

VĚDECKÝ ČASOPIS



VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

9

ROČNÍK 23 (LI)
PRAHA
ZÁŘÍ 1978
CENA 10 Kčs

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÁ
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ
PRO ZEMĚDĚLSTVÍ

Řídí 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, doc. MVDr. Ladislav Polák, CSc., MVDr. Josef Raszyk, CSc., MVDr. Antonín Tesař, CSc., prof. MVDr. Jaroslav Vrtiak, DrSc.

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

Redaktorka ing. Jovanka Václavíková

© Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, Praha 1978

■
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.

K. Kubíček, J. Hojovec

KUBÍČEK, K. — HOJOVEC, J. (Vysoká škola veterinární, Brno): *Vliv různého množství 3% a 5% roztoku Jodonalu A na účinnost dezinfekce ve výkrmnách prasat*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 513-520.

Ve výkrmnách prasat byl před dezinfekcí zjištěn nižší stupeň kontaminace povrchů laktótopozitivními mikroorganismy, než bylo doposud udáváno. Kromě toho, že se zlepšily možnosti pro mechanickou očistu v moderních halách, uplatňují se zde i další faktory, především doba vyprázdnění haly a jejího vysychání. Z hlediska metodického jsou výsledky ověření kontaminace ploch laktótopozitivními mikroorganismy dokladem toho, že tyto mikroorganismy můžeme použít jako indikátory, i když je jejich množství značně nižší. Účinnost preventivní dezinfekce 3% a 5% roztokem Jodonalu A byla nedostatečná i při nejvyšších aplikačních množstvích (tj. 1,0 l m⁻², resp. 0,5 l m⁻²) a při dvojí aplikaci. Příčinu spatřujeme v neodpovídajícím stupni mechanické očisty, přestože její úroveň byla lepší, než je v běžných provozních podmínkách obvyklé. Za současné úrovně mechanické očisty není možné Jodonala A doporučit pro preventivní dezinfekci stájí ani v 5% koncentraci při spotřebě 1,0 l m⁻², a proto snižování aplikačního množství roztoku na jednotku plochy nepřichází v úvahu. Naproti tomu účinnost dezinfekce 2% Chloraminu B za jinak stejných podmínek byla velmi dobrá, takže lze pro preventivní dezinfekci v moderních stájích s hladkými povrchy snížit jeho množství na 0,4 l m⁻², resp. 0,2 l m⁻² při opakované aplikaci.

stájové povrchy; kontaminace stájových povrchů; Jodonala A; Chloramin B; množství dezinfekčního roztoku

Dezinfekci stájových objektů je třeba chápat jako dvoustupňový proces, při kterém je nutné v první etapě dokonale očistit určené plochy a ve druhé etapě je vhodně dezinfikovat. Plná účinnost dezinfekce je závislá na obou etapách, přičemž obě jsou vzájemně nezastupitelné.

V zemědělských provozech představuje největší problém mechanická očista, která je časově a pracovní náročná. Mechanizace těchto prací není zcela dorešena a nové mechanizační prostředky nejsou běžně dostupné. Proto mohl Kubíček (1972) konstatovat, že nejčastější příčinou málo účinné dezinfekce je právě nedokonalá mechanická očista.

Podle Kurzwega a Fritzsche (1970) je možné považovat za vyhovující takovou očistu, po které struktura, resp. barva materiálu je zřetelná. Tím je zajištěn přístup dezinfekčního prostředku k dezinfikovanému materiálu. Autor zdůrazňuje, že uvedené hodnocení přísluší pracovníkům, kteří jsou školení v oboru dezinfekce. Motz aj. (1973) požadují takový stupeň čištění, aby vrstva nečistot nepřesáhla 50 μ . Tuto vrstvu je ovšem možné měřit pouze v laboratorních podmínkách.

Zpětným působením dezinfikovaných materiálů se zabýval Bolek (1972). Poukazuje na problém dezinfekce pórezních materiálů (dřevo, omítka, kamenina, beton, pěnovitě a houbovitě hmoty). Tyto hmoty pohlcují chemické dezinfekční prostředky fyzikálně a v některých případech je chemicky inaktivují. V běžné praxi je proto nutné kompenzovat nevýhodu nadbytkem dezinfekčního roztoku aplikovaného dvakrát nebo vícekrát za sebou s prodloužením expoziční doby. Přitom zdůrazňuje opakování dezinfekčního postupu jako významnější, než zvýšení koncentrace a prodloužení expozice. Současně autor upozorňuje na inaktivaci chemických dezinfekčních prostředků organickými látkami buď adsorpcí, nebo přímo chemickou vazbou, nebo vytvořením ochranného prostředí pro mikroorganismy.

V našich podmínkách se s popsáním jevem často setkáváme. Zbytky krmiva a výkalů představují organickou hmotu a nejsou-li dokonale odstraněny, uplatňují se negativně na dezinfekční efekt.

Účinnost dezinfekce a potřebné množství dezinfekčního roztoku je závislé i na způsobu aplikace. Vychází se z předpokladu, že čím jemněji je dezinfekční roztok rozptýlen, tím mají částice vzniklé ze stejného množství větší povrch. Při jemnějším rozptýlení můžeme tedy snížit množství dezinfekčního roztoku ke krytí stejné plochy. Vztah mezi počtem kapek a jejich velikostí udává Langenscheidt (1954).

Jedním z podstatných faktorů, který ovlivňuje výsledný efekt dezinfekce, je množství aplikovaného chemického dezinfekčního roztoku na jednotku plochy. Názory a údaje o tom se v literatuře liší.

Sovětské směrnice pro veterinární dezinfekci (1969) doporučují ve shodě s Poljakovem (1975) aplikovat na 1 m² plochy 1 l roztoku. Stejně množství roztoku doporučují Iliev aj. (1973) i naše Pokyny pro dezinfekci (1962). Naproti tomu Stellmacher aj. (1970, 1974) doporučují na 1 m² plochy 0,3 až 0,4 l roztoku. Dezinfekční čtyři VAÚ účtují práce podle Výměru ze dne 6. 2. 1975, který vychází z předpokladu, že při profylaktické dezinfekci se na 1 m² dezinfikované plochy použije 100 ml roztoku. Všechny citované práce doporučují při profylaktické dezinfekci jednorázovou aplikaci roztoku.

Na podkladě zhodnocení uvedených literárních údajů jsme se snažili zjistit vliv různého množství 3% a 5% roztoku Jodonalu A na účinnost dezinfekce ve výkrmnách prasat.

MATERIÁL A METODY

Účinnost dezinfekce jsme ověřovali v bezokenních halách pro výkrm ca 1000 prasat, umístěných na dvou lokalitách. Prasata byla krmena suchým krmivem na podlahu. Výkrmové haly se od sebe lišily pouze materiálem použitým k opláštění stěn (typ Bios Sedlčany a typ ZSS Blansko). Po vyskladnění očistili pracovníci závodu výkrmové haly mechanicky podle našich požadavků. Ve vyčištěných suchých halách bylo vyznačeno šest pokusných polí o ploše dezinfikovaného povrchu ca 270 m². Před dezinfekcí bylo z každého pokusného pole odebráno deset stěrů; kvůli průkazu laktózo pozitivních mikroorganismů jsme stěny ponořili přímo do tekuté půdy VNIIVS s přídatkem 0,1% sirnatanu sodného. Tampónem zvlhčeným v tekuté půdě jsme odebírali jeden stěr z asfaltového krmíště, po dvou stěrech z kovových roštů, z asfaltového lože, ze stěn, pozinkovaného hrazení kotců a jeden stěr z betonového kuzele.

Dezinfekční roztok byl aplikován vozíkovým postřikovačem Ps VB 100, u kterého byl předem stanoven minutový výkon při použití různých trysek a tlaku. Byla vypočítána plocha pokusného pole a jeho částí určených k dezinfekci, a to plocha stěn, stropu, podlah a hrazení kotců z obou stran. Podle vypočítané plochy a stanoveného výkonu postřikovače byla pro jednotlivá pokusná pole zvolena vhodná tryska a tlak a byly vypočítány časy potřebné pro aplikaci požadovaného množství roztoku na jednotlivé části pokusného pole. Podle takto vypracovaného časového harmonogramu byl stopkami řízen postřik v jednotlivých částech pokusných polí. Na jednotlivá pokusná pole bylo aplikováno různé množství 3%, resp. 5% Jodonalu A jednorázově nebo opakovaně, a to s minimální přestávkou dvě hodiny:

pokusné pole	I	II	III	IV	V	VI
předpokládané množství roztoku na 1 m ² plochy v jednom litru při jednom postřiku	0,1	0,4	1,0	0,5	0,2	0,1
počet postřiků	1	1	1	2	2	2

Pokusná pole byla dezinfikována v pořadí VI, V, IV, I, II, III, IV, V, VI. Po ukončení postřiku v každém poli bylo zapsáno skutečné množství spotřebovaného dezinfekčního roztoku a zaznamenán čas. Dezinfikovaná byla i zbývající část stáje ležící mimo pokusná pole.

Po dvouhodinové expozici jsem začali odebírat stěry, a to v každém pokusném poli vždy ze čtyř kotev ležících uvnitř pole, zatímco okrajové kotce sloužily k vzájemné izolaci jednotlivých pokusných polí. Z každého pokusného pole byly odebrány 44 stěry na průkaz laktózo pozitivních mikroorganismů, z toho byly 22 stěry z vodorovných ploch (po šesti stěrech z asfaltového krmiště a z kovového roštu a deset stěrů z asfaltového lože). Další 22 stěry byly z ploch svislých (po šesti stěrech ze stěny a z betonového kužele a deset stěrů z pozinkovaného hrazení kotev). V tekuté vodě jsme zvlhčenými tampóny stírali plochu 100 cm², ohraničenou sterilní šablonou, po dobu ca 1 minuty. Potom byly tampóny ponořeny přímo do půdy VNIIVS s přídatkem 0,1 % sirnatanu sodného.

V laboratorii jsme zkumavky se stěry odebranými před dezinfekcí i po ní vložili do termostatu a inkubovali při teplotě 42 °C po dobu 36 hodin. Růst laktózo pozitivních mikroorganismů se projevil zákalem, změnou barvy a tvorbou plynu. K vyhodnocení výsledků jsme použili procentuálního vyjádření vzorků s průkazem laktózo pozitivních mikroorganismů.

VÝSLEDKY

Kontaminaci povrchů laktózo pozitivními mikroorganismy jsme ověřovali před vlastními pokusy odběrem deseti vzorků z každého ze šesti pokusných polí v pěti pokusech. Celkově jsme tedy vyšetřili 300 vzorků. V tab. I je vyjádřen procentuální podíl stěrů, v nichž byl prokázán růst laktózo pozitivních mikroorganismů. Z tabulky vyplývá, že kontaminace se značně liší podle místa odběrů. Celkově je víc než dvojnásobně vyšší na horizontálních plochách než na plochách vertikálních.

Z tab. II jsou zřejmé určité rozdíly mezi předpokládaným a skutečným množstvím roztoku Jodonalu A, aplikovaným na 1 m² dezinfikované plochy. V provozních podmínkách nelze při použití daného zařízení předpokládat větší přesnost v dávkování.

I. Kontaminace ploch laktózo pozitivními mikroorganismy před dezinfekcí — Contamination of surfaces with lactose-positive micro-organisms prior to disinfection

	Krmiště	Rošt	Lože	Stěna	Hrazení	Kůžele	Celkem	Plochy	
								vodorovné	svislé
Procento z celkového počtu stěrů	87	75	80	32	23	47	55	79	31

II. Průměrná spotřeba dezinfekčního roztoku na 1 m² plochy — Average consumption of disinfectant solution per 1 sq. m of area

Předpokládané množství dezinfekčního roztoku v l m ⁻²	0,1	0,4	1,0	0,1	0,2	0,5
Počet aplikací	1 ×	1 ×	1 ×	2 ×	2 ×	2 ×
Průměr celkového skutečného množství aplikovaného roztoku v l m ⁻²	0,11	0,36	0,88	0,20	0,42	0,80

Vliv různého množství Jodonalu A na účinnost dezinfekce byl ověřován ve čtyřech pokusech s 3% roztokem Jodonalu A; v jednom pokuse byla koncentrace zvýšena na 5 %. Výkrmové haly byly ve dvou případech mechanicky čištěny tlakovým čistícím strojem Wap a ve třech případech pouze studenou vodou s nízkým tlakem košťaty. Nestejná úroveň mechanické očisty, podmíněná provozními podmínkami a námi přes veškerou snahu neovlivnitelná, nás vedla k rozčlenění výsledků po dezinfekci 3% Jodonalem A do dvou skupin, a to:

- dva pokusy s nižší úrovní mechanické očisty,
- dva pokusy s vyšší úrovní mechanické očisty.

Samostatně jsou zpracovány výsledky dosažené s 5% roztokem Jodonalu A po mechanické očistě nižší úrovně.

V první a druhé skupině pokusů bylo vyšetřeno vždy po 528 vzorcích a po dezinfekci 5% Jodonalem A 264 vzorky. Celkem bylo vyšetřeno 1320 vzorků.

Počet stěrů s průkazem laktózopozitivních mikroorganismů, vyjádřený v procentech z celkového počtu vyšetřených po dezinfekci 3% roztokem Jodonalu A po nižší úrovni mechanické očisty, uvádí tab. III, po očištění vyšší úrovně tab. IV a po dezinfekci 5% roztokem Jodonalu A po nižší úrovni očisty tab. V.

Výsledky dezinfekce 3% roztokem Jodonalu A po očištění s nižší úrovní (tab. III), a to jak celkové, tak i na vodorovných i svislých plochách, jsou s výjimkou nejvyšších aplikovaných množství stejné, nebo dokonce horší než kontaminace ploch před dezinfekcí, uvedená v tab. I. Po dezinfekci ploch lépe mechanicky očištěných (tab. IV) bylo dosaženo celkově lepšího dezinfekčního účinku než u první skupiny. Je zde vyjádřen pozitivní vliv jak množství, tak opakované aplikace.

III. Podíl stěrů s průkazem laktózopozitivních mikroorganismů, vyjádřený v procentech po dezinfekci 3% roztokem Jodonalu A — nižší úroveň mechanické očisty — The proportion of smears with proved presence of lactose-positive micro-organisms, expressed as percentage, after disinfection with 3% Jodonal A — lower level of mechanical cleansing

Množství dezinfekčního roztoku v l m ⁻²	0,1	0,4	1,0	0,1	0,2	0,5
Počet aplikací	1 ×	1 ×	1 ×	2 ×	2 ×	2 ×
Krmiště	91,67	75,00	100,00	91,67	58,33	66,67
Rošt	75,00	75,00	50,00	83,33	83,33	58,33
Lože	80,00	65,00	55,00	85,00	60,00	55,00
Stěna	0,00	33,33	8,33	16,67	8,33	0,00
Hrazení	45,00	35,00	40,00	25,00	40,00	25,00
Kužel	91,67	83,33	83,33	83,33	50,00	41,67
Celkem	63,64	59,09	54,55	62,50	50,00	40,91
Vodorovné plochy	81,82	70,45	65,91	86,36	65,91	59,09
Svislé plochy	45,44	47,73	43,18	38,64	34,09	22,73

IV. Podíl stěrů s průkazem laktózo pozitivních mikroorganismů, vyjádřený v procentech po dezinfekci 3% roztokem Jodonalu A – vyšší úroveň mechanické očištění – The proportion of smears with proved presence of lactose-positive micro-organisms, expressed as percentage, after disinfection with 3% Jodonal A – higher level of mechanical cleansing

Množství dezinfekčního roztoku v l m ⁻²	0,1	0,4	1,0	0,1	0,2	0,5
Počet aplikací	1 ×	1 ×	1 ×	2 ×	2 ×	2 ×
Krmiště	83,33	75,00	41,67	50,00	50,00	41,67
Rošt	83,33	83,33	66,67	58,33	75,00	25,00
Lože	70,00	65,00	25,00	70,00	65,00	50,00
Stěna	0,00	0,00	8,30	25,00	0,00	0,00
Hrazení	40,00	25,00	10,00	15,00	15,00	20,00
Kužel	66,67	66,67	41,67	66,67	66,67	25,00
Celkem	56,82	51,14	29,55	46,59	44,32	28,41
Vodorovné plochy	77,27	72,73	40,91	61,36	63,64	40,91
Svislé plochy	36,36	29,55	18,18	31,82	25,00	15,91

V. Podíl stěrů s průkazem laktózo pozitivních mikroorganismů, vyjádřený v procentech po dezinfekci 5% roztokem Jodonalu A – nižší úroveň mechanické očištění – The proportion of smears with proved presence of lactose-positive microorganisms, expressed as percentage, after disinfection with 5% Jodonal A – lower level of mechanical cleansing

Množství dezinfekčního roztoku v l m ⁻²	0,1	0,4	1,0	0,1	0,2	0,5
Počet aplikací	1 ×	1 ×	1 ×	2 ×	2 ×	2 ×
Krmiště	66,67	33,33	16,67	50,00	50,00	33,33
Rošt	50,00	50,00	16,67	33,33	16,67	16,67
Lože	20,00	40,00	30,00	30,00	20,00	30,00
Stěna	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Hrazení	0,00	10,00	20,00	10,00	0,00	0,00
Kužel	33,33	66,67	0,00	16,67	66,67	16,67
Celkem	25,00	34,09	15,91	22,73	22,73	15,91
Vodorovné plochy	40,91	40,91	22,73	36,36	27,27	27,27
Svislé plochy	9,09	22,73	9,09	9,09	18,18	4,55

Po dezinfekci 5% roztokem Jodonalu A (tab. V) se celkově příznivě projevila zvýšená koncentrace a došlo k dalšímu poklesu kontaminace.

Pro srovnání uvádíme v tab. VI výsledky námi dosažené při stejném uspořádání pokusů ve třech výkrmových halách s nestejnou úrovní mechanické očištění po dezinfekci 2% roztoky Chloraminu B.

VI. Podíl stěrů s průkazem laktózopozitivních mikroorganismů, vyjádřený v procentech po dezinfekci 2% roztokem Chloraminu B — The proportion of smears with proved presence of lactose-positive microorganisms, expressed as percentage, after disinfection with 2% Chloramin B

Množství dezinfekčního roztoku v l m ⁻²	0,1	0,4	1,0	0,1	0,2	0,5
Počet aplikací	1 ×	1 ×	1 ×	2 ×	2 ×	2 ×
Krmiště	5,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Rošt	5,56	0,00	0,00	11,11	11,11	5,56
Lože	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Stěna	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Hrazení	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Kužel	0,00	0,00	11,11	0,00	0,00	5,56
Celkem	3,03	0,00	1,51	1,51	1,51	1,51
Vodorovné plochy	3,03	0,00	0,00	3,03	3,03	1,51
Svislé plochy	3,03	0,00	3,03	0,00	0,00	1,51

DISKUSE

Srovnáme-li výsledky dosažené po dezinfekci 3%, resp. 5% roztokem Jodonalu A s kritérii pro stanovení účinnosti dezinfekce, formulovanými Kubíčkem (1969, 1971), je nutné konstatovat, že ani v jednom případě nebylo Jodonalem A dosaženo požadovaného dezinfekčního účinku.

Celkově nepříznivé výsledky po dezinfekci Jodonalem A jsou překvapující a neodpovídají výsledkům, které jsme předpokládali na základě práce Kubíčka (1975). Ten dosahoval ve výkrmně prasat uspokojivého dezinfekčního účinku s 3% koncentrací Jodonalu A aplikovaného dvakrát po 0,5 l m⁻². Ačkoliv 3% koncentrace je ve srovnání s doporučenými koncentracemi analogických zahraničních dezinfekčních prostředků pro preventivní dezinfekci vyšší, považuje ji tento autor za minimální. Současně zdůrazňuje, že při této koncentraci je možné dosáhnout uspokojivé dezinfekce pouze za předpokladu, že mechanická očista je dokonalá. Význam mechanické očisty je zřejmý i z našich výsledků a obecně horší dezinfekční účinek Jodonalu A tkví zřejmě v této příčině. Abychom vyloučili možný vliv nestandardnosti Jodonalu A na nepříznivé výsledky, nechali jsme Ústavem pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv v Brně stanovit obsah aktivního jódu v použitých šaržích. Ve všech případech byl obsah aktivního jódu vyšší, než je minimálně požadovaný obsah aktivního jódu v Jodonalu A, to je 1,75 %.

