab. (Listeriózy — ovce — diagnóza — výzkum — NSR — disertační práce)

WEIS, J.

D 60.119/105

Listerienfunde bei heimischen Wildtieren.

Berlin, P. Parey 1974. S. 241-244. 4 tab. Sep. „Fortschritte d. Veterinärmedizin, Hf. 20: 10. Kongressbericht 1974. (Zvířata divoká — játra a střeva — bakteriologický výzkum — NSR)

E 32.262/948

JEMELJANOV, B. M. — USAČEVA, I. G. — SADIKOV, V. E.

Profilaktika vtoričnogo salmonelleza u svinej.

Moskva, VNIITEISCH 1976. 42 s. Obzornaja informacija 948. (Prase — nemoci bakteriální — salmonelózy — ochrana a léčení — studijní zpráva — SSSR)

HANSCHKE, J.

E 32.333/898

Epizootologie der Salmonelleninfektion bei Legehennen unter besonderer Berücksichtigung der Kontamination von Eiern. Inaug.-Diss. d. Freien Universität Berlin.

Berlin, Fachber. Veterinärmedizin der Freien Univ. 1976. 101 s. obr. tab. (Slepice — nosnice — vejce — nemoci bakteriální — Salmonelózy — vejce — kontaminace — výzkum — disertační práce)

D 60.275/1975/7

Salmonella.

Jänköping, SLI 1975. 7 s. obr. Statens lantbruksinformation 1975/7. (Salmonelózy — hospodářská zvířata — ochrana)

E 38.324

Prenatalni bolesti po selskostopanskite životni.

Sofija, Zemizdat 1976. 221 s. 83 obr. 7 tab. (Zmetání nakažlivé — hospodářská zvířata — příručka)

VETERINÁRNĚ HYGIENICKÉ HODNOCENÍ RŮZNÝCH ZPŮSOBŮ ZPRACOVÁNÍ TEKUTÉHO HNOJE

J. Hojovec

HOJOVEC, J. (Vysoká škola veterinární, Brno): *Veterinárně hygienické hodnocení různých způsobů zpracování tekutého hnoje*. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (12) : 737-745.

Tekutý hnůj představuje vedlejší produkt živočišné výroby, který je využíván převážně jako hnojivo bez předchozího zpracování. Poměrně dlouhá tenacita významných patogenů v tekutém hnoji však poukazuje na značné epizootologické riziko tohoto způsobu využití vedle problémů souvisejících s ochranou životního prostředí. Pro velké koncentrace zvířat, popř. ve zvláště exponovaných lokalitách je nutné počítat s různými způsoby jeho zpracování. Proto jsme sledovali dvě čistírny odpadních vod na principu aerobního a anaerobního čištění a laboratorní zařízení na tekuté kompostování (tj. aerobní stabilizace v termofilní oblasti). Po dobu čistících procesů jsme odebírali vzorky k mikrobiologickému vyšetření, při němž jsme běžnou metodikou sledovali celkový počet mikrobů (psychrofilních a mezofilních) a počet mikrobů koliformních. Z výsledků je patrné, že při aerobním čistícím procesu se výrazně neovlivní celkový počet mikrobů a počet koliformních mikrobů se sníží z 10^6 na 10^5 . Při anaerobním způsobu čištění se výrazněji snižuje jak celkový počet mikrobů, tak zejména počet mikrobů koliformních, a to z 10^6 na 10^5 . Výsledky šetření vzorků u tekutého kompostování jsou ovlivněny dosaženou teplotou. Celkový počet mikrobů poklesne z 10^{11} na 10^5 , koliformní mikrobi nebyli prokázáni již za 24 hodiny čistícího procesu. U sledovaných systémů nelze předpokládat de-vitalizaci patogenů ani u aerobního ani u anaerobního procesu. Jako nadějně se jeví tekuté kompostování, které je nutné ověřit v provozních podmínkách. aerobní stabilizace; anaerobní stabilizace; tekuté kompostování

Na rozdíl od slámnatého hnoje má tekutý hnůj odlišné fyzikální, chemické, ale i mikrobiologické vlastnosti. Problematika s jeho využíváním je o to závažnější, že v důsledku velkých koncentrací zvířat v jednotlivých závodech se soustřeďuje i produkce velkého množství tekutého hnoje na jednu lokalitu.

Tekutý hnůj, včetně hnoje prasat, však není možné posuzovat pouze jako odpad určený k likvidaci. Podle Škardy (1973a, b, 1974) je tekutý hnůj prasat jedním z nejlepších dodavatelů živin, vyprodukovaných v zemědělství. Tento autor zjistil následující hodnoty průměrného obsahu organických látek a živin v tekutém hnoji prasat v procentech:

složení	průměrný obsah	složení	průměrný obsah
sušina	8,30	K ₂ O	0,23
organické látky	6,70	MgO	0,08
C	2,90	CaO	0,26
N (NH ₃)	0,36	Na ₂ O	0,06
P ₂ O ₅	0,33	S	0,07

stopy: Ca, Zn, B, Mn, CO

Z toho vyplývá, že jedna dobytčí jednotka vyprodukuje v tekutém hnoji 130 kg dusíku, 74 kg kyslíčnicku fosforečného, 22 kg kyslíčnicku hořečnatého, 48 kg kyslíčnicku draselného a 1,5 t organických látek.

Je tedy zřejmé, že tekutý hnůj prasat je vynikajícím hnojivem a je proto vhodné využívat jej jako hnojivo v nezpracované formě.

Přesto však přináší s sebou tento způsob využití četné problémy jak v oblasti agrotechniky, tak i z hledisek ochrany životního prostředí a konečně i z aspektů veterinárně hygienických.

Z obecně hygienických hledisek jde především o přímá rizika jak pro vodní toky, tak i pro vody podzemní. Zvláštní problematiku představují epizootologická rizika. Pro jejich posouzení je nutné se zabývat především tenacitou hygienicky významných mikrobů, které se v tekutém hnoji mohou vyskytovat. Pozornost je soustředěna především na salmonely. Tímto problémem se zabývali Hahn (1967), Strauch a Müller (1968), Blum (1968), Strauch a Hahn (1968), Motz (1971), Best aj. (1971), Usačeva a Poljakov (1972), Grišajev (1973). Z jejich prací jednoznačně vyplývá, že přežívání salmonel v tekutém hnoji je dlouhodobé a uplatňují se při něm různé vlivy, především teplota. V tekutém hnoji skotu přežívají některé druhy salmonel až 180 dní, a to zejména v zimním období, kdy teplota tekutého hnoje nepřesahuje 10 °C. Při letních teplotách (okolo 20 °C) se zkracuje přežívání na 18 až 32 dny. Stejně tak v tekutém hnoji prasat je přežívání kratší.

Velmi důležitý je poznatek, že bez ohledu na teplotu a ostatní vlivy se prodlužuje tenacita salmonel se zvyšujícím se přidavkem vody v tekutém hnoji. Při ředění 1:10 se prodlužuje trojnásobně.

Poljakov a Andrjunin (1974) informují o tenacitě viru slintavky. Při letních teplotách se virus inaktivuje za 25 až 32 dny. V zimním období, kdy v podmínkách SSSR zamrzá i tekutý hnůj, se podařilo vyvolat onemocnění ještě po 180 až 200 dnech skladování.

Bakterie *Br. abortus* přežívají podle Motze a Aa (1970) v zimě maximálně 72 dny, v létě 35 dní.

Titíž autoři udávají velmi nízkou tenacitu leptospir. *Leptospira* (L) *pomona* nebyla prokázána již po dvoudenní pasáži v zimním období.

Z uvedených údajů je patrné, že hnojení nezpracovaným tekutým hnojem přináší s sebou rizika z hlediska veterinárně hygienického i provozního. Při budování závodů s velkými koncentracemi zvířat, u prasat konkrétně nad 5000 až 10 000 kusů, a také v některých oblastech s vysokou hustotou osídlení, nebo vyžadujících zvláštní ochranu, bude nutno tekutý hnůj zpracovávat tak, aby finální produkt byl využit jako hnojivo, popřípadě krmivo, a voda aby byla vyčištěna na takový stupeň, aby se mohla vypustit do recipientu.

Cistící systémy, které jsme v této práci sledovali, představují původní řešení a z hlediska hygieny dosud nebyly hodnoceny. V dostupné literatuře jsou uvedeny pouze obecné údaje o jednom z námi sledovaných způsobů, a to o tekutém kompostování. V podrobném prospektu firmy Alfa-Laval (systém Licom) se uvádí, že v průběhu procesu produkují určité skupiny mikroorganismů při teplotách 42 °C enzymy a antibiotika, které mají dezinfekční účinek. Podstatu tohoto jevu doposud neznáme.

O tomtéž systému v laboratorních podmínkách referuje Hotař (1974), který udává počet psychrofilních zárodků v nezpracovaném hnoji $1,1 \times 10^7$, v konečném produktu $2,2 \times 10^5$, v mezofilních 9×10^6 , resp. $9,2 \times 10^4$ a koliformních $1,2 \times 10^6$, v kompostu pak 0. Šlo pouze o jednorázové vyšetření.

Grišajev (1973) popisuje několik způsobů zpracování, které jsou využívány v SSSR. Po sedimentaci se snížil celkový počet mikrobů o 1 řád, titr střevních ty-

činek se snížil o 1 až 2 řády. Po separaci odstředivkou ve fugátu se snížil celkový počet mikrobů, ale titer střevních tyčinek se zvýšil o 2 řády.

V jiném závodě, kde po separaci byl fugát dále biologicky čištěn, se snížil celkový počet mikroorganismů i koliformních závodů o 2 řády. Výsledky tedy není možné považovat za uspokojivé — zejména bohaté osazení koliformními zárodky potvrzuje značné hygienické riziko, a proto je vypuštění takto vyčištěných vod do recipientů zakázáno.