Zde je nutné poukázat na zjištění, že při zhruba stejné úrovni mechanické očisty odpovídaly po dezinfekci 2% roztokem Chloraminu B výsledky požadované úrovni. Totéž prokazuje ve své práci Kubíček (1975).

- BOLEK, S.: Usmrcování, inaktivace a odstraňování mikroorganismů z vnějšího prostředí. In: SVOBODA, K. — BOLEK, S. aj.: Dezinfekce a sterilizace v prevenci nozokomiálních nákaz. Praha 1972, s. 52-75.
- ILIEV, T. aj.: Veterinarna dezinfekcija, dezinfekcija i deratizacija. Sofija 1973. 270 s.
- KUBÍČEK, K.: Mikrobiologická kontrola účinnosti preventivní dezinfekce stájových povrchů. [Kandidátská disertace.] Brno 1969. — Vysoká škola veterinární.
- KUBÍČEK, K.: Coliform microbes and Micrococcaceae family microbes as indicators for evaluation of efficiency of disinfection of surfaces in animal houses. Acta vet., Brno, 40, 1971, s. 471-480.
- KUBÍČEK, K.: Komplexní kontrola účinnosti preventivní povrchové dezinfekce v pavilónech velkovýkrmny prasat. Vet. Med., Praha, 17, 1972, č. 2, s. 97-110.
- KUBÍČEK, K.: Ověření baktericidní účinnosti Jodoforu A v pavilónech výkrmny prasat. Vet. Med., Praha, 20, 1975, č. 4, s. 185-192.
- KURZWEG, W. — FRITZSCH, M.: Probleme der Entwicklung moderner Reinigungs- und Desinfektionsverfahren für die Tierproduktion. Mh. VetMed., 25, 1970, s. 705-741.
- LANGENSCHIEDT, E.: „Aerosole“ — eine neue Methodik der Desinfektion und der Therapie in der Veterinärmedizin? Arch. exp. VetMed., 8, 1954, s. 59-72.
- MOTZ, R. — BÄTKE, H. J. — REIMER, K. — VÖLZKE, N.: Laboranalytische Untersuchungen zur Erfassung des Reinigungseffektes. Wiss. Z. Karl Marx Univ. Lpzg, Math.-Naturwiss. R., 22, 1973, s. 443-446.
- POLJAKOV, A. A.: Veterinarnaja dezinfekcija. Moskva 1975, 560 s.
- STELLMACHER, W. a kol.: Desinfektion. Jena 1970. 255 s.
- STELLMACHER, W. a kol.: Desinfektion. Jena 1974. 255 s.
- Pokyny pro organizaci, provádění a kontrolu dezinfekce na ochranu živočišné výroby a uskladnění zásob rostlinných výrobků v zemědělských závodech (č. j. 55 317/1962 ze dne 21. února 1962). Věstník MZLVH, částka 8, ze dne 10. března 1962.
- Instrukcija po provedeniju veterinarnoj dezinfekcii, dezinnavazii, dezinsekcii i deratizaciji. Moskva 1969. 64 s.

Došlo dne 22. 3. 1978

KUBÍČEK, K. — GOJOVEC, J. (Institut veterinární, Brno): Влияние разного количества 3% и 5% раствора Йодонала А на действенность дезинфекции в свиноматочниках. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 513-520.

Перед дезинфекцией свиноматочников была установлена более низкая степень контаминации поверхности лактозоположительными микроорганизмами, чем приводимая до сих пор. Помимо улучшения предпосылок для механической очистки новых залов, имеют место и другие факторы: срок опорожнения зала и и ее высыхания. С методической точки зрения, однако, данные проверки контаминации поверхности лактозоположительными микроорганизмами — доказательство возможности их использования в качестве индикаторов, хотя их численность гораздо меньше. Действенность профилактической дезинфекции 3% и 5% Йодоном А оказалась недостаточной даже в максимальных дозировках (1,01 л м⁻² и 0,5 л м⁻²) и двойных дозах. Причина усматривается в несоответствующей степени механической очистки, хотя ее уровень лучше, чем это имеет место в текущих условиях. С учетом данного уровня механической очистки Йодонал А нельзя рекомендовать для профилактической дезинфекции животноводческих помещений даже в 5% концентрации при расходе 1,0 л м⁻², ввиду чего о сокращении количества раствора на единицу площади не может быть и речи. В противоположность тому, действенность дезинфекции 2% Хлорамином Б в таких же условиях очень хорошая, ввиду чего для профилактической дезинфекции современных помещений с гладкой поверхностью его количество можно сократить до 0,4 л м⁻², или 0,2 л м⁻² при повторном внесении.

поверхность животноводческих помещений; контаминация поверхности животноводческих помещений; Йодонал А; Хлорамин Б; количество дезинфицирующего раствора

KUBÍČEK, K. — HOJOVEC, J. (University of Veterinary Medicine, Brno): The Effect of Different Amounts of 3% and 5% Solutions of Jodonol A on the Effectiveness of Disinfection in Pig Fattening Houses. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 513-520.

In pig-fattening houses, a lower degree of contamination of surfaces with lactose-

-positive micro-organisms was found prior to disinfection, in comparison with the values stated in literature until now. Besides improvement of the possibilities of mechanical cleansing in modern halls, other factors also influence this situation, particularly the time when there are no animals in the hall and the hall dries. From the methodological point of view, the results of the examination of the contamination of stable surfaces with lactose-positive micro-organisms prove that these micro-organisms can be used as indicators, although their amount is much lower. The effectiveness of preventative disinfection with 3% and 5% Jodonal A was insufficient even at the highest application rates (1.0 l m^{-2} and 0.5 l m^{-2} , respectively), and in two applications. This is due to an inadequate degree of mechanical cleansing, although it was done better than usual under current husbandry conditions. With the current mechanical cleansing practices, Jodonal A cannot be recommended for preventative disinfection of stables even in 5% concentration at application rate of 1.0 l m^{-2} ; any reduction in the application rate of the solution per unit of area is therefore out of question. On the other hand, the effectiveness with a 2% solution of Chloramin B under otherwise the same conditions was very good – hence the application rate of this chemical in preventative disinfection of modern smooth-walled stables can be reduced to 0.4 l m^{-2} , or 0.2 l m^{-2} in repeated application.

stable surfaces; contamination of stable surfaces; Jodonal A; Chloramin B; application rate of disinfectant solution

KUBÍČEK, K. – HOJOVEC, J. (Veterinärmedizinische Hochschule, Brno): *Einfluß einer unterschiedlichen Menge von drei- und fünfprozentigen A-Jodonal-Lösungen auf die Desinfektionswirkung in Schweinemästereien*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 513-520.

In Schweinemastställen wurde vor der Desinfektion ein niedrigerer Kontaminationsgrad der Oberflächen von laktosopositiven Mikroorganismen, als bisher angegeben wurde, festgestellt. Neben der Verbesserung der Möglichkeit einer mechanischen Reinigung in den modernen Hallen kommen hier auch noch andere Faktoren zur Geltung, und zwar vor allem die Zeitdauer der Entleerung der Halle und ihrer Austrocknung. Vom methodologischen Gesichtspunkt sind die Ergebnisse der Überprüfung der Kontamination der Flächen mit laktosopositiven Mikroorganismen ein Beweis dafür, daß man diese Mikroorganismen als Indikatoren benutzen kann, wenn auch die Menge derselben bedeutend geringer ist. Die präventive Wirksamkeit der Desinfektion mit 3% und 5% Jodonal A war ungenügend auch bei höchsten Applikationsmengen (d. h. $1,0 \text{ l m}^{-2}$) und bei zweifacher Applikation. Die Ursache ist auf den ungenügenden Grad der mechanischen Reinigung zurückzuführen, wenn auch das Niveau derselben besser war, als üblich unter den gewöhnlichen Bedingungen in der Praxis. Beim derzeitigen Niveau der mechanischen Reinigung kann Jodonal A zur präventiven Desinfektion von Stallungen auch bei einer fünfprozentigen Konzentration und einem Verbrauch von $1,0 \text{ l m}^{-2}$ nicht empfohlen werden. Deshalb kommt eine Herabsetzung der applizierten Lösungsmenge je Flächeneinheit nicht in Frage. Die Wirkung der Desinfektion mit zweiprozentigem Chloramin B dagegen war unter gleichen Bedingungen sehr gut, so daß man bei präventiver Desinfektion von modernen Stallungen mit glatten Oberflächen die Menge desselben auf $0,4 \text{ l m}^{-2}$ bzw. $0,2 \text{ l m}^{-2}$ bei wiederholter Applikation herabsetzen kann.

Stalloberflächen; Kontamination der Stalloberflächen; Jodonal A; Chloramin B; Menge der Desinfektionslösung

Adresa autorů:

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

P. Žižková, M. Goiš, F. Kuksa

ŽIŽKOVÁ, P. — GOIŠ, M. — KUKSA, F. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Identifikace některých porcinních mykoplazmat epi-imunofluorescencí*. Vet. Med., Praha 23, 1978 (9) : 521-530.

V práci porovnáváme reaktivitu typových a terénních kmenů *Mycoplasma hyorhinis* v epi-imunofluorescenci, v růstové inhibičním a růstové precipitačním testu. Typové kmeny spolu s terénními kmeny bylo možné spolehlivě identifikovat přímou i nepřímou epi-imunofluorescencí. V nepřímé epi-imunofluorescenci všechna námi zkoušená králičí antiséra proti kmenům *Mycoplasma hyorhinis* dávala křížově vždy pozitivní reakce se všemi vyšetřenými kmeny *Mycoplasma hyorhinis*. Naproti tomu v křížovém růstové inhibičním a růstové precipitačním testu typové kmeny *Mycoplasma hyorhinis* reagovaly vždy pozitivně pouze s homologními antiséry, heterologní reakce byly v mnoha případech negativní nebo dubiozní. Z jednoznačně pozitivních reakcí v epi-imunofluorescenci se séry proti kterémukoliv kmeni *Mycoplasma hyorhinis* se dá soudit, že tato metoda je k identifikaci mykoplazmových druhů vhodnější než další dva zkoušené testy.

Mycoplasma hyorhinis; růstové inhibiční test; růstové precipitační test

Systematická vyšetřování horních a dolních cest dýchacích prokázala značnou prevalenci druhu *Mycoplasma (M.) hyorhinis* v prasečích populacích. V experimentálních podmínkách na gnotobiotických selsatech (Gojš aj., 1971; Gojš a Kuksa, 1974) byla potvrzena vysoká patogenita tohoto mykoplazmového druhu.

K identifikacím mykoplazmat se používají sérologické testy. V naší laboratoři se určují porcinní mykoplazmata především růstové inhibičním (RI) testem (Clyde, 1964; Dinter a Taylor-Robinson, 1969), metabolismus inhibičním (MI) testem (Taylor-Robinson aj. 1966), v poslední době i růstové precipitačním (RP) testem (Krogsgaard-Jensen, 1972; Gojš a Kuksa, 1975; Friis, 1977).

Zmíněnými testy se ovšem vždy nedaří spolehlivě určovat druhovou příslušnost nového kmene. Platí to především pro druh *M. hyorhinis*. Na jeho značnou antigenní variabilitu bylo poukázáno v práci Gojše aj. (1973), z níž vyplynulo, že identifikace *M. hyorhinis* RI a MI testem je často pracná a ne vždy jednoznačná. Druhovou příslušnost kmenů *M. hyorhinis* bylo možné určit těmito metodami zpravidla jen při použití více sér proti tomuto druhu.

Některé zprávy (Clark aj., 1963; Barile a Delgiudice, 1972) upozorňují na to, že imunofluorescenční metodou (IF) lze nedostatky uvedených testů překlenout. Zdá se, že IF je vhodná z hlediska citlivosti pro mezidruhové diferenciace

mykoplazmových kmenů. Při určování druhové příslušnosti lze použít sér připravených pouze proti jednomu kmeni daného druhu.

V této práci jde především o ověření spolehlivosti epi-imunofluorescenční metody (Barile a Delgiudice, 1972; Rosendal a Black, 1972) — průkaz mykoplazmových kolonií přímo na kultivačním agarovém mediu — pro identifikaci druhu *M. hyorhinis* při současném porovnání s výsledky dosaženými v RI nebo RP testech.

MATERIÁL A METODY

KULTIVAČNÍ MEDIA

K izolacím a srovnávacím pokusům byla použita dvě media: Medium A obsahovalo Hanksův roztok (o/o) 50 ml, koňské sérum nativní (o/o) 20 ml, extrakt z čerstvých kvasnic (o/o) 20 ml, bujón z hovězích srdcí (o/o) 10 ml, octan thalný (v/o) 1 ml, penicilin (200 000 m. j. na 1 ml) 0,1 ml, glukózu 50% (v/o) 0,2 ml, fenolovou červen 0,4% (v/o) 1 ml, pH bylo upraveno na 7,8. Druhé medium — medium B — obsahovalo místo Hanksova roztoku PPOL broth (Difco) (o/o) 60 ml, neobsahovalo glukózu. Ostatní složky media B byly shodné s komponenty media A. Pro přípravu pevných pūd se k základu A nebo B přidával Special Noble-Agar (Difco) v konečné koncentraci 1,2 %.

IZOLACE MYKOPLAZMAT

Z nosních dutin byla izolována mykoplazmata pomocí nosních výtěrů. Postup zpracování plicních suspenzí byl detailně popsán Goišem (1967). Po dvou až třech pasážích bylo inokulum titračně (10^3 nebo 10^5) vyočkováno na příslušné agary, které se po zaschnutí kultury inkubovaly 48 hodin v termostatu při teplotě 37 °C. Dobře narostlé kultury mykoplazmat se identifikovaly přímou a nepřímou IF.

POUŽITÉ MYKOPLAZMOVÉ KMENY IZOLOVANÉ Z PRASAT

Ke srovnávacím testům byly používány tyto typové a terénní kmeny:

Kmeny typové	Kmen izolovaný z	Zeměpisný zdroj kmene	Kmen dodali
<i>M. hyorhinis</i>			
Ne110	plic	ČSSR	dr. M. GOIŠ, VÚVL, Brno, ČSSR
Ni6	plic	ČSSR	dr. M. GOIŠ, VÚVL, Brno, ČSSR
Tr32	plic	ČSSR	dr. M. GOIŠ, VÚVL, Brno, ČSSR
S218	nosní dutiny	Anglie	dr. M. GOIŠ, VÚVL, Brno, ČSSR
Hers	mozku	Holandsko	dr. J. AKKERMANS, Central Veterinary Institute, Rotterdam, Holanď
K	nosní dutiny	Švédsko	dr. Z. DINTER, The Wallenberg Laboratory, University of Uppsala, Sweden
BTS7	nosní dutiny	USA	dr. W. P. SWITZER, Iowa State University, Ames, USA
GDL	nosní dutiny	USA	dr. TULLY, NIAID, Bethesda, Maryland 200 14, USA
<i>M. hyosynoviae</i>			
A40	plic	Anglie	dr. M. GOIŠ, VÚVL, Brno, ČSSR

Kmeny terénní	Izolováno v chovu	Číslo kmene	Kmen izolo- vaný z	Počet kmenů
<i>M. hyorhinis</i>	SU	3, 4, 5, 6, 8	plic	5
	KLA	2, 3	plic	2
	JAS	2	plic	1
	LU	57	nosu	1
	LY	1	plic	1
	VÍ	7	plic	1

SÉROLOGICKÉ TESTY

Izoláty mykoplasmat byly typizovány RI testem (Clyde, 1964), kde inhibice růstu testovaných kmenů byla hodnocena mikroskopicky velikostí inhibičních zón v mm; RP testem (Frogsgaard-Jensen, 1972), kde pozitivitu reakce udával počet precipitačních linií odečítaných vizuálně.

PŘÍPRAVA ANTISÉR

Antiséra pro nepřímou IF, RI a RP test byla připravována na králících postupem, který byl již dříve popsán (Goiš, 1968). Ke všem testům byla používána stejná antiséra.

IF KONJUGÁTY

K nepřímé IF byl používán konjugát SwAR/FITC (prasečí globulin proti králíčímu gamaglobulinu), získaný z ÚSOL Praha. Konjugát ředěný 1:5 až 1:10 byl před použitím vysycen prasečím jaterním práškem.

Pro přímou IF byly získány konjugáty od dr. Tullyho, Bethesda, Maryland, USA, které byly připraveny proti dvěma kmenům *M. hyorhinis* – BTS7 (fluoresceinem značený globulin oslího hyperimunního antiséra proti *M. hyorhinis* BTS7, NIAID, No M718-501-471) a GDL (fluoresceinem značený globulin mulího hyperimunního antiséra proti *M. hyorhinis* GDL, Baltimore Biological Laboratory, 70 81 416). Optimální pracovní ředění konjugátů byla stanovena titrací na 1:80 až 1:160.

NEPŘÍMÁ A PŘÍMÁ IF

Při identifikacích nepřímou IF bylo postupováno podle Rosendala a Blacka (1972). Na agarové bločky s dobře narostlými koloniemi mykoplasmat bylo naneseno příslušné králíčí antisérum v pracovním ředění 1:20 až 1:80. Po 30 minutách inkubace při pokojové teplotě byly bločky opakovaně promyty ve fosfátovém pufru o pH 7,2. Pak byly převrstveny konjugátem proti králíčímu séru. Nato byly opět promyty pufrům a posuzovány ve fluorescenčním mikroskopu asi při 400 nm.

Při přímé IF byl konjugát nanesen na agarové bločky s koloniemi, ponechán ve vlhké komůrce při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Po promytí v pufru byly materiály opět posuzovány fluorescenčním mikroskopem.

VÝSLEDKY

VLIV MEDIA S OBSAHEM GLUKÓZY NA SPECIFITU NEPŘÍMÉ IF

V pokusech o rutinní aplikaci nepřímé IF při identifikacích prasečích mykoplazmových kmenů jsme na našem standardním mediu A

[obsahujícím glukózu] zjišťovali, že reakce jsou provázeny slabou nespecifickou fluorescencí mykoplazmových kolonií (tab. I). Nespecifická fluorescence se projevila na mediu A bez ohledu na to, zda bylo na kontrolní bločky s koloniemi aplikováno sérum proti jinému mykoplazmovému druhu, nebo pouze konjugát SwAR/FITC. V některých případech šlo velmi těžko odlišit specifickou fluorescenci od nespecifické. Při použití bezglukózového media B jsme nespecifickou fluorescenci nezjišťovali — druhová příslušnost kmenů byla snadno určitelná. Intenzita specifické fluorescence byla vcelku stejná jak na mediu A, tak na mediu B. Další pokusy byly proto uskutečňovány pouze na agarovém mediu B.

I. Vliv media s obsahem glukózy na specifitu nepřímé imunofluorescence — The effect of the medium containing glucose on the specificity of indirect immunofluorescence

Kmeny	Medium A			Medium B		
	antisérum <i>M. hyorhinis</i> BTS7	antisérum <i>M. hyosynoviae</i> A40	bez séra	antisérum <i>M. hyorhinis</i> BTS7	antisérum <i>M. hyosynoviae</i> A40	bez séra
Ne110	+++	+	+	+++	—	—
Ni6	++	+	+	+++	—	—
Tr32	+++	+	+	+++	—	—
S218	++	+	+	+++	—	—
Hers	+++	+	+	+++	—	—
K	++	+	+	++	—	—
BTS7	++	+	+	+++	—	—

— negativní fluorescence
+ slabá fluorescence
++ průměrná fluorescence
+++ ostrá fluorescence

SROVNÁNÍ REAKCE SEDMI TYPOVÝCH KMENŮ *M. hyorhinis* V PŘÍMÉ IF, RI A RP TESTU

Konjugáty, které byly připraveny proti dvěma kmenům *M. hyorhinis* (BTS7 a GDL), reagovaly téměř shodně výraznou fluorescencí se všemi sedmi kmeny (tab. II). Obě séra použitá v RI nebo RP testu naproti tomu diferencovala znatelně tyto kmeny tím, že se u některých nedala jedním či druhým testem dokonce prokázat ani jejich příslušnost k druhu *M. hyorhinis*. Tyto případy převažovaly u RP testu. V RI testu byl opakovaně zaznamenán pouze jeden případ negativního výsledku, tj. kmene Tr32 s antisérem GDL. V dalších čtyřech případech — dvakrát s antisérem BTS7 a dvakrát s antisérem GDL — byly výsledky na hranici pozitivita, kdy velikost inhibiční zóny byla 1,0 až 1,5 mm.