MATERIÁL A METODA

Ve své práci jsme sledovali tato zařízení na zpracování tekutého hnoje:

1. Čistírna odpadních vod V. Č. při výkrmně pro 7200 prasat, na principu mechanického, chemického a biologického (aerobního) čištění spojeného s hydromechanickým odklizením (splavováním) výkalů z podroštových kanálů. Surový tekutý hnůj je nejprve předčištěn na spádových sítích, pak chemicky ošetřen hydroxidem vápenatým. Tím dochází ke koagulaci a dalšímu odsazení kalu. Kapalná frakce se přivádí do reaktoru, kde se biologicky odbourávají organické látky aerobními pochody, které zajišťuje přívod vzduchu dmychadly. Toto zařízení bylo ve zkušebním provozu.

Řešení tohoto systému bylo předmětem resortního výzkumného úkolu VŽKG Ostrava.

2. Čistírna odpadních vod T. je vybudována společně pro velkovýkrmnu s kapacitou 25 000 prasat a pro přilehlé město.

Zařízení se skládá z čistírny městských odpadních vod na principu aerobní stabilizace s aktivovaným kalem. Konečným produktem je vyčištěná voda, která se vypouští do recipientu. Primární a přebytečný kal se přečerpává do čistírny tekutého hnoje, kam se přivádí výkaly z výkrmny. Čištění je mechanicko-biologické s anaerobním vyhníváním kalu ve dvou vyhnívacích nádržích o obsahu 3,0 a 3,5 tis. m³ při teplotě 34 °C. Zpracovaný kal (až 100 m³ denně) se odvodní na odstředivce a může se využít pro přípravu kompostu. Konají se pokusy využívat odvodněný kal po dalším zpracování ke krmeným účelům.

Kalovou vodu je možné využít k závlahám, a proto je akumulována v nádrži o obsahu 13 000 m³, nebo ji dočišťovat na čističce městských odpadních vod a vypouštět do recipientu.

Ve vyhnívacích nádržích vzniká denně 4,0 až 4,5 tis. m³ plynu o hodnotě 2512 MJ m³ (6000 kcal m⁻³).

Zařízení bylo vyvinuto v rámci výzkumného úkolu C-11-329-003 Hydropojektem Praha.

3. Vzorky z tekutého kompostování byly získávány z laboratorního zařízení, které bylo sestaveno v Hydprojektu Brno. Ve víku Dewarovy nádoby o obsahu 10 l byla umístěna kovová trubka, kterou procházela hnací osa míchací vrtulky, poháněné elektromotorem. Trubkou byl nasáván vzduch, který při intenzivním promíchávání umožňuje vysokou utilizaci kyslíku aerobními zárodky.

Během procesu byla měřena teplota, která indikuje začátek a konec kompostování. Vzorky byly odebírány každých 24 hod.

Princip aerobní stabilizace v termofilní oblasti popisuje Hotař (1974) a prospect firmy Alfa Laval.

Vzorky byly vyšetřovány běžnou metodikou. Podle předpokládaného množství mikroorganismů se kultivovalo pět vhodných ředění, a to vždy souběžně na dvou Petriho miskách z každého ředění. Kolonie byly po příslušné inkubaci počítány z vhodného ředění na obou miskách a z průměru byly propočítány na počty v 1 ml neředěného materiálu.

Kultivováno bylo na 2% agar ke zjišťování celkového počtu zárodků (psychro- a mezofilních) a na Endův agar ke zjišťování zárodků koliformních.

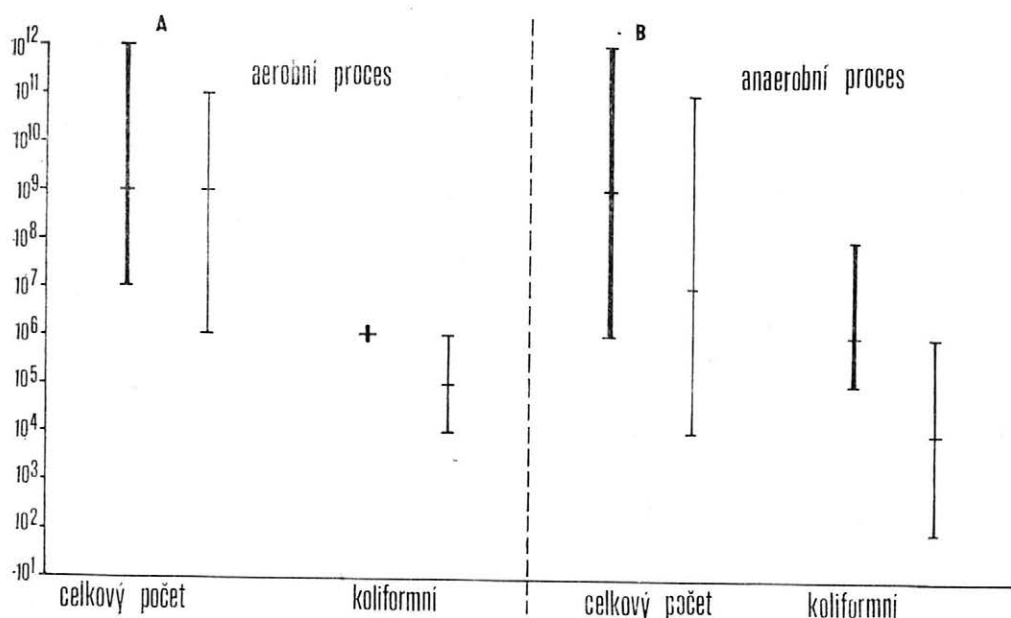
V čistírně odpadních vod V. Č. (aerobní systém) byly ve čtyřech odběrech odebrány a vyšetřeny celkem 24 vzorky, v čistírně T. (anaerobní systém) v 19 odběrech 152 vzorky a z laboratorního pokusu s tekutým kompostováním v pěti pokusech celkem 30 vzorků.

VÝSLEDKY A ZHODNOCENÍ

Výsledky chemického a aerobního procesu jsou vyjádřeny formou střední hodnoty (medianu) jednotlivých stupňů čistícího procesu v tab. I a graficky vyjádřeny na obr. 1a. Z výsledků je patrné, že celkový počet

I. Čistírna odpadních vod (tekutého hnoje) V. Č., aerobní systém – Sewage treatment plant, aerobic system
Střední hodnoty (median) jednotlivých stupňů čistícího procesu

Jednotlivé stupně čistícího procesu	Mezofilní zárodky	Psychrofilní zárodky	Koliformní zárodky
Surový tekutý hnůj	$1,0 \cdot 10^{11}$	$3,8 \cdot 10^{12}$	$6,0 \cdot 10^6$
Přítok na čističku po separaci	$5,8 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^8$	$9,7 \cdot 10^5$
SECLAR	$1,2 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^6$
BIOCLAR I	$7,8 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^6$
BIOCLAR II	$5,2 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^6$
Odtok	$7,0 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^8$	$7,5 \cdot 10^5$



1. Počet zárodků v tekutém hnoji a v konečném produktu (A – aerobní proces, B – anaerobní proces) – The number of germs in liquid manure and in the final product

zárodků v nezpracovaném kalu se v medianu pohybuje řádově v hodnotě 10^{12} . Z grafu je však jasné, že při jednotlivých odběrech jsou značné rozdíly. Vlastním čistícím procesem se celkový počet zárodků výrazně neovlivní.

Koliformní zárodky se pohybují v surovém tekutém hnoji v hodnotách 10^6 a nálezy jsou celkově stabilní. Čistícím procesem se snižují o je-

den řád, přičemž snížení je značně nerovnoměrné, jak je patrné z obr. 1. Celkově je tedy možné konstatovat, že účinnost sledovaného systému na mikrobiální osazení je nízká.

Výsledky anaerobního čistícího procesu z T. jsou vyjádřeny tím-
těž způsobem v tab. II a graficky znázorněny na obr. 1b.

II. Čistírna odpadních vod (tekutého hnoje) T, anaerobní systém — Sewage treatment plant, anaerobic system

Střední hodnoty (median) jednotlivých stupňů čistícího procesu

	Mezofilní zárodky	Psychrofilní zárodky	Koliformní zárodky
Surový kal	$8,0 \cdot 10^8$	$6,1 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^6$
VN 1	$3,4 \cdot 10^6$	$8,9 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^4$
VN 2	$2,6 \cdot 10^6$	$9,0 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^4$
Akumulační nádrž	$1,6 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^7$	$7,2 \cdot 10^4$
Dosazovací nádrž	$8,8 \cdot 10^4$	$8,6 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^4$
Pevná fáze čerstvá	$1,0 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^5$	$4,3 \cdot 10^3$
Pevná fáze ze skládky	$4,5 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^7$	$3,6 \cdot 10^5$
Odtok do recipientu	$5,8 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^5$	$8,1 \cdot 10^3$