II. Srovnání reakce sedmi typových kmenů *M. hyorhinis* v přímé imunofluorescenci, růstově precipitačním a růstově inhibičním testu – Comparison of the reaction of seven type strains of *M. hyorhinis* in direct immunofluorescence, in the growth-inhibition test, and growth-precipitation test

Kmeny	IF		RI test		RP test	
	BTS7	GDL	BTS7	GDL	BTS7	GDL
Ne110	+++	+++	1,0 ^a	1,0	— ^b	—
Ni6	+++	+++	1,0	2,0	—	—
Tr32	+++	++	3,0	<1,0	1	—
S218	+++	+++	2,5	1,5	1	—
Hers	+++	+++	2,0	2,0	1	1
K	+++	+++	2,5	2,5	1	—
BTS7	+++	+++	4,5	2,5	1	1

^a velikost inhibičních zón v mm

^b počet precipitačních linií

— negativní reakce

++ průměrná fluorescence

+++ ostrá fluorescence

SROVNÁNÍ REAKCE SEDMI TYPOVÝCH KMENŮ *M. hyorhinis* V KŘÍŽOVÉM TESTU POMOCÍ NEPŘÍMÉ IF A RI TESTU

V křížovém testu pomocí nepřímé IF [tab. III] reagovalo všech sedm králičích antisér přibližně stejně intenzivní fluorescencí jak s homologními, tak i s heterologními kmeny. Králičím antisérem proti

III. Srovnání reakce sedmi typových kmenů *M. hyorhinis* v křížovém testu pomocí nepřímé imunofluorescence a růstově inhibičního testu – Comparison of the reaction of seven type strains of *M. hyorhinis* in cross test, with the use of indirect immunofluorescence and growth-inhibition test

Kmeny	IF							RI test ^a						
	Ne110	Ni6	Tr32	S218	Hers	K	BTS7	Ne110	Ni6	Tr32	S218	Hers	K	BTS7
Ne110	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	4,1 ^b	0,5	1,9	2,1	2,1	0,3	1,2
Ni6	+++	++	++	++	++	++	++	1,1	5,4	5,4	1,6	2,9	2,7	0,5
Tr32	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	1,5	4,7	6,2	2,4	2,9	2,5	0,3
S218	+++	++	++	+++	++	++	++	1,3	0,8	0,8	3,6	1,8	0,3	1,2
Hers	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	2,4	1,2	1,5	2,0	4,2	1,0	1,8
K	+++	++	++	++	+++	+++	+++	0,8	1,0	1,3	2,5	1,2	3,0	0,6
BTS7	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	1,6	0,4	2,3	0,6	2,5	0,6	2,5

^a publikováno 1973, Goiš aj.

^b velikost inhibičních zón v mm

++ průměrná fluorescence

+++ ostrá fluorescence

kterémukoliv kmeni *M. hyorhinis* jsme mohli spolehlivě identifikovat všechny testované kmeny *M. hyorhinis*.

Naproti tomu v křížovém RI testu jsme zjišťovali značné rozdíly v inhibici růstu testovaných kmenů. Velikost inhibičních zón se pohybovala v rozmezí 0,3 až 6,2 mm. Všechna antiséra reagovala nejintenzivněji s homologními kmeny. Reakce s heterologními kmeny byly slabé, na hranici positivity až negativní. Např. antigen S218 s antisérem S218 dával inhibiční zónu 3,6 mm, s antiséry Ni6, Tr32 a K dával negativní reakce. Jedním antisérem proti kterémukoliv kmeni *M. hyorhinis* se nedaly jednoznačně určit všechny testované kmeny *M. hyorhinis*.

POROVNÁNÍ REAKCE TERÉNNÍCH KMENŮ *M. hyorhinis* V PŘÍMÉ IF, NEPŘÍMÉ IF, RI A RP TESTU

Terénní kmeny byly identifikovány RI a RP testem a přímou a nepřímou IF. K jejich určení byla použita čtyři antiséra proti kmenům *M. hyorhinis* (tab. IV). V RI nebo RP testu nereagovalo pozitivně se všemi testovanými terénními kmeny *M. hyorhinis* ani jedno z aplikovaných králíčích antisér. Jeden z kmenů — LU 57 — např. nereagoval se třemi ze čtyř použitých antisér v RI a RP testu. V menší míře vykazovaly nízkou nebo nulovou pozitivitu i další kmeny.

Stejná séra v nepřímé IF dávala však jednoznačně pozitivní výsledky se všemi vyšetřovanými terénními kmeny.

IV. Porovnání reakce terénních kmenů *M. hyorhinis* v nepřímé imunofluorescenci, růstově inhibičním a růstově precipitačním testu — Comparison of the reaction of the field strains of *M. hyorhinis* in indirect immunofluorescence, growth inhibition test, and growth-precipitation test

Kmeny	IF				RI test				RP test			
	Ni6	Tr32	S218	K	Ni6	Tr32	S218	K	Ni6	Tr32	S218	K
SU 3	+++	++	++	+++	1,5 ^a	2,0	1,5	1,5	1 ^b	1	1	1
SU 4	++	+++	++	++	2,0	3,5	1,5	<1,0	1	1	—	—
SU 5	+++	+++	++	+++	2,5	4,5	2,5	<1,0	—	1	1	1
SU 6	+++	+++	++	+++	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
SU 8	+++	+++	++	+++	<1,0	2,0	<1,0	<1,0	—	1	1	1
LY 1	+++	++	++	+++	3,5	<1,0	2,0	3,0	1	1	1	1
LU 57	++	+++	+++	+++	<1,0	<1,0	1,5	<1,0	—	—	1	—
LA 1	+++	+++	++	++	NT	3,0	2,5	NT	NT	1	1	NT
KLA2	++	++	++	++	1,5	2,0	2,5	1,5	1	1	1	1
KLA3	++	++	++	++	<1,0	2,0	<1,0	2,5	1	1	1	1
JAS 2	+++	++	+++	+++	3,5	2,0	2,5	2,0	1	1	1	1
VÍ 7	+++	+++	+++	+++	3,5	3,0	3,5	4,5	—	—	—	—

++ průměrná fluorescence
+++ ostrá fluorescence

^a velikost zóny v mm
^b počet precipitačních linií

NT netestováno
— negativní reakce

Podobně v přímé IF, kde byly použity konjugáty proti kmenům *M. hyorhinis* BTS7 a GDL, bylo možné všechny terénní kmeny spolehlivě identifikovat jako *M. hyorhinis* (tab. V).

V. Identifikace terénních kmenů *M. hyorhinis* přímou imunofluorescencí — Identification of the field strains of *M. hyorhinis* by direct immunofluorescence

Kmeny	Konjugát proti <i>M. hyorhinis</i>	
	BTS7	GDL
SU 3	++	++
SU 4	+++	++
SU 5	+++	+++
SU 6	+++	+++
SU 8	+++	+++
LY 1	+++	+++
LU 57	+++	++
LA 1	+++	+++
KLA 2	++	++
KLA 3	++	++
JAS 2	+++	++
VÍ 7	+++	+++

++ průměrná fluorescence

+++ ostrá fluorescence

DISKUSE

Enormě vysoká frekvence výskytu *Mycoplasma hyorhinis* v respiračních cestách prasat (Goiš aj., 1974) nutí každou laboratoř, která se zabývá diagnostikou porcinních mykoplazmat, aby druh *M. hyorhinis* byla schopna bezpečně prokázat.

Nejběžnějšími technikami jsou RI test (Clyde, 1964), MI test (Taylor — Robinson aj., 1966), RP test (Krogsgaard — Jensen, 1972). Posledně jmenovaný test jsme na základě dřívějších sledování (Goiš a Kuksa, 1975) zařadili jako stabilní diagnostickou pomůcku. Ani RP testem jsme však nepřeklenuli problémy související s antigenní variabilitou typových kmenů *M. hyorhinis*, na kterou jsme již poukázali v dřívější práci (Goiš aj., 1973). Antigenní rozdíly jsme prokazovali několika sérologickými křížově aplikovanými technikami. Nutnost použití více diagnostických sér téhož druhu komplikovala a zpomalovala identifikaci druhu *M. hiorhinis* (Goiš aj., 1973).

Výsledky mnoha prací (Delgiudice aj., 1969; Baas a Jasper, 1972; Lehmkuhl a Frey, 1974) jsou shodné v tom, že IF technika je jedním z nejspolehlivějších postupů, jak diagnostikovat izolované mykoplazmové druhy.

Barile a Delgiudice (1972), Rosendal a Black (1972) a jiní doporučují prokazovat mykoplazmové kolonie tzv. epi-imuno-

fluorescenci, pomocí níž je možno identifikovat mykoplazmové kolonie přímo na povrchu agarů, na nichž vyrostly.

Epi-imunofluorescence se v našich rukou ukázala jako vhodný způsob pro určování druhu *M. hyorhinis*. Ke srovnávacím pokusům jsme kultivovali kmeny na agarovém mediu A a B. Specifická fluorescence na mediu A byla provázena značnou nespecifickou fluorescencí mykoplazmových kolonií. Za možnou příčinu nespecifické fluorescence jsme považovali okyselující štěpné produkty glukózy, které mohly způsobit zvýšenou afinitu fluoresceinu na agarové prostředí.

Na rozdíl od RI a RP testu jsme při přímé i nepřímé IF neshledávali diagnostické výkyvy při identifikacích mykoplazmových kmenů. Antisérum připravené proti kterémukoliv typovému kmeni, se kterým pracujeme, spolehlivě reagovalo jak s homologními, tak s heterologními typovými i terénními kmeny.

Epi-imunofluorescence může být proto označena za rychlejší a spolehlivější diagnostickou metodu mykoplazmových druhů v porovnání s RI a RP testy.

Literatura

BAAS, E. J. — JASPER, D. E.: Agar block technique for identification of mycoplasmas by use of fluorescent antibody. *Appl. Microbiol.*, 23, 1972, s. 1097-1100.

BARILE, M. F. — DELGIUDICE, R. A.: Isolations of mycoplasmas and their rapid identification by plate epi-immunofluorescence. *A Ciba Foundation Symposium* (25-27 January), published by ASP, Amsterdam, 1972, s. 165-185.

CLARK, H. W. — BAILEY, J. S. — FOWLER, R. C. — BROWN, T. M.: Identification of *Mycoplasmataceae* by the fluorescent antibody method. *J. Bacteriol.*, 85, 1963, s. 111-117.

CLYDE, W. A.: Mycoplasma species identification based upon growth inhibition by specific antisera. *J. Immun.*, 92, 1964, s. 958-965.

DELGIUDICE, R. A. — CARSKI, T. R. — BARILE, M. F. — YAMASHIROYA, H. M. — VERNER, J. E.: Recovery of human mycoplasmas from simian tissues. *Nature (Lond.)*, 222, 1969, s. 1088-1089.

DINTER, Z. — TAYLOR-ROBINSON, D.: Susceptibility and resistance of various strains of *Mycoplasma hyorhinis* to antisera, polymyxins and low pH values. *J. gen. Microbiol.*, 57, 1969, s. 263-272.

FRIIS, N. F.: *Mycoplasma suis* pneumoniae and *Mycoplasma flocculare* in the growth precipitation test. *Acta vet. scand.*, 18, 1977, s. 168-175.

GOIŠ, M.: Kultivace mykoplasmat z plíc prasat. *Vet. Med.*, Praha, 12, 1967, s. 331-338.

GOIŠ, M.: Serological response of pigs to infection with *Mycoplasma*. Demonstration of growth and metabolism-inhibiting antibodies in sera of pigs inoculated intranasally with *Mycoplasma hyorhinis*. *Zentbl. VetMed.*, B 15, 1968, s. 382-391.

GOIŠ, M. — POSPÍŠIL, M. — FRANZ, J. — ČERNÝ, M. — KUKSA, F. — POKORNÝ, J.: A study on the pathogenicity and immune response in gnotobiotic piglets after infection with *Mycoplasma hyorhinis*. *Acta vet. Brno, Suppl.* 2, 1971, s. 51-58.

GOIŠ, M. — KUKSA, F. — FRANZ, J. — TAYLOR-ROBINSON, D.: The antigenic differentiation of seven strains of *Mycoplasma hyorhinis* by growth inhibition, metabolism-inhibition, latex-agglutination, and polyacrylamide-gel-electrophoresis tests. *J. med. Microbiol.*, 7, 1973, s. 105-115.

GOIŠ, M. — KUKSA, F.: Intranasal infection of gnotobiotic piglets with *Mycoplasma hyorhinis*: Differences in virulence of the strains and virulence of age on the development of infection. *Zentbl. VetMed.*, 21, 1974, s. 352-361.

GOIŠ, M. — ŠIŠÁK, F. — KUKSA, F. — SOVADINA, M.: Incidence and evaluation of the microbial flora in the lungs of pigs with enzootic pneumonia. *Zentbl. VetMed.*, B 22, 1974, s. 205-219.

GOIŠ, M. — KUKSA, F.: Diagnosis and differentiation of porcine mycoplasmas by the growth-precipitation test. *Zentbl. VetMed.*, B 22, 1975, s. 850-855.

KROSGAARD-JENSEN, A.: Mycoplasma: Growth precipitation as a serodiagnostic method. Appl. Microbiol., 23, 1972, s. 553-558.

LEHMKUHL, H. D. — FREY, M. L.: Immunofluorescent identification of mycoplasma colonies growth on agar-covered glass slides. Appl. Microbiol., 27, 1974, s. 1170-1171.

ROSENDAL, S. — BLACK, F. T.: Direct and indirect immunofluorescence of unfixed and fixed mycoplasma colonies. Acta path. microbiol. scand., B 80, 1972, s. 615-622.

TAYLOR-ROBINSON, D. — PURCELL, D. C. — WONG, D. C. — CHANOCK, R. M.: A colour test for the measurement of antibody to certain Mycoplasma species based upon the inhibition of acid production. J. Hyg., Camb., 64, 1966, s. 91-104.

Došlo dne 9. 6. 1978

ЖИЖКОВА, П. — ГОИШ, М. — КУКСА, Ф. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): Идентификация некоторых свинных микоплазм с помощью эпи-иммунофлюоресценции. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 521-530.

В работе сравнивается реактивность типовых и местных штаммов *Mycoplasma hyorhinis* в эпи-иммунофлюоресценции, в ростово-ингибиционном и ростово-преципитатном тестах. Типовые штаммы наряду с местными штаммами удалось надежно идентифицировать путем непосредственной и косвенной эпи-иммунофлюоресценции, во втором случае все испытанные нами кроличьи антисыворотки по отношению к штаммам *M. hyorhinis* в перекрестном порядке всегда имели положительную реакцию со всеми исследованными штаммами *M. hyorhinis*. В противоположность тому, в перекрестном ростово-ингибиционном и ростово-преципитатном тестах, типовые штаммы *M. hyorhinis* всегда положительно реагировали только на гомологичные антисыворотки, гетерологические же реакции во многих случаях были отрицательные или сомнительные. Из однозначно положительных реакций в эпи-иммунофлюоресценции к сывороткам против любого штамма *M. hyorhinis* можно установить, что этот метод более пригоден для идентификации микоплазмозных видов, чем два других испытываемых теста.

Mycoplasma hyorhinis; ростово-ингибиционный тест; ростово-преципитатный тест

ŽIŽKOVÁ, P. — GOIŠ, M. — KUKSA, F. (Veterinary Research Institute, Brno): The Epi-immunofluorescent Identification of Some Porcine Mycoplasmas. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 521-530.

The responses of the field strains and type strains of *Mycoplasma hyorhinis* are compared in epi-immunofluorescence, in growth-inhibition tests, and growth-precipitation tests. The type strains, together with the field strains, could be definitely identified by direct and indirect epi-immunofluorescence. In indirect epi-immunofluorescence, all rabbit antisera against the strains of *Mycoplasma hyorhinis* tested by us always gave positive cross reactions with all the tested strains of *Mycoplasma hyorhinis*. On the other hand, in the growth-inhibition cross test and growth-precipitation cross test, the type strains of *Mycoplasma hyorhinis* always reacted positively only with the homologous antisera, whereas the heterologous reactions were mostly negative or dubious. The clearly positive epi-immunofluorescent reactions with sera against any strain of *Mycoplasma hyorhinis* suggest that this method is more suitable for the identification of Mycoplasma species than the other two tests studied.

Mycoplasma hyorhinis; growth-inhibition test; growth-precipitation test

ŽIŽKOVÁ, P. — GOIŠ, M. — KUKSA, F. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): Identifizierung einiger porciner Mykoplasmen mit Hilfe der Epi-Immunofluoreszenz. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 521-530.

In der vorliegenden Arbeit vergleichen wir die Reaktivität von *Mycoplasma-hyorhinis*-Typen- und Terrainstämmen in Epi-Immunofluoreszenz, und zwar beim Wachstumsinhibitions- und Wachstumspräzipitationstest. Die Typenstämmen zusammen mit den Terrainstämmen konnten verlässlich mit Hilfe der direkten und auch der

indirekten Epi-Immunofluoreszenz indentifiziert werden. Bei der indirekten Epi-Immunofluoreszenz gaben alle geprüften Kaninchen-Antisera gegen *Mycoplasma-hyorhinis* kreuzweise stets positive Reaktionen mit allen untersuchten *Mycoplasma-hyorhinis*-Stämmen. Demgegenüber reagierten beim kreuzweisen Wachstumsinhibitions- und Wachstumspräzipitationstest die *Mycoplasma-hyorhinis*-Typenstämme stets positiv nur mit homologen Antiseren, während die heterologen Reaktionen in zahlreichen Fällen negativ oder dubiös waren. Aus den eindeutig positiven Reaktionen in Epi-Immunofluoreszenz mit Seren gegen jedweden *Mycoplasma-hyorhinis*-Stamm läßt sich schließen, daß diese Methode zur Identifizierung von Mycoplasmaarten geeigneter ist als die weiteren zwei gerpüften Teste.

Mycoplasma hyorhinis; Wachstumsinhibitionstest; Wachstumspräzipitationstest

Adresa autorů:

Pavla Žižková, MVDr. Milan Goiš, CSc., MVDr. František Kuksa, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno-Medlánky

F. Šišák, M. Goiš, F. Kukša

ŠIŠÁK, F. — GOIŠ, M. — KUKŠA, F. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): Citlivost kmenů *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* a *Mycoplasma hyorhinis* izolovaných z prasat k antibiotikům a chemoterapeutikům. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 531-540.