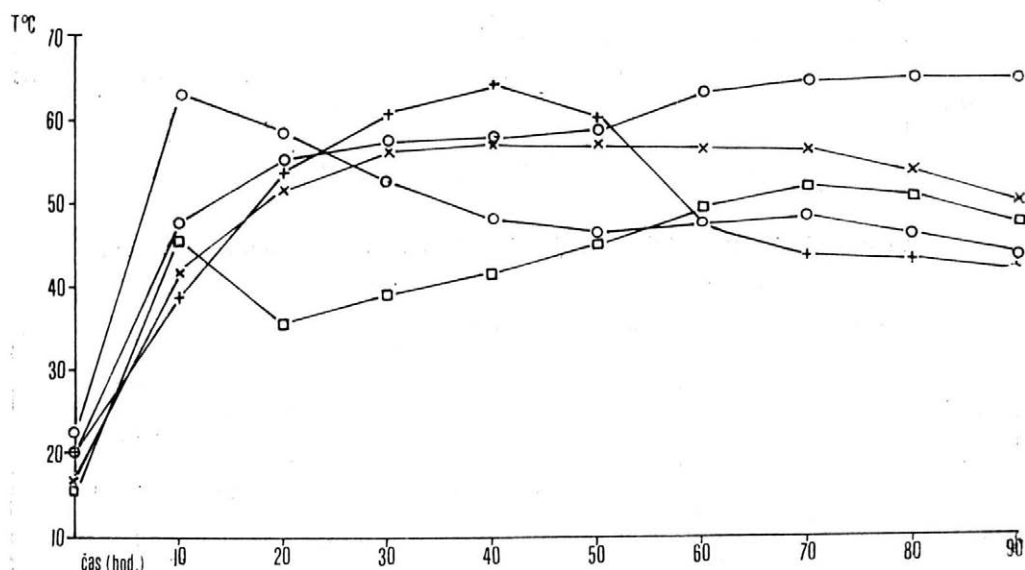
Při anaerobním způsobu čištění se výrazněji snižuje celkový počet zárodků, z nich zejména koliformních, které se snížily až o 3 řády. Z grafického znázornění však vyplývá, že i zde se po zpracování zvětšuje rozdíl ve zjištěných mezních hodnotách.

Jak je patrné z našich výsledků, jsou nálezy koliformních zárodků poměrně konstantní a charakteristické pro mikrobiální osazení tekutého hnoje. Je tedy možné považovat je za hlavní indikátory účinnosti různých systémů čištění z hlediska hygienického. Jak vyplývá z prací čet-
ných autorů, je nutné při jejich přežívání předpokládat i přežívání řady dalších zárodků, včetně významných patogenů.

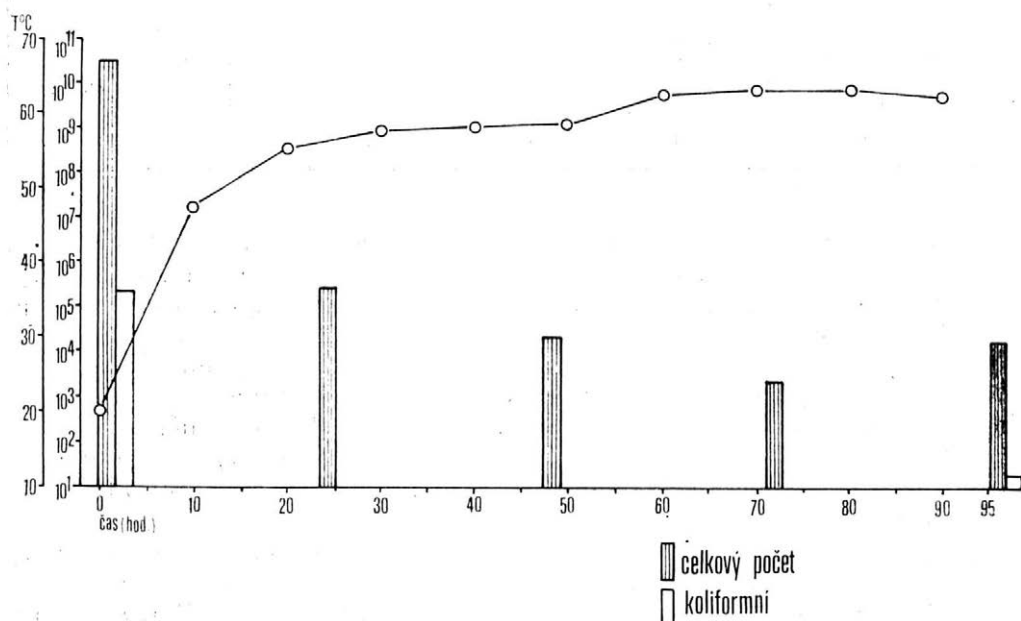
Výsledky vyšetření vzorků z tekutého kompostování jsou vyjádřeny graficky. Na obr. 2 je znázorněn průběh teplot při pěti pokusech. Na obr. 3 je znázorněn průběh teplot a počet zárodků (celkový a koliformní) zjištěný v jednom z pokusů, ve kterém bylo dosaženo celkově optimálního průběhu teploty.

V mikrobiálním osazení vstupního materiálu pro tento způsob zpracování jsou rozdíly téměř stejné jako u předchozích vyšetření. Vlastní proces aerobní stabilizace v termofilní oblasti se odráží v mikrobiálním osazení výrazně, přičemž je zřejmý vliv vzestupu a dalšího průběhu teploty.

Celkový počet zárodků při optimálním průběhu teploty výrazně klesá (řádově z 10^{11} na 10^3 v 1 ml).