Plotnovým difúzním testem jsme zjišťovali citlivost k 15 antibiotikům a chemoterapeutikům u 76 kmenů *B. bronchiseptica*, 232 kmenů *P. multocida* a 104 kmenů *M. hyorhinis* izolovaných z prasat v chovech postižených sítavkou a enzootickou pneumónií. V kvalitativním testu citlivosti byly kmeny *B. bronchiseptica* citlivé ke gentamycinu (100,00 %), chloramfenikolu (94,75 %), kanamycinu (80,20 %), kolistinu (96,10 %), neomycinu (100,00 %), polymyxinu (100,00 %) a tetracyklinu (90,80 %). Nízká citlivost byla k erythromycinu (65,80 %) a sulfamethoxydinu (18,40 %). Všechny kmeny byly rezistentní k ampicilinu, bacitracinu, furadantinu, oxacilinu, penicilinu a streptomycinu. Kmeny *P. multocida* byly citlivé k ampicilinu (94,40 %), erythromycinu (80,95 %), furadantinu (94,40 %), gentamycinu (100,00 %), chloramfenikolu (100,00 %), kanamycinu (88,00 %), kolistinu (81,45 %), neomycinu (82,30 %), penicilinu (79,30 %), polymyxinu (87,50 %) a tetracyklinu (90,50 %). Nízká citlivost byla k bacitracinu (15,50 %), oxacilinu (21,10 %) a streptomycinu (24,10 %). Všechny kmeny byly rezistentní k sulfamethoxydinu. Kmeny *M. hyorhinis* byly citlivé k furadantinu, gentamycinu, chloramfenikolu, kanamycinu, neomycinu a tetracyklinu, zatím co k ampicilinu, bacitracinu, erythromycinu, kolistinu, oxacilinu, penicilinu, polymyxinu, streptomycinu a sulfamethoxydinu byly rezistentní. U deseti kmenů *B. bronchiseptica* a *P. multocida* byla stanovena plotnovým dilučním testem antimikrobiální aktivity k pěti preparátům a byla vyjádřena hodnotami minimální inhibiční koncentrace (MIC). Kmeny *B. bronchiseptica* byly vysoce citlivé ke gentamycinu, ale méně citlivé ke chloramfenikolu a tetracyklinu, kde byly již vyšší hodnoty MIC. U sulfamethoxydinu a tytanu se MIC pohybovaly v hodnotách rezistence. Kmeny *P. multocida* byly vysoce citlivé ke gentamycinu a dobře citlivé ke chloramfenikolu a tetracyklinu. U sulfamethoxydinu a tytanu se MIC pohybovaly v hodnotách rezistence. Zjištěné výsledky jsou podrobněji rozebrány v diskusi.

plotnový difúzní test; MIC; sítavka; enzootická pneumonie prasat

Etiologie a patogenéza sítavky prasat se v poslední době studuje především ve vztahu k *B. bronchiseptica*. Má se za to, že *B. bronchiseptica* je nejčastějším původcem chronického zánětu nosních dutin a nosohltanu u selat v raném věku, který vyústí v atrofii nosních skřep a v deviaci nosní přepážky (Harris a Switzer, 1968; Kameny, 1972; Logomarsino aj., 1974; Nakagawa aj., 1974; Brassinne aj., 1976; Goiš aj., 1977). V některých případech je *B. bronchiseptica* i původcem pneumonií u selat (Meyer a Beamer,

1973)]. Na rozvoji enzootické pneumonie prasat (EPP) participují velmi často dva bakteriální druhy — *P. multocida* a *M. hyorhinis* (Goiš aj., 1975).

Cílem naší práce je podat informaci o citlivosti *in vitro* kmenů *B. bronchiseptica*, *P. multocida* a *M. hyorhinis* k antibiotikům a chemoterapeutikům, izolovaných z chovů postižených sítavkou a EPP.

MATERIÁL A METODY

V letech 1974 až 1976 jsme z chovů postižených sítavkou a EPP izolovali z nosní sliznice a plic prasat 76 kmenů *B. bronchiseptica*, 232 kmeny *P. multocida* a 104 kmeny *M. hyorhinis*. Kmeny *B. bronchiseptica*, zachycené na modifikovaném Mac Conkey agaru (Switzer a Farrington, 1972), a *P. multocida*, izolované na krevním agaru, byly identifikovány standardními mikrobiologickými metodami (Cowan, 1974).

Izoláty mykoplazmat, zachycené na tekutých médiích již dříve popsanou technikou (Goiš aj., 1975), byly typizovány růstové inhibičním testem (Clyde, 1964) a metabolismus inhibičním testem (Taylor-Robinson aj., 1966).

Ke stanovení citlivosti izolovaných mikroorganismů plotnovým difúzním testem bylo použito disků Lachema. Kmeny *B. bronchiseptica* a *P. multocida* byly kultivovány 24 h při teplotě 37 °C na DST agaru Oxoid. Inhibiční zóny byly měřeny standardním způsobem (Výmola aj., 1963). Testované kmeny *M. hyorhinis* byly ředěny 10² a kultivovány na PPLO agaru Difco. Inhibice růstu testovaných kmenů mykoplazmat byla hodnocena mikroskopicky za 48 až 72 h inkubace při teplotě 37 °C.

U deseti kmenů *B. bronchiseptica* a *P. multocida* byly stanoveny plotnovým dilučním testem (Výmola a Hejzlar, 1964) minimální inhibiční koncentrace (MIC) k těmto preparátům: Gentamycin Pharmachim, Chloramphenicol SPOFA, Sulfamethoxydin SPOFA, Tetracyklin SPOFA a Tylan 50 ELANCO.

VÝSLEDKY

V kvalitativním testu citlivosti bylo všech 76 kmenů *B. bronchiseptica* velmi dobře citlivých ke gentamycinu (tab. I). Většina kmenů byla citlivá ke chloramfenikolu, kanamycinu, kolistinu, neomycinu, polymyxinu a tetracyklinu. Nízká citlivost byla k erythromycinu a sulfamethoxydinu. Všechny kmeny byly rezistentní k ampicilinu, bacitracinu, furadantinu, oxacilinu, penicilinu a streptomycinu.

V antibiogramu 232 kmenů *P. multocida* (tab. II) byly všechny kmeny dobře citlivé ke gentamycinu. Většina kmenů byla citlivá k ampicilinu, erythromycinu, furadantinu, chloramfenikolu, kanamycinu, kolistinu, neomycinu, penicilinu, polymyxinu, tetracyklinu. Nízká citlivost byla k bacitracinu, oxacilinu a streptomycinu, zatím co k sulfamethoxydinu byly všechny kmeny rezistentní.

Největší citlivost u 104 vyšetřovaných kmenů *M. hyorhinis* byla k furadantinu, gentamycinu, chloramfenikolu, kanamycinu, neomycinu a tetracyklinu (tab. III). Testované kmeny mykoplazmat byly však rezistentní k ampicilinu, bacitracinu, erythromycinu, kolistinu, oxacilinu, penicilinu, polymyxinu, streptomycinu a sulfamethoxydinu.

Antimikrobiální aktivita pěti testovaných preparátů (tab. IV), vyjádřená hodnotami MIC, ukázala, že všechny kmeny *B. bronchiseptica* byly dobře citlivé ke gentamycinu, zatím co u chloramfenikolu a tetracyklinu byly vyšší hodnoty MIC, které se v případě chloramfenikolu pohybovaly u některých kmenů až v rozmezí rezistence. U sulfamethoxy-

I. Citlivost 76 kmenů *B. bronchiseptica* k antibiotikům a chemoterapeutikům v kvalitativním testu — The sensitivity of 76 strains of *B. bronchiseptica* to antibiotics and chemotherapeutics in the qualitative test

Disk	Dobře citlivý počet (%)	Citlivý počet (%)	Rezistentní počet (%)
Ampicilin 20 µg	0 (0)	0 (0)	76 (100,00)
Bacitracin 10 m. j.	0 (0)	0 (0)	76 (100,00)
Erythromycin 10 µg	12 (15,80)	38 (50,00)	26 (34,20)
Furadantin 100 µg	0 (0)	0 (0)	76 (100,00)
Gentamycin 20 µg	76 (100,00)	0 (0)	0 (0)
Chloramfenikol 30 µg	54 (71,05)	18 (23,70)	4 (5,25)
Kanamycin 30 µg	34 (44,70)	27 (35,50)	15 (19,80)
Kolistin 50 µg	61 (80,30)	12 (15,80)	3 (3,90)
Neomycin 30 µg	55 (72,40)	21 (27,60)	0 (0)
Oxacilin 15 µg	0 (0)	0 (0)	76 (100,00)
Penicilin 10 m. j.	0 (0)	0 (0)	76 (100,00)
Polymyxin B 100 m. j.	68 (89,50)	8 (10,50)	0 (0)
Streptomycin 30 µg	0	0	76 (100,00)
Sulfamethoxydin 300 µg	14 (18,40)	0	62 (81,60)
Tetracyklin 30 µg	51 (67,10)	18 (23,70)	7 (9,20)

II. Citlivost 232 kmenů *P. multocida* k antibiotikům a chemoterapeutikům v kvalitativním testu — The sensitivity of 232 strains of *P. multocida* to antibiotics and chemotherapeutics in the qualitative test

Disk	Dobře citlivý počet (%)	Citlivý počet (%)	Rezistentní počet (%)
Ampicilin 20 µg	178 (76,70)	41 (17,70)	13 (5,60)
Bacitracin 10 m. j.	0 (0)	36 (15,50)	196 (84,50)
Erythromycin 10 µg	179 (77,15)	32 (13,80)	21 (9,05)
Furadantin 100 µg	181 (78,00)	38 (16,40)	13 (5,60)
Gentamycin 20 µg	232 (100,00)	0 (0)	0 (0)
Chloramfenikol 30 µg	211 (90,95)	21 (9,05)	0 (0)
Kanamycin 30 µg	173 (74,60)	31 (13,40)	28 (12,00)
Kolistin 50 µg	166 (71,55)	23 (9,90)	43 (18,55)
Neomycin 30 µg	113 (48,70)	78 (33,60)	41 (17,70)
Oxacilin 15 µg	0 (0)	49 (21,10)	183 (78,90)
Penicilin 10 m. j.	51 (22,00)	133 (57,30)	48 (20,70)
Polymyxin B 100 m. j.	157 (67,70)	46 (19,80)	29 (12,50)
Streptomycin 30 µg	0 (0)	56 (24,10)	176 (75,90)
Sulfamethoxydin 300 µg	0 (0)	0 (0)	232 (100,00)
Tetracyklin 30 µg	148 (63,80)	62 (26,70)	22 (9,50)

III. Citlivost 104 kmenů *M. hyorhinis* k antibiotikům a chemoterapeutikům v kvalitativním testu — The sensitivity of 104 strains of *M. hyorhinis* to antibiotics and chemotherapeutics in the qualitative test

Disk	Průměrné hodnoty inhibičních zón v mm														
Ampicilin 20 μ g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacitracin 10 m. j.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Erythromycin 10 μ g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Furadantin 100 μ g	18,7	20,6	15,3	18,7	17,5	14,1	17,5	16,1	14,2	16,0	15	18,5	16,9	15,0	17,3
Gentamycin 20 μ g	NT	NT	19,3	15,4	12,0	12,2	14,0	14,8	10,8	15,9	15	17,0	14,5	18,1	19,0
Chloramfenikol 30 μ g	20,1	20,6	20,6	18,6	18,0	17,0	17,8	16,8	10,4	14,3	15	16,2	17,5	16,5	18,0
Kanamycin 30 μ g	21,9	17,6	19,3	20,6	18,1	17,1	17,1	15,1	12,4	16,6	18	18,0	16,5	17,0	21,0
Kolistin 50 μ g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Neomycin 30 μ g	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	8,8	10,6	9	9,5	NT	NT	NT
Oxacilin 15 μ g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Penicilin 10 m. j.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Polymyxin B 100 m. j.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Streptomycin 30 μ g	0	0	0	5,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sulfamethoxydin 300 μ g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tetracyklin 30 μ g	18,4	13,0	10,6	14,5	10,8	12,51	16,7	11,0	8,4	12,6	15	15,0	11,5	12,0	13,6
Počet vyšetřovaných kmenů	17	3	3	12	12	7	8	16	5	3	1	4	4	6	3

NT nevyšetřováno

Preparát	MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	
Gentamycin Pharmachim	0,125 — 1	0,03 — 0,5
Chloramphenicol SPOFA	32 — 128	1 — 8
Sulfamethoxydin SPOFA	128 — 256	128 — 256
Tetracyklin SPOFA	8 — 64	4 — 16
Tylan 50 ELANCO	64 — 256	64 — 128
Testované mikroorganismy:	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>P. multocida</i>

dinu a tylanu se MIC pohybovaly v hodnotách dosažitelných koncentrací. Rovněž všechny kmeny *P. multocida* byly vysoce citlivé ke gentamycinu a dobře citlivé ke chloramfenikolu a tetracyklinu. U sulfamethoxydinu a tylanu byly zjištěny MIC, které byly na hranici rezistence.

DISKUSE

Práce navazuje v určitém směru na naše dřívější sledování, v němž jsme prokázali, že výskyt mikroorganismů podílejících se na vzniku a vývoji sípavky a EPP lze v dýchacích cestách selat ovlivnit výplachy nosních dutin prasnic před porodem vhodně volenými antibiotiky a chemoterapeutiky. V chovu byla kromě toho ještě uplatňována i hygienic-ko-organizační opatření (Goiš aj., 1976).

Masově rozšířené používání antibiotik a chemoterapeutik ve velkochovech zvířat však podporuje růst rezistence mikroorganismů k antibiotikům a chemoterapeutikům, která je závažnou překážkou v likvidaci stájových nákaz a nese s sebou i nebezpečí zněhodnocení jejich terapeutického účinku pro lidskou populaci (Krčméry aj., 1974). Je zřejmé, že souběžně s používáním antibiotik a některých chemoterapeutik nabývají mikroorganismy na odolnosti i k těm preparátům, které jsou dosud účinné. Zjistili jsme, že pouze 18,40 % kmenů *B. bronchiseptica* testovaných diskovou metodou bylo dobře citlivých k sulfamethoxydinu, zatím co kmeny *P. multocida* a *M. hyorhinis* byly úplně všechny rezistentní. Rovněž Harris aj. (1969), na rozdíl od dřívějšího sledování (Switzer, 1963), zjistili, že 80 % kmenů *B. bronchiseptica* izolovaných z 25 chovů v USA bylo rezistentních k sulfamethazinu. Azechi aj. (1973) v Japonsku zjistili, že z 61 testovaného kmene *B. bronchiseptica* bylo 11,5 % kmenů rezistentních k sulfonamidům.

Všechny testované mikroorganismy byly vysoce citlivé ke gentamycinu, který je jedním z neúčinnějších širokospektrých antibiotik.

Jako velmi účinný proti *B. bronchiseptica*, *P. multocida* i *M. hyorhinis* se ukázal chloramfenikol, jehož používání ve výkrmu zvířat bylo v USA a v některých dalších státech zakázáno (Rankin, 1975).

Rovněž k tetracyklinu jsme zjistili vysokou citlivost u všech testovaných kmenů. De Jong a Oosterwoud (1977) uvádějí, že po

zkrmování medikovaného krmiva oxytetracyklinem v období osmi týdnů poklesl klinický výskyt sípavky a EPP z 30 % na 0 %, dočasně se také snížila izolace *B. bronchiseptica* a *P. multocida*.

Velmi nás zajímala citlivost testovaných mikroorganismů k tylosinu, který je v ČSSR základním antibiotikem k medikaci krmných směsí pro selata (Plhal, 1977). Zjistili jsme, že citlivost deseti kmenů *B. bronchiseptica* a *P. multocida* byla k tylanu v kvantitativním testu citlivosti značně nízká. Tomuto zjištění odpovídají nálezy Drewse aj. (1975), kteří prokázali v kvantitativním testu citlivosti, že tylosin tartarát byl k *P. multocida* neúčinný a růst čtyř testovaných kmenů *M. hyorhinis* byl inhibován až ve vyšších koncentracích. V technické informaci firmy ELANCO je uvedena MIC tylosinu pouze pro *B. bronchiseptica*, která je vyšší než $100 \mu\text{g ml}^{-1}$. Zprávy o klinickém hodnocení účinnosti tylanu při tlumení sípavky a EPP jsou rozdílné. Mnoho autorů (Sander, 1972; Schuller a Schlerka, 1972; Čáslavka aj., 1973; Ševčík aj., 1974; Reichel aj., 1975) považuje tylan samotný nebo v kombinaci s některými sulfonamidy za účinný prostředek ke snižování ztrát způsobených sípavkou a EPP. Autoři se shodují i v názoru, že tylan má široké indikační použití, protože zvyšuje přírůstky hmotnosti a snižuje ztráty na selatech vyvolané stájovými nákazami.

Škaloud aj. (1975) zjistili, že přípravek Neomix SPOFA (tylosin + Sulfadimidin) při porovnání účinnosti s jinými preparáty vedl k výraznému zvýšení přírůstků hmotnosti, ke snížení úhynů selat a k částečnému snížení výskytu sípavky ve dvou sledovaných chovech s nízkou úrovní zoohygieny. Domnívají se však, že testované preparáty podávané v krmivu by sotva mohly touto cestou likvidovat sípavku. K podobným výsledkům dospěl ve Velké Británii i Morrish (1975) a další. Naproti tomu Urbanová aj. (1975) neprokázali, že by aplikace tylanu vedla ke statisticky významnému snížení výskytu sípavky, incidence pneumonií a úhynů do 50 dnů života. Dále zjistili, že teprve od věku 56 dnů vedl tylan program k výraznému zvyšování hmotnosti proti kontrolním skupinám selat. Sami jsme rovněž nezaznamenali (Gois aj., 1978) ve dvou sledovaných chovech prasat, kde byl zaveden tylan program, výraznější snížení počtů RTG pozitivních zvířat. V léčených populacích jsme kromě toho prokazovali vysokou frekvenci výskytu *B. bronchiseptica* a *P. multocida*. Tylan má zřejmě omezenou bakteriální aktivitu proti oběma bakteriálním druhům, které jsou pokládány za významné původce sípavky prasat. Rozdílné výsledky v klinickém hodnocení účinnosti tylanu jsou dány i skutečností, že jak rozvoj sípavky, tak i EPP se děje za podmínek polybakteriálního působení. Přes složitost kauzality respiračního syndromu, komplikovaného často i dalšími nakažovými problémy, nelze upustit od úsilí, v němž musí být uplatňována antibiotika a chemoterapeutika specifičtěji než doposud. Léčebné nebo preventivní podání antimikrobiálních prostředků má svoje aplikační vymezení. V chovech prasat postižených těžkými hromadnými onemocněními dýchadel je mnohdy nezbytné sáhnout k antimikrobiálním prostředkům, které, jak jsme již podotkli, musí být cíleně voleny. Takové zásahy umožňují prokazatelně snížit přímé i nepřímé ztráty způsobené hromadnou nemocností prasat. Tyto léčebné zásahy, které si mnohdy vyžadují permanentní podávání antibakteriálních prostředků, však neposkytují záruky, že nákazy budou z chovu eliminovány, a nemohou mít proto ani

širší programový význam. Vyšší zdravotní úroveň, především ve velkochovech prasat, bude možná jen cestou komplexních ozdravovacích postupů, jejichž principy jsme již formulovali (Goiš aj., 1978). Opírají se o mikrobiologické depistáže dýchacích cest, desinfekci a výplachy nosních dutin prasníc před porodem a o pasivní nebo aktivní imunizaci proti některým mikroorganismům. První výsledky již naznačily, že touto cestou bude možné dlouhodobě stabilizovat zdravotní stav v těch chovech prasat, kde jsou opatření systematicky uplatňována.

Poděkování: Za technickou spolupráci děkujeme J. Kačírkové, H. Goišové a P. Žizkové.

Literatura

- AZECHI, H. — KYOAMA, N. — TERAOKA, N.: Sensitivity *in vitro* to Antibacterial Drugs of *Bordetella bronchiseptica* Isolated from Swine. J. Jap. vet. med. Ass., 26, 1973, s. 75-79.
- BRASSINNE, M. — DEWAELE, A. — GOUFFAUX, M. Intranasal infection with *Bordetella bronchiseptica* in gnotobiotic piglets. Res. vet. Sci., 20, 1976, s. 162-166.
- CLYDE, W. A.: Mycoplasma species identification based upon growth inhibition by specific antisera. J. Immun., 92, 1964, s. 958-965.
- COWAN, S. T.: Manual for the Identification of Medical Bacteria. 2. ed. Cambridge, Cambridge University Press 1974, 238 s.
- ČASLAVKA, J. — HOMOLA, L. — REICHEL, F.: Využití kombinace Tylosinu a sulfamidinu v chovech prasat. Spofa, informační zprávy pro veter. a zem. praxi, 1973, č. 2, s. 13-15.
- DE JONG, M. F. — OOSTERWOUD, R. A.: Behandeling van de jonge big met oxytetracycline-HCl ter preventie van Atrofische rhinitis. Tijdschr. Diergeneesk., 102, 1977, s. 266-273.
- DREWS, J. — GEORGOPOULOS, A. — LABER, G. — SCHÜTZE, E. — UNGER, J.: Antimicrobial Activities of 81. 723 hf, a New Pleuromutilin Derivative. Antimicrob. Agents Chemother., 7, 1975, s. 507-516.
- ELANCO Abt. der Eli Lilly GmbH. — BAD HOMBURG: Technische Information Tylosin FZ 100. (B. r.). 52 s.
- GOIŠ, M. — ŠIŠÁK, F. — KUKSA, F. — SOVADINA, M.: Incidence and evaluation of the microbial flora in the lungs of pigs with enzootic pneumonia. Zentbl. VetMed., B, 22, 1975, s. 205-219.
- GOIŠ, M. — ŠIŠÁK, F. — KUKSA, F. — ROŽEK, F. — VĚŽNÍKOVÁ, D.: Ovlivnění mikrobiální flóry v dýchacích cestách selat ošetřením prasníc před porodem. Veterinářství, 26, 1976, s. 462-466.
- GOIŠ, M. — KUKSA, F. — ŠIŠÁK, F.: Experimental Infection of Gnotobiotic Piglets with *Mycoplasma hyorhinis* and *Bordetella bronchiseptica*. Zentbl. VetMed., B, 24, 1977, s. 89-96.
- GOIŠ, M. — ŠIŠÁK, F. — KUKSA, F. — MESÁROŠ, E.: Dílčí zkušenosti s tlumením sipavky prasat v chovech, kde byla uplatněna hygienicko-organizační opatření a vakcinace proti *Bordetella bronchiseptica*. Veterinářství, 1978 (v tisku).
- HARRIS, D. L. — SWITZER, W. P.: Turbinate atrophy in young pigs exposed to *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* and combined inoculum. Am. J. vet. Res., 29, 1968, s. 777-785.
- HARRIS, D. L. — ROSS, R. F. — SWITZER, W. P.: Incidence of Certain Microorganisms in Nasal Cavities of Swine in Iowa. Am. J. vet. Res., 30, 1969, s. 1621-1624.
- KEMENY, L. J.: Experimental atrophic rhinitis produced by *Bordetella bronchiseptica* culture in young pigs. Cornell Vet., 62, 1972, s. 477-485.
- KRČMÉRY, V. — VÝMOLA, F. — VACEK, V.: Rezistencia na antibiotiká v teorii a klinické praxi. 1. vyd. Martin, Vydavatelstvo Osveta 1974, 407 s.
- LOGOMARSINO, I. V. — POND, W. G. — SHEFFY, B. E. — KROOK, L.: Turbinate morphology in pigs inoculated with *Bordetella bronchiseptica* and fed high or low calcium diets. Cornell Vet., 64, 1974, s. 573-583.

- MEYER, R. C. — BEAMER, P. D.: *Bordetella bronchiseptica* infections in germ-free swine: An experimental pneumonia. Vet. Path., 10, 1973, s. 550-556.
- MORRISH, J. S. H.: Treatment of atrophic rhinitis. Vet. Rec., 97, 1975, s. 296.
- NAKAGAWA, M. — SHIMIZU, T. — MOTOI, L.: Pathology of experimental atrophic rhinitis in swine infected with *Alcaligenes bronchisepticus* or *Pasteurella multocida*. Natn. Inst. Anim. Hlth. Q., Tokyo, 14, 1974, s. 61-71.
- PLHAL, V.: Analýzy přímých ztrát a hlavní předpoklady efektivní výroby vepřového masa. Veterinářství, 27, 1977, s. 196-199.
- RANKIN, D. A.: Chloramphenicol is not for fed animals. J. Am. vet. med. Ass., 167, 1975, s. 274-278.
- REICHEL, F. — ŠEVČÍK, B. — ČASLAVKA, J.: Využití kombinace Tylosinu a sulfadimidinu v chovech prasat. III. Ověření v terénní praxi. Veterinaria, Spofa, 17, 1975, s. 21-31.
- SANDER, B.: Praxisbericht über Bekämpfung der *Rhinitis atrophicans* des Schweines. Tierärztl. Umsch., 27, 1972, s. 516-517.
- SCHULLER, W. — SCHLERKA, G.: Über die Anwendung von Tylosin in einem mit enzootischer Pneumonie und *Rhinitis atrophicans* verseuchten Schweinebestand. Wien. tierärztl. Mschr., 59, 1972, s. 181-183.
- SWITZER, W. P.: Elimination of *Bordetella bronchiseptica* from the nasal cavity of swine by sulphonamide therapy. Vet. Med., 58, 1963, s. 571-574.
- SWITZER, W. P. — FARRINGTON, D. O.: Progress in the Control of Atrophic Rhinitis Caused by *Bordetella bronchiseptica* in Swine. J. Am. vet. med. Ass., 161, 1972, s. 1325-1331.
- ŠEVČÍK, B. — REICHEL, F. — STRAKOVÁ, J.: Využití kombinace tylosinu a sulfadimidinu v chovech prasat. I. část — Vliv na zdravotní stav. Biologizace Chem. Výz. Zvíř., 4, 1974, s. 333-341.
- ŠKALOUD, J. — PLÍŠEK, K. — VYHNÁLEK, J.: Klinické hodnocení účinnosti Neomixu SPOFA na tlumení atrofické rinitidy prasat. Veterinaria, Spofa, 17, 1975, s. 69-92.
- TAYLOR-ROBINSON, D. — PURCELL, R. H. — WONG, D. C. — CHANOCK, R. M.: A colour test for the measurement of antibody to certain *Mycoplasma* species based upon the inhibition of acid production. J. Hyg., Camb., 64, 1966, s. 91-104.
- URBANOVA, Z. — aj.: Účinek Tylosinu u prasat. Vet. Med., Praha, 20, 1975, s. 251-260.
- VÝMOLA, F. — HEJZLAR, M. — ZAHRAVNICKÝ, J. — POTUŽNÍK, V.: Zkoušky citlivosti mikrobů na antibiotika diskovou metodou. Čs. Epidem. Mikrobiol. Imunol., 12, 1963, s. 290-303.
- VÝMOLA, F. — HEJZLAR, M.: Kvantitativní zkoušky citlivosti mikrobů na antibiotika. Čs. Epidem. Mikrobiol. Imunol., 13, 1964, s. 112-120.

Došlo dne 15. 6. 1978

ШИШАК, Ф. — ГОИШ, М. — КУКСА, Ф. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): Восприимчивость штаммов *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* и *Mycoplasma hyorhinis*, изолированных у свиней, к антибиотикам и химиотерапевтикам. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9): 531-540.

С помощью чашечного диффузионного теста определяли восприимчивость к 16 антибиотикам и химиотерапевтикам 76 штаммов *B. bronchiseptica*, 232 штамма *P. multocida* и 104 штамма *M. hyorhinis*, изолированных у свиней из разведений, страдающих от ринита и энзоотической пневмонии. В качественном тесте восприимчивости штаммы *B. bronchiseptica* оказались восприимчивыми к гентамицину (100,00 %), хлорамфениколу (94,75 %), канамицину (80,20 %), колистину (96,10 %), неомицину (100,00 %), полимиксину (100,00 %) и тетрациклину (90,80 %). Низкая восприимчивость отмечена к эритромицину (65,80 %) и сульфаметоксидину (18,40 %). Все штаммы резистентны к ампицилину, бацитрацину, фурадантину, оксацилину, пенициллину и стрептомицину. Штаммы *P. multocida* восприимчивы к ампицилину (94,40 %), эритромицину (80,95 %), фурадантину (94,40 %), гентамицину (100,00 %), хлорамфениколу (100,00 %), канамицину (88,00 %), колистину (81,45 %), неомицину (82,30 %), пенициллину (79,30 %), полимиксину (87,50 %) и тетрациклину (90,50 %). Низкая восприимчивость отмечена к бацитрацину (15,50 %), оксацилину (21,10 %) и стрептомицину (24,10 %). Все штаммы устойчивы к сульфаметоксидину. Штаммы *M. hyorhinis* восприимчивы к фурадантину, гентамицину, хлорамфениколу, канамицину, неомицину, тетрациклину, тогда как к ампицилину, бацитрацину, эритромицину, колистину, оксацилину, пенициллину, полимиксину, стрептомицину и сульфаметоксидину они устойчивы. У 10 штаммов *B. bronchiseptica*

и *P. multocida* с помощью чашечного дилуционного теста определили антимикробную активность к 5 препаратам и выражали ее величинами минимальной ингибиционной концентрации (MIC). Штаммы *B. bronchiseptica* сильно восприимчивы к гентамицину и менее восприимчивы к хлорамфениколу и тетрациклину, где величины MIC уже повышены. У сульфаметоксидина и тилана MIC находились на уровне значений устойчивости. Штаммы *P. multocida* сильно восприимчивы к гентамицину и восприимчивы к хлорамфениколу и тетрациклину. У сульфаметоксидина и тилана MIC находились на уровне значений устойчивости. Результаты подробно обсуждаются.

чашечный диффузионный тест; MIC; атрофический ринит; энзоотическая пневмония свиней

ŠIŠÁK, F. — GOIŠ, M. — KUKSA, F. (Veterinary Research Institute, Brno): *The Sensitivity of the Strains of Bordetella bronchiseptica, Pasteurella multocida, and Mycoplasma hyorhinis, Isolated from Pigs, to Antibiotics and Chemotherapeutics*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 531-540.

On the whole, 76 strains of *B. bronchiseptica*, 232 strains of *P. multocida* and 104 strains of *M. hyorhinis*, isolated from pigs in herds affected by atrophic rhinitis and enzootic pneumonia, were examined by the plate diffusion test for their sensitivity to 15 antibiotics and chemotherapeutics. In the qualitative test for sensitivity, the strains of *B. bronchiseptica* were sensitive to gentamycin (100.00 %), chloramphenicol (94.75 %), canamycin (80.20 %), colistin (96.10 %), neomycin (100.00 %), polymyxin (100.00 %), and tetracycline (90.80 %). The sensitivity to erythromycin and sulphamethoxydin was low (65.80 % and 18.40 %, respectively). All the strains tested were resistant to ampicillin, bacitracin, furadantin, oxacillin, penicillin, and streptomycin. The strains of *P. multocida* were sensitive to ampicillin (94.40 %), erythromycin (80.95 %), furadantin (94.40 %), gentamycin (100.00 %), chloramphenicol (100.00 %), canamycin (88.00 %), colistin (81.45 %), neomycin (82.30 %), penicillin (79.30 %), polymyxin (87.50 %), and tetracycline (90.50 %). The sensitivity to bacitracin, oxacillin, and streptomycin was low (15.50 %, 21.10 %, 24.10 %, respectively). All strains were resistant to sulphamethoxydin. The strains of *M. hyorhinis* were sensitive to furadantin, gentamycin, chloramphenicol, canamycin, neomycin, and tetracycline, whereas their response to ampicillin, bacitracin, erythromycin, colistin, oxacillin, penicillin, polymyxin, streptomycin, and sulphamethoxydin was that of resistance. In ten strains of *B. bronchiseptica* and *P. multocida*, the antimicrobial response to five preparations was examined by the plate dilution test and was expressed by the values of minimum-inhibition concentration (MIC). The strains of *B. bronchiseptica* were highly sensitive to gentamycin, but less sensitive to chloramphenicol and tetracycline, to which they gave higher MIC values. In sulphamethoxydin and tylan, the MIC values ranged within the limits of resistance. The strains of *P. multocida* were highly sensitive to gentamycin and fairly sensitive to chloramphenicol and tetracycline. In sulphamethoxydin and tylan the MIC values varied within the values of resistance. The results are analyzed in detail in discussion.

plate diffusion test; MIC; atrophic rhinitis; enzootic pneumonia of swine

ŠIŠÁK, F. — GOIŠ, M. — KUKSA, F. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): *Sensibilität der aus Schweinen isolierten Stämme Bordetella bronchiseptica, Pasteurella multocida und Mycoplasma hyorhinis gegen Antibiotika und Chemotherapeutika*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 531-540.

Mit Hilfe des Diffusionsplattentestes stellten wir die Sensibilität auf 15 Antibiotika und Chemotherapeutika bei 76 Stämmen von *B. bronchiseptica*, 232 Stämmen von *P. multocida* und 104 Stämmen von *M. hyorhinis*, die aus Schweinen in mit Rhinitis chronica atrophicans und enzootischer Pneumonie versuchten Zuchten isoliert wurden, fest. Im qualitativen Sensibilitätstest waren die Stämme *B. bronchiseptica* sensitiv gegen Gentamycin (100,00 %), Chloramphenikol (94,75 %), Kanamycin (80,20 %), Kolistin (96,10 %), Neomycin (100,00 %), Polymyxin (100,00 %) und Tetrazyklin (90,80 %). Niedrig war die Sensibilität gegen Erythromycin (65,80 %) und Sulfamethoxydin (18,40 %). Alle Stämme waren resistent gegen Ampizillin, Bazitrazin, Furadantin, Oxazillin, Penizillin und Streptomycin. Die *P.-multocida*-Stämme waren sensitiv gegen Ampizillin (94,40 %), Erythromycin (80,95 %), Furadantin (94,40 %), Gentamycin (100,00 %), Chloramphenikol (100,00 %), Kanamycin (88,00 %), Kolistin (81,45 %), Neomycin (82,30 %), Penizillin (79,30 %), Polymyxin (87,50 %) und

Tetrazyklin (90,50 ‰). Eine geringe Sensibilität wurde gegen Bazitrazin (15,50 ‰), Oxazillin (21,10 ‰) und Streptomycin (24,10 ‰) festgestellt. Alle Stämme waren resistent gegen Sulfamethoxydin. Die *M.-hyorhinis*-Stämme waren sensitiv gegen Furadantin, Gentamycin, Chloramphenikol, Kanamycin, Noemycin und Tetrazyklin, während sie gegen Ampizillin, Bazitrazin, Erythromycin, Kolistin, Oxazillin, Penicillin, Polymyxin, Streptomycin und Sulfamethoxydin resistent waren. Bei zehn *B.-bronchiseptica*- und *P.-multocida*-Stämmen wurde mit Hilfe des Dillutionsplatten-testes eine antimikrobielle Aktivität gegen fünf Präparate festgestellt und in Werten der minimalen Inhibitionskonzentration (MIC) ausgedrückt. Die *B.-bronchiseptica*-Stämme waren hochsensitiv gegen Gentamycin, aber weniger sensitiv gegen Chloramphenikol und Tetrazyklin, wo bereits höhere MIC-Werte festgestellt wurden. Bei Sulfamethoxydin und Tylan wiesen die MIC Resistenzwerte auf. Die *P.-multocida*-Stämme waren hochsensitiv gegen Gentamycin und gut sensitiv gegen Chloramphenikol und Tetrazyklin. Bei Sulfamethoxydin und Tylan wurden Resistenzwerte der MIC festgestellt. Die festgestellten Resultate werden in der Diskussion eingehender behandelt.

Diffusionsplattentest; MIC; *Rhinitis chronica atrophicans*; enzootische Schweinepneumonie

Adresa autorů:

MVDr. František Šišák, CSc., MVDr. Milan Goiš, CSc., MVDr. František Kuksa, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno-Medlánky

J. Bartoš, Z. Matyáš

BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Průzkum možné přítomnosti aflatoxinu B₁ v játrech a svalovině jatečných zvířat*. Vet.Med., Praha, 23, 1978 (9) : 541-548.

Modifikovanou Jacobsonovou metodou (Jacobson aj., 1971) jsme vyšetřili na možnou přítomnost aflatoxinu B₁ 77 vzorků jater (z prasat, býků, krav, kuřecích brojlerů, nosnic), 28 vzorků bílé svaloviny (z prasat, kuřecích brojlerů, nosnic) a 24 vzorky červené svaloviny (z prasat, kuřecích brojlerů, nosnic). Vzorky pocházely ze zdravých zvířat, část byla od zvířat krmených netradičním krmivem s obsahem prasečích exkrementů. Pozitivní nálezy byly zjištěny pouze u dvou vzorků vepřových jater z celkového počtu 30 vzorků. Jeden vzorek byl z prasat krmených krmivem s obsahem 5 % prasečích exkrementů, druhý pak z prasete krmeného tradičním způsobem. Nalezená množství můžeme označit v obou případech za stopová, neboť koncentrace aflatoxinu B₁ nepřesáhla 0,1 µg kg⁻¹. Ve vzorcích svaloviny a v játrech ostatních hospodářských zvířat jsme nezjistili na chromatogramu přítomnost skvrn, které by se barvou a polohou blížily skvrnám aflatoxinu B₁.

mykotoxiny; suroviny živočišného původu; netradiční krmiva; hospodářská zvířata

V poslední době se stalo studium vlastností některých druhů plísní a jejich toxických metabolitů významnou oblastí humánního i veterinárního lékařství. Nejméně 150 druhů plísní produkuje toxické látky — mykotoxiny, z nichž nyní jsou nejvíce studovány aflatoxiny, dále pak ochratoxin A, patulin, sterigmatocystin, islandotoxin, luteoskyrin, F-2 toxin a další.

Důvody tohoto zvýšeného zájmu jsou dány vysokou toxicitou pro člověka a některé druhy zvířat, dále pak jejich výrazným kancerogenním, teratogenním a mutagenním účinkem a mnoha dalšími výjimečnými vlastnostmi, jako je poměrně vysoká rezistence vůči teplu, možnost dlouhé persistence v potravinách a krmivech, nepříznivé ovlivnění metabolických procesů v organismu.

Mezi mnoha jinými druhy potravin a krmiv mohou být aflatoxiny kontaminovány i suroviny živočišného původu. Tato problematika je v celosvětovém měřítku intenzívně studována, jak dokazuje literární přehled.

Platonow (1965) a Platonow a Beauregard (1965) neprokázali toxické látky v jaterních extraktech a svalovině kuřat krmených po dobu šesti týdnů toxickou podzemnicovou moučkou (3,1 mg aflatoxinu v 1 kg krmiva). Keyl

a Booth (1971) nenalezli rezidua aflatoxinu ve svalovině, játrech a krvi kuřecích brojlerů, jimž bylo podáváno krmivo s obsahem 1,6 mg aflatoxinu v 1 kg krmiva po dobu osmi týdnů. Zjistili však rozdílnou citlivost u drůbeže různých plemen. Po zkrmování 2,7 aflatoxinu v 1 kg krmiva nosnicím po dobu 48 dní nezachytili rezidua aflatoxinu v krvi, svalovině, játrech a vejcích. Kratzer aj. (1969) neprokázali přítomnost aflatoxinu ve svalovině, játrech a krvi kuřecích brojlerů krmených šedesát dnů před porážkou krmivem obsahujícím 1,6 mg aflatoxinu v 1 kg. Negativní byly i nálezy ve vejcích, mase, játrech a krvi nosnic (plemeno bílé Leghorn) krmených 48 dnů krmivem s obsahem 2,7 mg aflatoxinu v 1 kg. Ani Sims aj. (1970) nezjistili aflatoxin v játrech nosnic krmených *ad libitum* krmivem obsahujícím 2, 4 a 8 mg aflatoxinu v 1 kg.

Prior (1976) neprokázal aflatoxin ani v jednom z deseti vzorků jater a ledvin, které pocházely ze zvířat (neuvádí druhy), u nichž bylo podezření z mykotoxikózy.

Naproti tomu Van Zytveld aj. (1970) zachytili „aflatoxin nebo metabolity aflatoxinu“ ve svalovině a játrech kuřecích brojlerů (u 15 ze 45) krmených šest týdnů směsí aflatoxinů B₁ a G₁ v denních dávkách od 60 do 275 mg na 1 kg živé hmotnosti. V práci však neuvádějí zjištěná množství aflatoxinu. Mintzlauff aj. (1974) zkrmovali osm týdnů brojlerům krmiva obsahující 0,025 až 15 mg aflatoxinu v 1 kg. Rezidua v játrech a svalovině kuřecích brojlerů zjišťovali již při koncentraci 0,1 mg aflatoxinu B₁ v 1 kg krmiva.

Negativní nálezy v orgánech a svalovině prasat popsali Allcroft a Carnaghan (1963), Keyl aj. (1968), Booth (1969) a Keyl a Booth (1971). Poslední dva citovaní autoři, kteří podávali prasatům 0,8 mg aflatoxinu v 1 kg krmiva po dobu 120 dnů, nestanovili rezidua aflatoxinu ve svalovině, tuku, ledvině, játrech a slezině těchto zvířat.