2. Průběh teplot během pokusů s tekutým kompostováním — The course of temperature in the course of the experiments with the liquid composting



3. Teplota a počet zárodků v průběhu tekutého kompostování — Temperatures and the numbers of germs in the course of liquid composting

Velmi příznivého účinku bylo dosaženo u koliformních zárodků, které nebyly prokázány již při druhém odběru (po 24 hod.).

Tekuté kompostování lze tedy posoudit z hlediska hygienického příznivě, i když jeho účinnost na mikrobiální osazení je přímo závislá na průběhu vlastního procesu, zejména na teplotách.

Celkově je tedy možné konstatovat, že nelze předpokládat devitalizaci paatogenů ani u aerobního, ani u anaerobního čistícího systému. Tyto postupy nezabezpečují zpracovaný tekutý hnůj po stránce veterinárně hygienické. Finální produkt, tj. vyčištěnou vodu, je možné využívat zemědělsky (k závlahám) nebo vypouštět do recipientu pouze za předpokladu, že vstupní materiál (surový tekutý hnůj) pochází od zvířat prostých nákazy. V případě, že propukne některá nákaza, je nutné finální produkt dezinfikovat.

Tekuté kompostování bylo ověřováno v laboratorních podmínkách. Výsledky jsou velmi nadějně, poněvadž při správném průběhu se koliformní zárodky devitalizují. Tento systém je třeba rozvíjet a ověřit v provozních podmínkách.

Literatura

- BEST, E.: Tenazitäts- und Desinfektionsversuche mit Salmonellen in natürlich gelagerten Flüssigmisten von Rinder und Kälbern. [Vet. Med. Diss.] Giessen 1969.
- BEST, E. — MÜLLER, W. — STRAUCH, D.: Untersuchungen über die Tenazität von Krankheitserregern in tierischen Fäkalien, 4. Mitteilung. Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 84, 1971, s. 184-188.
- BLUM, J.: Untersuchungen über Vorkommen, Tenazität, Wachstum und Desinfektion von Salmonellen in Abwasser von Landwirtschaftsbetrieben. [Vet. Med. Diss.] Bern 1968.
- GRISAJEV, I. D.: Sanitarnaja ocenka tehnologii i sistem udaleniya, pererabotky, obezrazhivaniya i ispolzovaniya navoza. In: Zoohygiena i veterinarnaja sanitarnaja v promyšlennom životnovodstve. Moskva, Kolos 1973, s. 202-259.
- HAHN, G.: Untersuchungen über die Tenazität von Salmonellen in Schwemmisten verschiedener Zusammensetzungen. [Vet. Med. Diss.] Giessen 1967.
- HOJOVEC, J.: Veterinárně hygienické hodnocení různých způsobů zpracování výkalů z velkokapacitních provozů. [Závěrečná zpráva etapy výzkumného úkolu C-11-329-003-04-02.] Brno, Vysoká škola veterinární 1976.
- HOTAŘ, Z.: Tekuté kompostování — nový způsob úpravy kejdy prasat. Vodní hospodářství, 24, 1974, č. 8, s. 212-216.
- MACKERLE, V. — MACKERLE, S.: Zprůmyslnění výstavby čistíren odpadních vod zavedením stavebnicového systému — II. etapa. [Závěrečná zpráva resortního výzkumného úkolu č. RC-1-41/089.] Ostrava, Výzkumné ústavy VŽKG 1974, 55 s., přílohy.
- MOTZ, R. — AA, VON DER: Hygienische Probleme der Güllewirtschaft. Mh. VetMed., 25, 1970, č. 2, s. 60-68.
- MOTZ, R.: Über die Milieuverhältnisse anaerob lagernder Dickgülle und deren Beziehung zur Überlebenszeit einiger Bakterien. In: Probleme der Güllewirtschaft. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1971, s. 9-96.
- POLJAKOV, A. A. — ANDRJUNIN, J. I.: Obezrazhivaniye židkovo navoza pri jaščure i bolezni Aujeski. Veterinarija, 1974, č. 4, s. 45-47.
- STRAUCH, D. — HAHN, G.: Untersuchungen über die Tenazität von Krankheitserregern in tierischen Fäkalien, 1. Mitteilung. Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 81, 1968, s. 441-444.
- STRAUCH, D. — MÜLLER, W.: Untersuchungen über Tenazität von Krankheitserregern in tierischen Fäkalien, 2. Mitteilung. Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 81, 1968, s. 468-471.
- ŠKARDA, M.: Hnojení kejdou skotu a prasat při koncentraci a specializaci zemědělské výroby. In: Využití kejdy z velkokapacitních bezstelivových provozů pro chov skotu a prasat. ČSVTS, Praha 1973a, s. 45-59.
- ŠKARDA, M. — JELÍNEK, T. — ZELENÁ, L.: Hnojení kejdou prasat. Metodika ČAZ ÚVTI Praha 1973, č. 17-18.
- ŠKARDA, M.: Hnojivá účinnost kejdy prasat. Vodní hospodářství, 24, 1974, č. 8, s. 199-202.