Naproti tomu Wiseman a Jacobson (1969) prokázali pozitivní nálezy aflatoxinu B₁ a M₁ v játrech, ledvinách, krvi a šunce prasat po jednoměsíčním zkrmování 0,1 až 0,4 mg aflatoxinu v 1 kg krmiva. Při podávání 0,1 mg aflatoxinu B₁ v 1 kg krmiva obsahovala játra 0,25, ledviny 0,29 a svalovina 0,15 μg aflatoxinu B₁ v 1 kg tkáně. Současně byl zjištěn aflatoxin M₁ v játrech, ledvinách a svalovině (0,11; 0,21; 0,04 μg aflatoxinu M₁ v 1 kg tkáně). Krogh aj. (1973) popsali pokusy se zkrmováním krmiv obsahujících aflatoxiny B₁ a B₂ v koncentracích 0,3 a 0,5 mg kg⁻¹ prasatům po dobu celého výkrmu. Pozitivní nálezy v játrech byly zachyceny již při zkrmování krmiva obsahujícího 0,3 mg aflatoxinu v 1 kg. Z osmnácti analyzovaných vzorků jater stanovili 10 μg kg⁻¹ v osmi vzorcích, 92 μg kg⁻¹ v jednom vzorku a stopová množství (tj. méně než 1 μg kg⁻¹) v pěti vzorcích. Čtyři vzorky byly negativní. Po zkrmování krmiva obsahujícího 0,5 mg kg⁻¹ bylo analyzováno 18 vzorků jater. Ve dvou vzorcích bylo nalezeno 51 μg kg⁻¹, v jednom vzorku 35 μg kg⁻¹, ve třech vzorcích 11 μg kg⁻¹, v pěti vzorcích 10 μg kg⁻¹, v jednom vzorku 2 μg kg⁻¹. Stopová množství (tj. méně než 1 μg kg⁻¹) byla zjištěna ve dvou vzorcích a čtyři vzorky byly negativní.

Při nižší koncentraci aflatoxinu v krmivu (0,3 mg kg⁻¹) byly nálezy ve svalovině převážně negativní, při vyšší koncentraci (0,5 mg kg⁻¹) byla ve svalovině zjišťována převážně stopová množství.

Murthy aj. (1975) prokázali aflatoxin B₁, B₂ a M v játrech, močovém měchýři, slezině, srdci, svalovině a ledvině prasat ve výkrmu při zkrmování krmiva s vysokým obsahem aflatoxinu. Nejvyšší hodnoty byly nalezeny v játrech (6,1 μg aflatoxinu B₁ v jednom kg a 2,82 μg aflatoxinu M v jednom kg).

O negativních nálezech toxických látek v orgánech a svalovině skotu referovali Allcroft a Carnaghan (1963) a Keyl aj. (1968). Ani Booth (1969) a Keyl a Booth (1971) nezachytili rezidua ve svalovině a orgánech býků krmených krmivem obsahujícím 1 mg aflatoxinu v 1 kg. Stopová množství aflatoxinu zjistili v krvi. Jestliže tato zvířata dostávala během posledních 24 hodin před porážkou krmivo bez aflatoxinu, nebyl aflatoxin v jejich krvi nalezen.

MATERIÁL A METODA

Na možnou přítomnost aflatoxinu B₁ jsme vyšetřili 30 vzorků jater prasat, 20 vzorků jater býků, 2 vzorky jater krav, 16 vzorků jater kuřecích brojlerů, 9 vzorků jater nosnic, 12 vzorků bílé svaloviny prasat (*M. longissimus dorsi*), 8 vzorků bílé svaloviny kuřecích brojlerů (prsí sval), 8 vzorků bílé svaloviny nosnic (prsí sval), 12 vzorků červené svaloviny prasat (*M. quadriceps femoris*), 6 vzorků červené svaloviny kuřecích brojlerů (stehenní sval), 6 vzorků červené svaloviny nosnic (stehenní

sval). Vzorky pocházely od klinicky zdravých zvířat, u nichž nebylo podezření z intoxikace. Část vzorků pocházela od zvířat krmených netradičním krmivem s obsahem vepřových exkrementů.

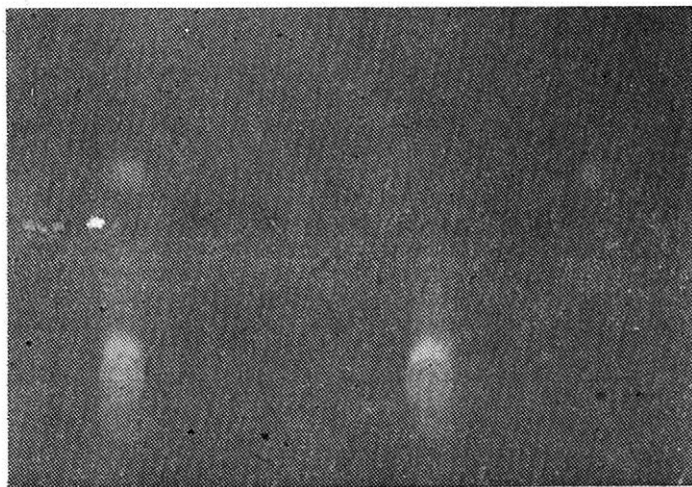
Při sestavování námi použité metody jsme vycházeli z prací Wisemana aj. (1967), Simse aj. (1970), Jacobsona aj. (1971), Strzeleckiho (1973), Browna aj. (1973) a Jacobsona a Wisemana (1974). Námi použitý modifikovaný metodický postup byl tento: 50 nebo 100 g tkáně se zhomogenizuje (Homogenizer typ 302 — Polsko), přidá se 300 až 400 ml metanolu p. a. a opět se homogenizuje asi 5 minut. Homogenát se přeleje do kádinky, přidá se 25 g křemeliny Hyflo Super Cel (Johns Manville, USA), obsah se silně promíchá skleněnou tyčinkou a po 5 minutách se přefiltruje 1 cm vrstvou Hyflo Super Cel na filtračním papíře v Büchnerově nálevce. Po přefiltrování za vakua se promyje kádinka i obsah v Büchnerově nálevce ještě 75 ml metanolu p. a. Do litrové dělicí nálevky se naleje filtrát a stejné množství 4% roztoku chloridu sodného. Nečistoty se extrahují třepáním s 200 ml petroléteru p. a. V dělicí nálevce se oddělí petroléter v horní části. Vodné metanolová frakce se stejným způsobem extrahuje petroléterem ještě třikrát a potom se z ní extrahuje aflatoxin protřepáváním s chloroformem (celkem 4×100 ml). K spojeným chloroformovým extraktům v dělicí litrové nálevce se přidá 300 ml 4% chloridu sodného a po protřepání se chloroformová fáze vypustí do kádinky. Pro vyčerení se může použít křemelina Hyflo Super Cel, které se přidá jedná polévková lžíce (asi 14 g) do kádinky, obsah se promíchá a zfiltruje pomocí Büchnerovy nálevky. Chloroformový extrakt se odpaří na rotačním vakuovém odpařovačů při teplotě vodní lázně 40 °C. Odparek se rozpustí v 5 ml chloroformu a přenesse se kvantitativně do lékovky (průměr 2 cm, výška 5 cm). Chloroform se odpaří na vodní lázni pod jemným proudem dusíku. Odparek, rozpuštěný ve 100 až 200 μ l chloroformu, se nanáší na neaktivovanou tenkou vrstvu silikagelu (Silufol UV 254, Sklárný Kavalier, n. p.) v množství 50 až 100 μ l (vzorek) a 50 až 100 μ l (vzorek + standard). Mikrodávkočím se nanese standard, vzorek a vedle něho vzorek se standardem na tři starty uprostřed fólie při současném vysušování fénem. Vyvíjí se v kyvetách při pokojové teplotě nejdříve v dietyléteru. Po odstřížení horní části fólie s největším množstvím nečistot se vyvíjí v obráceném směru v soustavě chloroform : aceton 9 : 1 v nenasyčených komorách. Chromatogram se prohlíží pod UV lampou přístrojem Fluotest Universal (fy Original Hanau Quarzlampe, NSR) a standard se srovnává se zkoušeným vzorkem. Semikvantitativní přibližné stanovení je umožněno porovnáním intenzity skvrny s různými koncentracemi aflatoxinu B₁. Z potvrzovacích testů jsme použili postřik skvrn 20% kyselinců sírovou. Pokusy probíhaly od května do prosince 1976.

VÝSLEDKY A DISKUSE

V počátečních pokusech jsme čistili vzorky na sloupci s neutrálním kyslíčnickem hlinitým a bezvodým síranem sodným postupem, který popsal Strzelecki (1973). Při čištění na sloupcích byly vzorky při nanášení na tenkou vrstvu silikagelu čistší než při nanášení vzorků bez této purifikace. Poněvadž nečistoty po vyvíjení v dietyléteru (tj. purifikaci přímo na tenké vrstvě silikagelu) a následném vyvíjení ve směsi chloroform : aceton (9 : 1) nezakrývaly vnitřní standard, upustili jsme v dalších pokusech od zdlouhavé purifikace sloupcovou chromatografií. Při vyvíjení ve směsi chloroform : aceton (9 : 1) je výhodnější používat nenasyčených komor, neboť skvrny aflatoxinu B₁ se oddělí od nečistot lépe než při použití nasycených komor.

V části pokusů jsme nečistoty extrahovali vytřepáváním ve směsi petroléter : hexan : benzen (2 : 1 : 2). Proti samotnému petroléteru bylo použití směsi výhodnější — nanášené extrakty na tenkou vrstvu silikagelu byly čistší — ale i nákladnější. Protože se hexan nesnadno získává (dovoz), používali jsme v dalších pokusech pouze petroléter p. a. samotný, neboť po vyvíjení v dietyléteru a následném vyvíjení ve směsi chloroform : aceton (9 : 1) byl vnitřní standard vždy dobře patrný a nečistoty nepůsobily rušivě v místě výskytu skvrny aflatoxinu B₁.

Z celkového počtu 30 vzorků jater poražených prasat jsme zjistili pouze u dvou vzorků přítomnost skvrn, které se barvou a polohou na chromatogramu shodovaly se skvrnami aflatoxinu B₁, přidaného k vzorku (vnitřní standard). Také po postřiku 20% kyselinou sírovou se barva změnila z modré na žlutou. Porovnáním s různými koncentracemi aflatoxinu B₁ můžeme nalezená množství označit za stopová, neboť obsah aflatoxinu B₁ nepřesáhl v játrech koncentraci 0,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Krogh aj. (1973) označují za stopová množství koncentrace nižší než 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Vzorky jater byly odebírány od zdravých zvířat. Jeden pozitivní nález pocházel z prasat krmených krmivem s obsahem 5 % prasečích exkrementů, druhý pozitivní nález byl z prasete krmeného tradičním způsobem. V játrech ostatních hospodářských zvířat (býků, kuřecích brojlerů, nosnic a krav) jsme nezjistili na chromatogramech přítomnost skvrn, které by se barvou a polohou blížily skvrně aflatoxinu B₁ (obr. 1—4). Totéž platí o svalovině vepřů, kuřecích brojlerů a nosnic.



1. Chromatogram extraktu z vepřových jater po vyvíjení v dietyléteru, odstřížení části fólie s největším množstvím nečistot a po vyvíjení ve směsi chloroform : aceton (9 : 1) v obráceném směru — Chromatogram of pork liver extract after development in diethyl ether, after separation of part of the foil with the largest amount of impurities, and after development in the chloroform : acetone mixture (9 : 1) in reverse sense

2. Chromatogram extraktu z jater krávy po vyvíjení v dietyléteru, odstřížení části fólie s největším množstvím nečistot a po vyvíjení ve směsi chloroform : aceton (9 : 1) v obráceném směru — Chromatogram of bovine liver extract after development in diethyl ether, after separation of impurities, and after development in the chloroform : acetone mixture (9 : 1) in reverse sense



3. Chromatogram extraktu z jater kuřecího brojlera po vyvíjení v dietyléteru, odstřížení části fólie s největším množstvím nečistot a po vyvíjení ve směsi chloroform : aceton (9 : 1) v obráceném směru — Chromatogram of broiler chick extract after development in diethyl ether, after separation of part of the foil with the largest amount of impurities, and after development in the chloroform : acetone mixture (9 : 1) in reverse sense



4. Chromatogram extraktu z jater nosnice po vyvíjení v dietyléteru, odstřížení části fólie s největším množstvím nečistot a po vyvíjení ve směsi chloroform : aceton (9 : 1) v obráceném směru — Chromatogram of laying-hen liver extract after development in diethyl ether, after separation of part of the foil with the largest amount of impurities, and after development in the chloroform : acetone mixture (9 : 1) in reverse sense

Častým metabolitem aflatoxinu B_1 v játrech může být i aflatoxin M. Podle pokusů Krogha aj. (1973) bývá jeho množství značně nižší než aflatoxinu B_1 . Tak např. při zkrmování 0,5 mg aflatoxinu v 1 kg krmiva stanovili tyto autoři v játrech u dvou prasat aflatoxin B_1 v množství $51 \mu\text{g kg}^{-1}$, zatím co aflatoxin M byl u stejných vzorků zachycen pouze u jednoho vzorku v množství $3 \mu\text{g kg}^{-1}$. Také Murthy aj. (1975) uvedli, že jaterní tkáň obsahovala více aflatoxinu B_1 než jeho metabolitu M_1 . Poněvadž aflatoxin M není běžně dostupný na světových trzích, museli jsme se v této práci omezit pouze na aflatoxin B_1 .

Důležitá pro praxi je skutečnost, že i při přítomnosti aflatoxinu B_1 v játrech v množství $51 \mu\text{g kg}^{-1}$ nemusí být pozorovány při jateční prohlídce jater makroskopicky zjiřitelné změny, které by upozornily na přítomnost aflatoxinů (Krogh aj., 1973).

Poněvadž aflatoxin B_1 je silně kancerogenní látka, měly by být suroviny živočišného původu vyšetřovány na přítomnost aflatoxinů.

Předpokladem zdárné prevence je zavedení vhodných analytických metod na zjišťování aflatoxinů v široké paletě nejrůznějších surovin a výrobků živočišného i rostlinného původu.

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

Literatura

- 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.
- BOOTH, A. N.: Review of the biological effects of aflatoxins on swine, cattle and poultry. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 46, 1969, Abstr. 154.
- BROWN, N. L. — NESHEIM, S. — STACK, M. E. — WARE, G. M.: Method for the determination of aflatoxin in animals tissue. *J. Ass. off. analyt. Chem.*, 56, 1973, s. 1437-1439.
- 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.
- KEYL, A. C. — BOOTH, A. A.: Aflatoxin effects in livestock. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 48, 1971, s. 599-604.
- KEYL, A. C. — BOOTH, A. N. — MASRI, M. S. — GUMBMAN, M. R. — GAGNE, W. E.: In: HERZBERG, M. (ed.): Toxic micro-organisms. US Government Printing Office, Washington, D. C., 1968, s. 72. In: MINTZLAFF, H. J. — LÖTZSCH, R. — TAUCHMANN, F. — MEYER, W. — LEISTNER, L.: Aflatoxin-Rückstände in der Leber und in der Muskulatur von Masthähnchen nach Verabreichung von aflatoxinhaltigen Futtermitteln. *Fleischwirtschaft*, 54, 1974, s. 774-778.
- KRATZER, F. H. — BANDY, D. — WILEY, M. — BOOTH, A. N.: Aflatoxin effects in poultry. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 131, 1969, s. 1281-1284.
- KROGH, P. — HALD, B. — HASSELAGER, E. — MADSEN, A. — MORTENSEN, H. P. — CAMPBELL, A. D.: Aflatoxin residues in bacon pigs. *Pure Appl. Chem.*, 35, 1973, s. 275-281.
- MINTZLAFF, H. J. — LÖTZSCH, R. — TAUCHMANN, F. — MEYER, W. — LEISTNER, L.: Aflatoxin-Rückstände in der Leber und in der Muskulatur von Masthähnchen nach Verabreichung von aflatoxinhaltigen Futtermitteln. *Fleischwirtschaft*, 54, 1974, s. 774-778.
- MURTHY, T. R. K. — JEMMALI, M. — HENRY, Y. — FRAYSSINET, C.: Aflatoxin residues in tissues of growing swine: effect of separate and mixed feeding of protein and protein-free portions of the diet. *J. Anim. Sci.*, 41, 1975, s. 1339-1347.
- PLATONOW, N.: Investigation of the possibility of the presence of aflatoxin in meat and liver of chickens fed toxic groundnut meal. *Vet. Rec.*, 77, 1965, s. 1028.
- PLATONOW, N. — BEAUREGARD, M.: Feeding of ferrets with the raw meat and liver chickens chronically poisoned with toxic groundnut meal. *Can. J. comp. Med. Vet. Sci.*, 29, 1965, s. 63-65.
- PRIOR, M. G.: Mycotoxin determinations on animal feedstuffs and tissues in western Canada. *Can. J. comp. Med.*, 40, 1976, s. 75-79.
- SIMS, W. M. — KELLEY, D. C. — SANFORD, P. E.: A study of aflatoxicosis in laying hens. *Poult. Sci.*, 49, 1970, s. 1082.
- STRZELECKI, E. L.: Extraction and determination of *Aspergillus flavus* metabolites — aflatoxins from meat products. *Pure Appl. Chem.*, 35, 1973, s. 297-307.
- VAN ZYTVELD, W. A. — KELLEY, D. C. — DENNIS, S. M.: Aflatoxicosis: The presence of aflatoxins or their metabolites in livers and skeletal muscles of chickens. *Poult. Sci.*, 49, 1970, s. 1350.
- WISEMAN, H. G. — JACOBSON, W. C.: nepublikované výsledky: In: ARMBRECHT, B. H.: Aflatoxin residues in food and feed derived from plant and animal sources. *Residue Rev.*, 41, 1972, s. 13-54.

БАРТОШ, Й. — МАТИАШ, З. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): Определение возможного наличия афлатоксина В₁ в печени и мышцах боенских животных. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 541-548.

По модифицированному методу Якобсона (Якобсон и колл., 1971) исследовали на возможное присутствие афлатоксина В₁ 77 образцов печени (коров, быков, свиней, куриных бройлеров, несушек), 28 образцов белой мышцы (свиней, куриных бройлеров, несушек) и 24 образца красной мышцы (свиней, куриных бройлеров, несушек). Образцы происходили из здоровых животных, часть — от животных на нетрадиционном откорме, содержащем свиные экскременты. Положительные диагнозы установлены лишь у 2 образцов свиной печени из общего их количества 30. Один образец происходил от свиней на откорме, содержащим 5 % свиных экскрементов, а второй — от свиньи на традиционном откорме. Обнаруженные количества можно обозначить в обоих случаях микродозой, так как концентрация афлатоксина В₁ не превысила 0,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$. В образцах мышечной ткани и в печени остальных животных на хроматограмме не установлено наличия пятен, схожих по цвету и расположению с пятнами афлатоксина В₁.

микотоксины; сырье животного происхождения; нетрадиционные корма; скот

BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z. (Veterinary Research Institute, Brno): *Research on the Contingent Presence of Aflatoxin B₁ in the Liver and Muscle of Slaughter Animals*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 541-548.

Seventy-seven samples of liver (from pigs, bulls, cows, broiler chickens, layers), twenty-eight samples of white muscle (from pigs, broilers, layers), and twenty-four samples of red muscle (from pigs, broilers, layers) were examined by the modified Jacobson method (Jacobson et al. 1971) for the contingent presence of aflatoxin B₁. The samples came from healthy animals, part of them from animals fed non-traditional feed containing pig excrements. Positive findings were only obtained in two samples of pork liver, out of the total number of 30 samples. One sample came from pigs fed a ration containing 5 % of pig excrements, the other from a traditionally fed pig. The amounts of aflatoxin B₁ found in these two samples can be treated as trace quantities, since the concentration did not exceed 0.1 $\mu\text{g per kg}$. In the samples of muscle and liver of the other farm animals, the chromatogram did not show the presence of spots which might resemble, in colour and position, the spots of aflatoxin B₁.

mycotoxins; raw materials of animal origin; non-traditional feeds; farm animals

BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): *Untersuchungen über die mögliche Anwesenheit von Aflatoxin B₁ in der Leber und Muskulatur von Schlachttieren*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 541-548.