TROJAN, F.: Komplexní řešení čištění městských odpadních vod a likvidace kalů z velkovýkrmny prasat v oblasti města Třeboně. Vodní hospodářství, 24, 1974, č. 8, s. 203-206.

USAČEVA, I. G. — POLJAKOV, A. A.: Epizootologičeskije i gigijeničeskije aspekty uborki navoza. VNIITEISCH, Moskva 1973, 71 s.

ALFA LAVAL: Tumba: Das Licom-System, 18 s.

TGL 24198/01: Gülleverwertung — Hygienische Anforderungen. DDR — Fachbereich-standard. (Návrh 1974).

ON 73 45 16. Projektování staveb pro chov skotu. MZVŽ, ČSR, Praha 1974.

Pokyny pro posuzování staveb zemědělské velkovýroby z hlediska péče o životní prostředí. Praha 1972.

Došlo dne 20. 5. 1977

ГОЙОВЕЦ, Й. (Ветеринарный институт, Брно): Ветеринарно-гигиеническая оценка разных способов переработки жидкого навоза. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (12) : 737-745.

Жидкий навоз — побочный продукт животноводства, который используется преимущественно как удобрение без предшествующей обработки. Длительное выживание в нем значительных патогенов свидетельствует о эпизоотологическом риске такого способа применения — наряду с проблемой охраны окружающей среды. Поэтому в условиях крупных концентраций животных или в особо экспонированных местах его надо по-разному перерабатывать. С этой целью мы проводили наблюдения в 2 водоочистных станциях, работающих по принципу аэробной и анаэробной очистки и в 2 лаборат. установках для жидкого компостирования (аэробной стабилизации в термофильной области). В процессе очистки мы брали образцы для микробиологического исследования: определяли обычным способом общую численность микробов (психо- и мезофильных) и численность колиформных микробов. Аэробная очистка не влияет заметно на общую численность микробов, а число колиформных сокращается с 10^6 до 10^5 , зато анаэробная чувствительно сокращает и те и другие: с 10^5 до 10^3 . Данные по жидкому компостированию зависят от достигнутой температуры. Общее количество микробов сокращается с 10^{11} до 10^3 , а колиформных вообще не остается спустя 24 часа. В этих системах не сожидается девитализации патогенов ни в одном из процессов. Жидкое компостирование представляется перспективным, но нуждается в испытании на практике.

аэробная, анаэробная стабилизация; жидкое компостирование

HOJOVEC, J. (University of Veterinary Medicine, Brno): *Veterinary and Sanitary Evaluation of Various Methods of Liquid Manure Treatment*. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (12) : 737-745.

Liquid manure is a by-product of animal production which is mainly used as a soil fertilizer without previous treatment. However, the long-time survival of important pathogens in liquid manure implies that this mode of liquid manure disposal entails great epizootological hazards, added to the environment pollution problems. Various methods of treatment will be needed on farms with high livestock concentrations or in particularly exposed localities. An experiment was conducted to study two sewage disposal plants working on the principle of anaerobic and aerobic cleaning, and one laboratory system for liquid composting (i. e. aerobic stabilization in the thermophilous zone). Samples for microbiological examination were taken during the cleaning processes. Current methods were used in determining the total number of microbes (psychrophilous and mesophilous) and the number of coliform microbes. The results prove that the aerobic process did not exert any significant influence on the total number of microbes and that the number of coliform microbes is reduced from 10^6 to 10^5 . The anaerobic method enables a greater reduction in the total number of microbes and, in particular, in the number of coliform microbes (from 10^6 to 10^3). The results of the examination of samples in liquid composting are affected by the temperature reached by the material during the treatment. The total number of microbes will drop from 10^{11} to 10^3 . Coliform microbes were found to be absent from the material already after 24 hours of the cleaning process. Devitalization of the pathogens can be expected neither in the aerobic, nor anaerobic, process in the systems studied. Liquid composting has been found to be promising and to deserve testing under the working conditions.

aerobic stabilization; anaerobic stabilization; liquid composting

HOJOVEC, J. (Veterinärmedizinische Hochschule, Brno): *Veterinärhygienische Bewertung unterschiedlicher Verarbeitungsverfahren vom flüssigen Stallmist*. Vet. Med., Praha, 22, 1977 (12) : 737-745.