Mit Hilfe der modifizierten Jacobsonschen Methode (Jacobson u. a., 1971) untersuchten wir die mögliche Anwesenheit von Aflatoxin B₁ in 77 Leberproben (von Schweinen, Bullen, Kühen, Broilerküken und Legehennen), ferner in 28 Proben der weißen Muskulatur (von Schweinen, Broilerküken und Legehennen) sowie in 24 Proben der roten Muskulatur (von Schweinen, Broilerküken und Legehennen). Die Proben stammten von gesunden Tieren, ein Teil stammte von Tieren, die traditionswidrig mit einem Schweineexkrementen enthaltendem Futter gefüttert wurden. Positive Befunde wurden nur bei zwei Schweinsleberproben von insgesamt 30 Proben festgestellt. Eine Probe stammte von Schweinen, die mit einem 5 % Schweineexkrementen enthaltendem Futter gefüttert wurden, während die andere von einem traditional gefüttertem Schweine stammte. Die festgestellten Mengen können in beiden Fällen als Spuren Mengen bezeichnet werden, denn die Konzentration des Aflatoxins B₁ überschreift nicht 0,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$. In den Proben der Muskulatur und der Leber der übrige

gen landwirtschaftlichen Nutztiere stellten wir auf dem Chromatogramm keine Anwesenheit von Flecken fest, die in bezug auf Farbe und Lage den Flecken des Aflatoxins B₁ nahe kämen.

Mykotoxine; Rohstoffe tierischen Herkunft; untraditionelle Futtermittel; landwirtschaftliche Nutztiere

Adresa autorů:

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

M. Malíková, J. Habrda, Z. Matyáš

MALÍKOVÁ, M. — HABRDA, J. — MATYÁŠ, Z. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Vyšetření tržních kaprů na rezidua antimikrobiálních látek*. Vet.Med., Praha, 23, 1978 (9) : 549-554.

Mikrobiologickou difúzní metodou jsme zjišťovali rezidua inhibičních látek ve svalovině, hepatopankreatu, žluči a pylorových vacích 30 tržních kaprů pocházejících z rybníků jižně od Brna. Použili jsme těchto testačních mikroorganismů: *B. cereus* var. *mycoides* (ATCC 11778), *B. subtilis* (ATCC 6633), *Sarcina lutea* (ATCC 9341) a *Micrococcus flavus* (ATCC 10240). Rezidua inhibičních látek nebyla nalezena ani v jednom z vyšetřených vzorků svaloviny. Ostatní testované tkáně vykazovaly v některých případech malé inhibiční zóny, jejichž příčina však tkví v přítomnosti přirozených antimikrobiálně aktivních látek ve žluči a gastrointestinálním traktu ryb, nikoli v perzistenci reziduí léčiv podaných během života ryb.

sladkovodní ryby; antibiotika; mikrobiologická difúzní metoda; svalovina; hepatopankreas; žluč; pylorové vaky

Pro rozvoj sladkovodního rybářství v ČSSR je nutné stále zvyšovat výrobu ryb. Výlov tržních ryb má dosáhnout do roku 1980 20 700 tun, to znamená ve srovnání s dosavadním stavem zvýšení výtěžnosti téměř o 26 % (Anon., 1977). Tento nárůst je v souladu s požadavky na moderní výživu člověka, která stále více propaguje potraviny lehce stravitelné a přitom co do zdroje výživných látek maximálně cenné — takovou potravinou bezesporu sladkovodní ryba je.

Úkolem veterinárně hygienické služby pak je zabezpečovat zdravotní nezávadnost těchto potravin a surovin živočišného původu po všech stránkách, tedy i před rezidui antimikrobiálních látek, podávaných rybám za účelem krmením, preventivním či léčebným.

Na potenciální rizika reziduí antimikrobiálních látek v potravinách a surovinách živočišného původu pro hygienu humánní i veterinární poukazuje větší počet publikací a v mnoha státech světa již existují směrnice a omezení, týkající se zejména masového používání antibiotik důležitých k terapii lidí pro krmené účely (Malíková aj., 1974, 1975).

V ČSSR byly v předchozích letech uveřejněny práce o problematice reziduí inhibičních látek v mase a orgánech různých druhů jatečných zvířat včetně drůbeže (Malíková aj., 1974, 1975; Pichnarčík aj., 1974; Kučera, 1969 a další), ale údajů o analogickém vyšetření ryb je dosud velmi málo.

V rámci komplexního výzkumu vlivu životního prostředí na úroveň kontaminace cizorodých látek v potravinovém řetězci byli na našem pracovišti vyšetřováni tržní kapři pocházející z lokality pohořelických rybníků jižně od Brna. Výsledky vyšetření na přítomnost antimikrobiálně aktivních reziduí popisuje tato práce.

MATERIÁL A METODY

V období od 17. 10. do 16. 12. 1975 jsme zjišťovali výskyt reziduí inhibičních látek u 30 kaprů. Ryby byly klinicky zdravé, sádkované, o tržní hmotnosti v průměru kolem 2 kg, kategorie K 3 (tříletá ryba), po stránce obchodní I. jakosti. Dodavatelem bylo Státní rybářství, n. p., České Budějovice, odstěpný závod Pohořelice u Brna. Z tohoto pokusného materiálu bylo 20 kaprů anonymního původu (ze sádek), po pěti kusech z rybníku Novoveského a z Vrkoče.

Mikrobiologickou difúzní metodou, spočívající v přiložení zmrazených vzorků tkání na pevnou půdu v úpravě podle Malíkové aj. (1974), byla zjišťována rezidua ve svalovině, hepatopankreatu a v pylorových vacích; žluč byla plněna do kovových komínků a vyšetřována stejnou metodou. Každý vzorek byl testován současně třikrát na čtyřech druzích mikroorganismů: *B. cereus* var. *mycoides* (ATCC 11778), *B. subtilis* (ATCC 6633), *Sarcina lutea* (ATCC 9341) a *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), který se jevil vzhledem k dobrému zachytu reziduí chloramfenikolu v daném případě jako velmi vhodný (Malíková a Habrda, 1976).

Ke kontrole citlivosti použitého testačního kmene byly užívány vhodné antibiotické disky „Sensitivity Disc Lachema“.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Svalovina kaprů byla ve všech případech negativní. Pozitivní výsledky v ostatních testovaných orgánech a tkáních byly zjištěny u 26 ryb, nejčastěji ve žluči (tab. I). Pouze u jednoho kusu se vyskytly inhibiční zóny v hepatopankreatu, žluči i pyloru, u 14 kaprů byl pozitivní nálezy pouze ve žluči. Inhibiční zóny byly malé, u vzorků hepatopankreatu a pylorových vaků 2 až 3 mm, žluči 2 až 6 mm. V souladu s literaturou byly inhibiční zóny do 1,5 mm hodnoceny negativně.

I. Nálezy reziduí antimikrobiálních látek u tržních kaprů — Findings of the residues of antimicrobial substances in market carp

Testační kmen	Vyšetřeno kaprů	Rezidua (%)			
		svalovina	hepatopankreas	žluč	pylorové vaky
<i>B. cereus</i> (ATCC 11778)	30	0	0	19 (63)	0
<i>B. subtilis</i> (ATCC 6633)	30	0	0	4 (13)	5 (17)
<i>M. flavus</i> (ATCC 10240)	30	0	6 (20)	9 (30)	1 (3)
<i>Sarcina lutea</i> (ATCC 9341)	30	0	0	0	0
Celkem	30	0	6 (20)	20 (67)	6 (20)

Anamnesticky bylo zjištěno, že medikovanými krmivem Karpex (Kupin) byly přikrmovány dvouleté ryby (poslední aplikace více než rok před výlovem), zjara následujícího roku (zhruba 7 až 8 měsíců před výlovem) byl všem kaprům injikován jednorázově chloramfenikol v obvyklé dávce 20 mg *pro toto*.

Přetrvávání reziduí antimikrobiálních látek v těle ryb je závislé na mnoha faktorech: použité látce, velikosti dávky, způsobu aplikace, druhu a věku ryby, teplotě vody atd. Kromě toho jsou výsledky ovlivněny i citlivostí použité metody. Ze studia literárních údajů k této problematice je však zřejmé, že kontaminace svaloviny reziduí inhibičních látek není u ryb tak závažným problémem jako u jatečných zvířat. B a n k (1976) nezjistil rezidua ve svalovině kaprů již dva dny po injekční aplikaci 5 mg terramycinu, nebo po pětidenním perorálním podávání směsi obsahující 192 mg terramycinu, event. 160 mg terramycinu a 40 mg oleandomycinu v 1 kg krmiva. M a n n (1967) po dávce 2 mg terramycinu neidentifikoval jeho rezidua v mase kaprů dokonce již za jeden den po aplikaci. V jiné práci popisuje M a n n (1968) negativní výsledek po 110denním zkrmování směsí s obsahem 50 nebo 100 mg zinkbacitracinu u pstruhů. Š e v č í k aj. (1969) pracovali s čs. přípravkem Karpex (Rupin), obsahujícím 2,773 g chloramfenikolpalmitátu v 1 kg. Krevní sérum kaprů bylo prosté inhibičních látek již za 96 hodin, játra a svalovina za 14 dní po poslední aplikaci. K o z l o w s k i (1965) po aplikaci 2 až 8 mg chloromycetinu u kaprů zjistil perzistenci reziduí: za 96 až 120 hodin v krvi, 72 až 96 hodin ve slezině a svalstvu a za 120 hodin v ledvinách.

Jedině po aplikaci depotních injekcí jsou popisovány delší intervaly při vylučování antibiotika z organismu ryb. Tak např. V o l f a H a v e l k a (1958) prokázali, že chloromycetin podaný ve vysoké dávce (66 mg kg^{-1}) v olejové suspenzi přetrvává v krvi kapra až 28 dní. V l a d i m í r o v (1971) injikoval kaprům jednorázově i. p. 200 mg chloramfenikolu s vazelínou a lanolínem a zjišťoval antibiotikum v krvi podle teploty vody až do 50, resp. 175 dní.

U jiných druhů ryb jsou dostupné údaje poněkud rozdílné. E v e l y n (1969) udává, že po perorální aplikaci krmiva obsahujícího 50 mg chloramfenikolu v 1 kg lososovitým druhům ryb jsou po 24 hodinách rezidua ve tkáních pod hranicí průkaznosti. Naproti tomu W e b e r a R i d g e w a y (1966) po podání terramycinu v dávce 250 mg kg^{-1} po tři až čtyři dny tichomořským lososům identifikovali rezidua podané látky v kostře ryb ještě za tři a půl roku. U sumcovitých druhů ryb popsali F r i b o u r g h aj. (1969) pozitivní výsledek po aplikaci terramycinu v séru a svalovině do dvou dnů, v játrech až do 21 dne.

Nejčastěji bylo sledováno vylučování antimikrobiálních látek z organismu pstruhů, především pstruha duhového. S i l v é n aj. (1968) prokázali rezidua terramycinu (dávka 15 mg na kus a den po dobu pěti dní) v játrech, žluči a ledvinách za 24 dny, ve svalovině za 17 dní. Po aplikaci sulfamerazinu (40 mg na kus a den po dobu pěti dní) byla játra pozitivní za deset dní, ledviny a svalovina za sedm a žluč za tři dny po posledním podání. H e r m a n n aj. (1969) uvádějí, že podle teploty vody jsou po dávce 75 mg na kus a den, podávané po 14 dní, zbytky terramycinu prokazatelné ve svalovině duhových pstruhů ještě za 14 až 28 dní, u potočních pstruhů za 10 až 28 dní. G l e n d e aj.

[1974] aplikovali v pokusech 201 duhovému pstruhu chlortetracyklin v různých dávkách (od 50 do 200 mg na rybu či na kilogram krmiva) a po různě dlouhou dobu. Z jejich uzávěrů vyplývá, že při obvyklém dávkování medikovaného krmiva (200 mg CTC kg⁻¹) nelze očekávat ve svalovině antimikrobiálně aktivní rezidua již za 48 hodin. V játrech a žluči zjišťovali rezidua až do 15 dní, ale tuto skutečnost vysvětlují zpětnou resorbcí antibiotika z trávicího traktu do jater. Obecně stanovují karenční lhůtu na pět až sedm dní. Mc Cracken aj. (1976) u téhož druhu ryb popisují tyto výsledky: po i. p. aplikaci chloramfenikolu a framycetinu je výsledek negativní již za sedm dní, rezidua oxytetracyklinu přetrvávají 28 dní a po podání sulfadiazinu s trimetoprimem byl nález ještě za 77 dní. Po těchto dvou léčivech navrhuji karenční lhůtu více než měsíční. Naopak po orální aplikaci není nezbytné vzhledem k rychlému odbourávání reziduí dodržovat karenční lhůtu 10 až 14 dní.

I když uvedených výsledků bylo dosaženo různými metodickými postupy, a proto je nelze zcela objektivně srovnávat, je možné obecně charakterizovat teoretickou možnost zachytu antimikrobiálně aktivních reziduí v organismu ryb takto: při injekční aplikaci vhodných roztoků antimikrobiálních léčiv lze jen v ojedinělých případech předpokládat výskyt reziduí těchto látek po dobu delší než 28 dní; při aplikaci medikovaných krmiv je rybí svalovina nositelem reziduí většinou jen několik dní, a tedy karenční lhůtu 10 až 14 dní lze pokládat za naprosto postačitelou. Přihlédneme-li k anamnestickým údajům a vlastním získaným výsledkům, je nepravděpodobné, že malé inhibiční zóny ve vzorcích hepatopankreatu, žluče a pylorových vaků byly způsobeny aplikací léčiv. Jejich vysvětlení snad spočívá v zachytu přirozených antimikrobiálních látek v těle ryb, pravděpodobně na bázi inhibitorů enzymatických systémů.

Literatura

- BANK, O.: Keine Rückstände in der Muskulatur von Karpfen nach Dauerverfütterung antibiotikahaltigen Trockenfutters (Carpi). *Fischwirtschaft*, 17, 1976, s. 11-13.
- EVELYN, T. P. T.: Tissue levels of chloramphenicol attained in sockeye (*Onchophrynchus nerka*) and coho (*O. Kisutch*) salmon by feedings. *Bull. Off. int. Epizoot.*, 69, 1969, s. 1453-1463.
- FRIBOURGH, J. H. — ROBINSON, J. A. — MEYER, F. P.: Oxytetracycline residues in tissues of blue and channel catfishes. *Fish Wildlife Serv.*, 1969, č. 38, s. 1-7.
- GLENDE, W. — WENZEL, S. — ROTH, L.: Untersuchungen über die Antibiotikaverweildauer und den Antibiotikagehalt in Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) nach peroraler Verabreichung verschiedener Chlortetracyclindosen. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 25, 1974, s. 124-129.
- HERMANN, R. L. — COLLIS, D. — BULLOCK, G. L.: Oxytetracycline residues in different tissues of trout. *Fish Wildlife Serv.*, 1969, č. 37, s. 1-6.
- KOZŁOWSKI, F.: Zteżenia chloromycetyny we krwi i w niektórych tkankach karpi w zapobiegawczym stosowaniu antybiotyku przeciw posocznicy karpi. *Polskie Archiwum wet.*, 9, 1965, s. 303-321.
- KUČERA, P.: Rezidua inhibičních látek v mase nutně odporážených zvířat. *Čs. Hyg.*, 14, 1969, s. 315-321.
- MALÍKOVÁ, M. — BARTOŠ, J. — HABRDA, J. — STRÁŽNICKÝ, M.: Rezidua antimikrobiálních látek v mase a orgánech nutně porážených a uhynulých telat. *Vet. Med.*, Praha, 19, 1974, s. 433-444.
- MALÍKOVÁ, M. — HABRDA, J.: Rezidua chloramfenikolu v organismu telat po parenterální aplikaci čs. přípravku Chronicin inj. *Vet. Med.*, Praha, 21, 1976, s. 175-185.

MALÍKOVÁ, M. — HABRDA, J. — BARTOŠ, J.: Rezidua antimikrobiálních látek v mase a orgánech jatečných telat. Vet. Med., Praha, 20, 1975, s. 1-12.

MANN, H.: Weitere Versuche zur Frage der Antibiotikarückstände im Fischfleisch. Fischwirtschaft, 17, 1967, s. 13-14.

MANN, H.: Fütterungsversuche an Forellen bei Zusatz von Zinkbacitracin. Fischwirtschaft, 18, 1968, s. 116-120.

PICHNARČIK, J. — SIKLENKA, P. — ŠTEFUNKA, F.: Výskyt inhibičních látek v mase a orgánech klinicky zdravých jatočně odporázaných ošípaných, hovädzieho dobytky, kurčiat a moriek. Vet. Čas., 16, 1974, s. 41-48.

SILVÉN, L. — JOHANSSON, N. — LJUNGBERG, O.: Terramycin and sulphamerazine residues in muscle tissue and interior organs of rainbow trout after oral drug treatment. Bull. Off. int. Epizoot., 69, 1968, s. 1465-1474.

ŠEVČÍK, B. — KRÁL, J. — DVOŘÁK, M. — DANĚK, J. — UNGERMANN, B.: Prevence a terapie infekční vodnatelnosti ryb novým perorálním antibiotickým přípravkem Karpex. Veterinaria, Spofa, XI, 1969, s. 109-157.

VLADIMÍROV, V.: Zum Schutz vor Schwimmblasenentzündung durch Chloramphenicol. Wie kann man Antibiotika im Organismus von Fischen zurückhalten? Fischbauer, 22, 1971, s. 1154-1155. In: GLENDE aj.: Untersuchungen über die Antibiotikaverweildauer und den Antibiotikagehalt in Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) nach peroraler Verabreichung verschiedener Chlortetracyclindosen. Arch. Lebensmittelhyg., 25, 1974, s. 124-129.

VOLF, F. — HAVELKA, J.: Použití chloromycetinu v tlumení infekční vodnatelnosti kaprů. Sb. ČSAZV — Živočišná Výroba, 3, 1958, s. 299-310.

WEBER, D. — RIDGWAY, G. G.: Marking Pacific — Salmon with tetracycline antibiotics. J. Fish. Res. Bd. Can., 24, 1966, s. 849-865.

ANON.: Více ryb a nově. Věda a život, 22, 1977, s. 256

Došlo dne 9. 6. 1978

МАЛИКОВА, М. — ГАБРДА, Й. — МАТИАШ, З. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): Исследование товарного карпа на остатки антимикробных веществ. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 549-554.

По методу микробиологической диффузии определяли остатки ингибиторов в мышечной ткани, гепатопанкреасе, желче и пилорических мешках 30 товарных карпов, происходящих из прудов с южной стороны Брно. Были использованы следующие микроорганизмы для тестов: *B. cereus* var. *mycoides* (ATCC 11778), *B. subtilis* (ATCC 6633), *Sarcina lutea* (ATCC 9341) и *Micrococcus flavus* (ATCC 10240). Остатки ингибиторов не обнаружены ни в одном из исследуемых образцов мышечной ткани. В остальных тканях в некоторых случаях установлены малые ингибиторные зоны, причина которых, однако, состоит скорее в наличии естественных микробиально активных веществ в желче и гастроинтестинальном тракте, а не в персистенции остатков медикаментов, которые рыбам скармливали в течение их жизни.

пресноводные рыбы; антибиотики; микробиологический диффузионный метод; мышечная ткань; гепатопанкреас; желчь; пилорические мешки

MALÍKOVÁ, M. — HABRDA, J. — MATYÁŠ, Z. (Veterinary Research Institute, Brno): Examination of Market Carp for Residues of Antimicrobial Substances. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 549-554.