Der flüssige Stallmist stellt ein Nebenprodukt der tierischen Produktion dar, der hauptsächlich als Düngemittel ohne vorhergehende Verarbeitung ausgenutzt wird. Das verhältnismäßig lange Überleben der bedeutenden Pathogene im flüssigen Mist verweist auf beträchtliches epizootologisches Risiko dieses Anwendungs Verfahrens – nebst dem mit dem Umweltschutz zusammenhängenden Problem. Für große Konzentrationen der Tiere, bzw. in besonders gefährdeten Lokalitäten, muß man mit unterschiedlichen Verarbeitungsverfahren rechnen. Deshalb beobachteten wir zwei Abwasserkläranlagen auf dem Prinzip der aeroben und anaeroben Reinigung und die Laboreinrichtung für flüssige Kompostierung (d. h. aerobe Stabilisierung im thermophilen Gebiet). Während der Reinigungsvorgänge wurden die Proben zur mikrobiologischen Untersuchung entnommen, wobei die Gesamtzahl von Mikroorganismen (Psychrophile und Mesophile) und Kolibakterien mit Hilfe von üblichen Methoden untersucht wurden. Die Ergebnisse zeigen, daß beim aeroben Reinigungsvorgang die Gesamtzahl der Mikroorganismen nicht signifikant beeinflußt wird und die Anzahl der Kolibakterien von 10^6 auf 10^5 sinkt. Beim anaeroben Reinigungsvorgang sinkt signifikanter nicht nur die Gesamtzahl von Mikroorganismen, sondern auch die Anzahl von Kolibakterien, und zwar von 10^6 auf 10^3 . Die Ergebnisse der Probenuntersuchung bei der flüssigen Kompostierung wurden durch die erreichte Temperatur beeinflußt. Die Gesamtzahl der Mikroorganismen sinkt von 10^{11} auf 10^5 , die Kolibakterien wurden nach 24 Stunden des Reinigungsvorgangs nicht mehr nachgewiesen. Bei den untersuchten Systemen kann man eine Schwächung der Lebenskraft von Pathogenen weder beim aeroben noch beim anaeroben Vorgang voraussetzen. Als perspektiv scheint die flüssige Kompostierung zu sein, die noch unter Betriebsbedingungen überprüft werden muß.

aerobe Stabilisierung; anaerobe Stabilisierung; flüssige Kompostierung

Rukopis odevzdán k tisku 7. 10. 1977 – Podepsáno k tisku 1. 2. 1978

Adresa autora:

Doc. MVDr. Jiří Hojovec, CSc., Vysoká škola veterinární, Palackého 1-3, 612 42 Brno



Beseda I., Váľka J.: Hodnotenie metabolických profilových testov samo- činným počítačom	705
Bartoniček F., Hrušovský J., Hanuš L.: Využití hmotové spektro- metrie při chemické analýze organofosforových sloučenin	713
Bartoš J., Matyáš Z.: Výběr screeningových metod pro zjišťování afla- toxinů v krmivech	723
Bartoš J., Matyáš Z.: Screening na přítomnost aflatoxinu B ₁ v krmi- vech	729
Hojovec J.: Veterinárně hygienické hodnocení různých způsobů zpracování tekutého hnoje	737

СОДЕРЖАНИЕ

Беседa И., Валка Й.: Оценка метаболических профильных тестов с по- мощью ЭВМ	705
Барто́ничек Ф., Грушовски Й., Гануш Л.: Применение мас-спектро- метрии в химическом анализе органофосфорных соединений	713
Бартош Й., Матиаш З.: Отбор отсеочных методов определения афлатокси- нов в кормах	723
Бартош Й., Матиаш З.: Отсев на присутствие афлатоксина B ₁ в кормах	729
Гойовец Й.: Ветеринарно-гигиеническая оценка разных способов переработки жидкого навоза	737

CONTENTS

Beseda I., Váľka J.: Computer Processing of the Data from Metabolism Profile Tests	705
Bartoniček F., Hrušovský J., Hanuš L.: Application of Mass Spectrometry to the Chemical Analysis of Organophosphorus Compounds	713
Bartoš J., Matyáš Z.: Selection of Screening Methods for the Detection of Aflatoxins in Feeds	723
Bartoš J., Matyáš Z.: Screening for the Presence of Aflatoxin B ₁ in Feeds	729
Hojovec J.: Veterinary and Sanitary Evaluation of Various Methods of Liquid Manure Treatment	737

INHALT

Beseda I., Váľka J.: Bewertung der metabolischen Profilteste mittels automatischer Rechenanlage	705
Bartoniček F., Hrušovský J., Hanuš L.: Anwendung der Massen- spektrometrie bei der chemischen Analyse der Organophosphorverbindungen	713
Bartoš J., Matyáš Z.: Auswahl von Screening-Methoden für die Ermitt- lung der Aflatoxine in den Futtermitteln	723
Bartoš J., Matyáš Z.: Screening zur Bestimmung des Aflatoxins B ₁ in den Futtermitteln	729
Hojovec J.: Veterinärhygienische Bewertung unterschiedlicher Verarbei- tungsverfahren vom flüssigen Stallmist	737

Rozšiřuje Poštovní novinová služba. Objednávky a předplatné přijímá PNS — ústřední expedice tisku, administrace odborného tisku, Jindřišská ulice 14, 110 00 Praha 1. Lze též objednat u každé pošty i poštovního doručovatele. Objednávky do zahraničí vyřizuje PNS - ústřední expedice tisku, oddělení vývozu tisku, Jindřišská ulice 14, 110 00 Praha 1. Vytiskl MÍR, novinářské závody, n. p., závod 6, Legerova ulice 22, 120 00 Praha 2.