The residues of inhibitory substances in the muscle, hepatopancreas, bile, and pyloric caeca of 30 carps from ponds south of Brno were examined by the microbiological diffusion method. The following testing micro-organisms were used: *B. cereus* var. *mycoides* (ATCC 11778), *B. subtilis* (ATCC 6633), *Sarcina lutea* (ATCC 9341), and *Micrococcus flavus* (ATCC 10240). Residues of inhibitory substances were not found in any of the muscle samples tested. The rest of the tested tissues showed, in some cases, small inhibition zones which seem to be due to the presence of natural antimicrobially active substances in the bile and gastro-intestinal tract of the fish rather than to the persistence of the residues of drugs given to the fish during their life.

freshwater fish; antibiotics; microbiological diffusion method; muscle; hepatopancreas; bile; pyloric caeca

medizin, Brno): *Untersuchungen von Marktkarpfen auf Residuen antimikrobieller Stoffe*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 549-554.

Mit Hilfe der mikrobiologischen Diffusiosnmethode stellten wir Residuen von Inhibitionsstoffen in der Muskulatur, im Hepatopankreas, in der Galle und in den Pylorussäcken bei 30 aus Teichen südlich von Brno stammenden Marktkarpfen fest. Wir benutzten folgende Testmikroorganismen: *B. cereus* var. *mycoides* (ATCC 11778), *B. subtilis* (ATCC 6633), *Sarcina lutea* (ATCC 9341) und *Micrococcus flavus* (ATCC 10240). In keinen der untersuchten Muskelproben konnten Residuen von Inhibitionsstoffen festgestellt werden. Die übrigen getesteten Gewebe wiesen in einiger Fällen Inhibitionszonen auf, deren Ursache aber mehr in der Anwesenheit von natürlichen antimikrobiellen aktiven Stoffen in der Galle und im gastrointestinalen Trakt der Fische, keinesfalls aber in der Persistenz von Residuen der während des Lebens der Fische verabreichten Medikamenten besteht.

Süßwasserfische; Antibiotika; mikrobielle Diffusionsmethode; Muskulatur; Hepatopankreas; Galle; Pylorussäcke

Adresa autorů:

MVDr. Milena Malíková, CSc., MVDr. Jan Habrda, prof. MVDr. Zdeněk Matyáš, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno-Medlánky

D. Veselý, D. Veselá, V. Kusák, P. Nesnídal

VESELÝ, D. — VESELÁ, D. — KUSÁK, V. — NESNÍDAL, P. (Ústav experimentální medicíny CSAV, Praha): *Distribuce perorálně podaného aflatoxinu B₁ ve tkáních a orgánech kozy (Capra)*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 555-558.

V pokuse jsme podávali koze celkem 450 mg aflatoxinu B₁. Mléko shromážděné během pokusu jsme lyofilizovali a izolovali jsme aflatoxiny B₁ a M₁. Po uhybnutí jsme analyzovali některé tkáně, krev a žluč pokusného zvířete na obsah aflatoxinů.

aflatoxin B₁; aflatoxin M₁; mléko; tkáně

Aflatoxin B₁ zkonzumovaný s potravou, se částečně z organismu vylučuje, částečně se kumuluje ve tkáních, především v játrech [Patterson, 1973]. Je to jedna z možností, jak proniká aflatoxin B₁ do potravinového řetězce. Další nebezpečí vzniká tím, že aflatoxin B₁ proniká do mléka savců.

Při dietě obsahující malé množství aflatoxinu B₁ se objevuje v mléce jako metabolit nazývaný aflatoxin M₁, který je téměř stejně toxický jako aflatoxin B₁ (Allcroft aj., 1966). Při vyšších dávkách aflatoxinu B₁ v potravě se v mléce vyskytují aflatoxiny oba (Purchase, 1972). Stejně mechanismy probíhají i v lidském organismu (Shank aj., 1971).

V uplynulých letech jsme analyzovali několik desítek vzorků lidských jater, krve, žluči a jiných látek, ve kterých jsme prokázali aflatoxin B₁. V několika případech byly vedle většího množství obsahu aflatoxinu B₁ izolovány dvě látky spektrofotometricky podobné aflatoxinu B₁. Podle výsledků TLC bylo možné předpokládat, že jednou z těchto látek je aflatoxin M₁ (Veselá aj., 1976).

Abychom mohli ověřit, jedná-li se skutečně o aflatoxin M₁, bylo třeba jej připravit. Technicky nejvhodnější byla izolace aflatoxinu M₁ z mléka kozy. Po skončení pokusu jsme analyzovali tkáně a tělní tekutiny pokusného zvířete na obsah aflatoxinu.

MATERIÁL A METODY

Koza domácí, šest let stará, o hmotnosti 50 kg, byla umístěna v nízké plechové vaně s roštem a výpustným kohoutem. Dřevěné státní bylo vyloženo PE fólií, svedenou do vany.

Zvířeti jsme podávali sondou do bachu krystalický aflatoxin B₁ připravený podle patentu (Kusák aj., 1975). Pokus trval deset dnů — až do uhybnutí zvířete. Aflatoxin B₁ byl podán v pěti dávkách: první den 50 mg, čtvrtý, sedmý, osmý a de-

váty den po 100 mg. Pokusné zvíře jsme krmili zelenou pící a šrotem. Veterinární dozor při pokuse a histologické vyšetření orgánů nemohly být zajištěny.

Mléko bylo odebíráno dvakrát denně – ráno a večer. Do pátého dne pokusu byla produkce mléka rovnoměrná (asi 1400 ml denně). Šestý den klesla na 630 ml a klesala dále až na 100 ml devátého dne. Šestý den pokusu se začal zhoršovat i zdravotní stav zvířete; od osmého dne bylo apatické, přestalo přijímat potravu a téměř nevyměšovalo.

Uhynulé zvíře jsme pitvali a odebrali jsme vzorky tkání a tělních tekutin, které jsme uložili do boxu při teplotě -20°C . Při pitvě jsme zjistili naplněné předžaludky i žlučník a mírné krvácení v mizních uzlinách.

Zbytky zvířete, krmiva a pevných odpadů byly spáleny. Celé stání bylo důkladně omyto 5% roztokem chlornanu sodného a opláchnuto vodou.

ANALÝZA PRODUKTŮ

Vzorky tkání jsme zbavili blan a větších cév, rozemleli v masovém strojků, rozmixovali v kuchyňském mixéru s vodou na řídkou kaši a lyofilizovali v transfúzních láhvích v zařízení LZ 9d, fy. Chirana. Ve stejném zařízení bylo lyofilizováno také získané mléko.

10 až 20 g lyofilizovaného vzorku jsme extrahovali třikrát 100 ml chloroformu a spojené extrakty jsme odpařili v rotačním vakuovém odpařováku. Zbytek jsme rozpustili 20 ml směsí n-hexan – aceton (1 : 1), zředili 100 ml vody, proteiny vysráželi 10 ml roztoku octanu olovnatého ($200 \text{ g Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O} + 3 \text{ ml}$ ledové kyseliny octové v 1000 ml vody) a po pěti minutách stání jsme přebytek olovnatých iontů vysráželi 10 ml roztoku nasyceného siranu sodného. Suspenzi jsme odstředili při 9000 g a supernatant jsme převedli do dělicí nálevky.

Lipidy jsme extrahovali třikrát 50 ml n-hexanu. Aflatoxiny z vodné fáze jsme extrahovali dvakrát 50 ml chloroformu. Spojené chloroformové extrakty jsme přefiltrovali přes bezvodý síran sodný a odpařili do sucha na vodní lázni.

Extrakt rozpuštěný v minimálním množství chloroformu byl nanesen na chromatografický sloupec tvořený 4 g silikagelu H (Typ 60) fy Merck v kolonce o průměru 2 cm.

Část nečistot byla eluována 20 ml směsí n-hexan – dietyléter (1 : 1) a aflatoxin B₁ byl vymýván ze sloupce směsí chloroform – aceton (9 : 1). Zóna modře fluoreskující v UV-světle byla zachycena a po odpaření eluční směsí na vodní lázni rozpuštěna v metanolu a proměřena spektrofotometrem UNICAM SP. 8000. Množství aflatoxinu B₁ jsme vypočítali v maximu extinkčního spektra při vlnové délce 362 nm, $\epsilon = 21\,800$.

Lyofilizované mléko jsme analyzovali metodou podle Stubblefielda aj. (1973), konečný extrakt byl přečištěn na stejně připraveném chromatografickém sloupci jako při analýze tkání. Chromatografický sloupec jsme nejprve eluovali směsí chloroform – aceton (9 : 1) zachytili zónu aflatoxinu B₁ a spektrofotometricky proměřili (jak bylo již popsáno). Potom byla eluční soustava odsáta, nahrazena soustavou chloroform – aceton – izopropanol (85 : 10 : 5) a zachycena další v UV-světle modře fluoreskující zóna aflatoxinu M₁. Po odpaření eluční směsí na vodní lázni byl zbytek rozpuštěn v metanolu a spektrofotometricky proměřen. Množství aflatoxinu M₁ jsme vypočítali v maximu extinkčního spektra při vlnové délce 357 nm, $\epsilon = 19\,950$ (Stubblefield aj., 1973).

Totožnost aflatoxinů B₁ a M₁ jsme ověřili TLC na deskách Silufol a na hotových silikagelových fóliích typu 60 F₂₅₄ fy. Merck. Izolovaný aflatoxin B₁ jsme porovnávali TLC a spektrofotometricky s preparátem podávaným zvířeti a výrobkem fy. Calbiochem. Aflatoxin M₁ jsme porovnali TLC s literárními údaji (Butler, 1974), se kterými byl v dobré shodě. Pro TLC byly použity eluční soustavy: chloroform – aceton (9 : 1), chloroform – metanol (97 : 3), chloroform – aceton – izopropanol (85 : 10 : 5), benzen – metanol – ledová kyselina octová (90 : 5 : 5) a dietyléter.

Toxicitu aflatoxinů B₁ a M₁ izolovaných z mléka jsme zkoušeli na tří denních káčatech o průměrné hmotnosti 65 g. Aflatoxiny byly aplikovány do volete v 0,25 ml 20% dimetylsulfoxidu v množství 20 μg na káče. Kontrolní skupině deseti káčat bylo aplikováno rozpouštědlo.

Třem káčatům byl podán aflatoxin B₁ a po pěti dnech byly vyhodnoceny histologické změny v játrech. Čtyři káčata, kterým byl podán aflatoxin M₁, uhynula za 36 hodin.

U všech káčat obou skupin byly v játrech nalezeny histologické změny charakteristické pro expozici aflatoxiny.

Homogenizované lyofilizované mléko pokusného zvířete obsahovalo 165 μg aflatoxinu B_1 a 650 μg aflatoxinu M_1 v jednom kilogramu. Aflatoxin M_1 se objevil v mléce již první den pokusu v množství 20 μg kg^{-1} . Aflatoxin B_1 byl pozorován v mléce až v dalších dnech pokusu. Poslední získané mléko obsahovalo 2030 μg aflatoxinu B_1 a 1690 μg aflatoxinu M_1 na kilogram lyofilizovaného produktu.

Několik hodin po podání první dávky aflatoxinu B_1 se objevily v moči zvířete aflatoxiny M_1 a B_1 a byly ověřeny TLC. Kvantitativně nebyly vyhodnoceny.

Obsah aflatoxinu B_1 v lyofilizovaných tkáních, krvi a žluči pokusného zvířete uvádí tab. I. Aflatoxin B_1 doprovázelo ve všech tkáních malé množství aflatoxinu M_1 , který byl dokázán TLC.

I. Obsah aflatoxinu B_1 v lyofilizovaných tkáních, žluči a krvi — Aflatoxin B_1 content in lyophilized tissues, bile and blood

Materiál	Nalezený aflatoxin B_1 (μg kg^{-1})
Játra	310
Ledviny	460
Plíce	510
Mozek	75
Srdce	475
Zadní svalovina	585
Slezina	30
Žluč	23
Krev	8

DISKUSE

Práci jsme zaměřili především na to, abychom získali maximální množství aflatoxinu M_1 z mléka pokusného zvířete. Použití kozy k podobnému pokusu nebylo v literatuře nalezeno. První dávka aflatoxinu B_1 byla zvolena 1 mg kg^{-1} hmotnosti zvířete analogicky s již citovanou prací (Allcroft aj., 1966), kde byla pokusným zvířetem ovce. První dávku aflatoxinu B_1 snášela koza dobře, ale vznikly potíže se zpracováním mléka, proto byly od čtvrtého dne pokusu dávky zvýšeny.

Výsledky získané analýzou mléka nelze srovnávat s prací Polana aj. (1974) a dalších autorů v práci citovaných, kteří podávali aflatoxin B_1 krávám v dávkách podstatně nižších a sledovali jiné cíle. Vysoký obsah aflatoxinu B_1 v mléce pokusného zvířete, který se projevil zvláště v mléce získaném poslední den pokusu, lze vysvětlit velkými dávkami aflatoxinu B_1 .

Tkání zvířete bylo použito k ověření metodiky pro analýzu pitevnických materiálů. Distribuce aflatoxinu B_1 do jednotlivých tkání kozy pravděpodobně odpovídá distribuci po akutní otravě dospělého zvířete.

Poděkování: Autoři děkují MUDr. I. Dvořáčkové z fakultní nemocnice v Hradci Králové za histologické vyšetření zkoušek toxicity, E. Fárové a L. Sedláčkové za asistenci při práci s pokusným zvířetem.

Literatura

ALLCROFT, R. — ROGERS, H. — LEWIS, G. — NABNEY, J. — BEST, P. E.: Metabolism of aflatoxin in sheep: excretion of the milk toxin. *Nature*, 209, 1966, s. 154-155.

BUTLER, W. H.: in: PURCHASE, I. F. H.: Mycotoxins. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam 1974.

KUSÁK, V. — VESELÝ, D. — PETRŽALCOVÁ, D.: Aflatoxin mixtures with growth-stimulating and neoplasm-inhibitory effects. Chem. Abstr., 82, 1975.

PATTERSON, D. S. P.: Metabolism as a factor in determining the toxic action of the aflatoxins in different animal species. Fd Cosmet. Toxicol., 11, 1973, s. 287-294.

POLAN, C. E. — HAYES, J. R. — CAMPBELL, T. C.: Consumption and fate of aflatoxin B₁ by lactating cows. J. agric. Fd. Chem., 22, 1974, s. 635-638.

PURCHASE, I. F. H.: Aflatoxin residues in food of animal origin. Fd Cosmet. Toxicol., 10, 1972, s. 531-544.

SHANK, R. C. — BOURGEOIS, CH. — KESCHAMRAS, N. — CHANDVIMOL, P.: Aflatoxins and autopsy specimens from the children with an acute disease of unknown aetiology. Fd. Cosmet. Toxicol., 9, 1971, s. 501-507.

STUBBLEFIELD, R. D. — SHANNON, G. M. — SHOTWELL, O. L.: Aflatoxin M₁ in milk: Evaluation of methods. J. Ass. off. analyt. Chem., 56, 1973, č. 5.

VESELÁ, D. — VESELÝ, D. — NESNÍDAL, P. — KUSÁK, V.: Nebezpečí kontaminace Sunaru a výrobků ze sušeného mléka aflatoxiny. Acta Hyg., Epidem., Microbiol., IV, 1976, č. 3, s. 31-34.

Došlo dne 23. 2. 1977

ВЕСЕЛЫ, Д. — ВЕСЕЛА, Д. — КУСАК, В. — НЕСНИДАЛ, П. (Институт экспериментальной медицины ЧСАН, Прага): Распределение получаемого через рот aflatoxina B₁ в тканях и органах козы (Capra). Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 555-558.

Во время опыта козе давалось в общем 450 мг aflatoxina B₁. Молоко, накопленное в ходе опыта, лиофилизировалось и изолировались aflatoxины B₁ и M₁. После гибели анализировались некоторые ткани, кровь и желчь опытного животного на содержание aflatoксинов.

aflatoxin B₁; aflatoxin M₁; молоко, ткани

VESELÝ, D. — VESELÁ, D. — KUSÁK, V. — NESNÍDAL, P. (Institute of Experimental Medicine, Czechoslovak Academy of Sciences, Praha): Distribution of Perorally Administered Aflatoxin B₁ in the Tissues and Organs of Goat (Capra). Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 555-558.

In the experiment the goat was administered an amount of 450 mg aflatoxin B₁. The milk taken during the experiment was lyophilized and aflatoxins B₁ and M₁ were isolated. After the death of the goat some tissues, blood and bile of the experimental animal were analyzed to find out the aflatoxin content.

aflatoxin B₁; aflatoxin M₁; milk; tissues

VESELÝ, D. — VESELÁ, D. — KUSÁK, V. — NESNÍDAL, P. (Institut für experimentale Medizin der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Praha): Distribution vom peroral verabreichten Aflatoxin B₁ Geweben und Organen der Ziege (Capra). Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 555-558.

In einem Versuch wurden einer Ziege insgesamt 450 mg Aflatoxin B₁ verabreicht. Die während des Versuches angesammelte Milch lyophilisierten wir und isolierten die Aflatoxine B₁ und M₁. Nach dem Eingehen analysierten wir manche Gewebe, Blut und Galle des Versuchstieres, um den Gehalt an Aflatoxin festzustellen.

Aflatoxin B₁; Aflatoxin M₁; Milch; Gewebe

Adresa autorů:

Ing. Drahomír Veselý, ing. Doubravka Veselá, Petr Nesnídal, Ústav experimentální medicíny ČSAV, 517 83 Olešnice v Orlických horách 14

Doc. MUDr. Vlastimil Kusák, DrSc., člen korespondent ČSAV, ředitel Ústavu experimentální medicíny ČSAV, náměstek ministra zdravotnictví ČSR, ministerstvo zdravotnictví ČSR, poštovní příhrádka č. 60, 120 37 Praha 2

J. Bartoš, Z. Matyáš

BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Výběr metod pro zjišťování přítomnosti aflatoxinů v tekutém mléce*. Vet.Med., Praha, 23, 1978 (9) : 559-567.

Přezkoušeli jsem celkem sedm metod doporučených na sledování přítomnosti aflatoxinů v tekutém mléce. Většinu metod jsme různě modifikovali, především pro nedostatek některých chemikálií. Vzorky tekutých mlék určených pro přímý konzum jsme odebírali z běžné obchodní sítě (mléko v lahvích, igelitových sáčkách, speciálním obalu — trvanlivé). V práci je podrobně popsán pracovní postup dvou metod, které se nám v současné době jeví jako vhodné pro běžné screeningové vyšetřování obchodních vzorků tekutých mlék. Těmito metodami jsme vyšetřili 70 vzorků obchodních tekutých mlék, z nichž 25 bylo pozitivních. Ani v jednom vzorku však nedosáhla koncentrace aflatoxinu navrhované přípustné koncentrace pro potraviny.

cizorodé látky; mykotoxiny; analytické metody; screening; TLC

Významem aflatoxinů v mléčném průmyslu se velmi podrobně zabýval Kiermeier [1974]. Mléko a mléčné výrobky mohou být kontaminovány přímo plísněmi *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*, nebo nepřímo kontaminovaným krmivem. V organismu zvířete se v játrech metabolizuje aflatoxin B₁ a B₂ a mlékem se pak vylučuje aflatoxin M₁ a M₂. Aflatoxin M₁ je podobně toxický jako aflatoxin B₁ a G₁. Lancaster aj. [1961] zjistili jako první kancerogenní účinek aflatoxinu M₁. Aflatoxin M₁ se může prokázat v mléce již za 12 hodin po zkrmení krmiva obsahujícího aflatoxin. Vylučování aflatoxinu M₁ je ukončeno do čtyř dnů, někteří autoři uvádějí až sedm dní. Purchase [1973] doporučuje vyloučit mléko z konzumu po dobu dvou až pěti dnů po skončení zkrmování krmiva s obsahem aflatoxinu.

Vývojem metod na zjišťování aflatoxinů v tekutém mléce se zabývali mnozí autoři, které všechny nemůžeme citovat pro nedostatek místa.

Nejstaršími popsány metodami bylo možné zjistit 1 $\mu\text{g l}^{-1}$. Vývojem metod se postupně zvyšuje možnost zachycení nižších koncentrací. Tak např. Jacobson aj. (1971) uvedli citlivost metody 0,5 až 0,1 $\mu\text{g l}^{-1}$, Kiermeier a Mücke (1972) již 0,04 $\mu\text{g l}^{-1}$, Stubblefield aj. (1973) 0,1 $\mu\text{g l}^{-1}$, Pons aj. (1973) 0,05 $\mu\text{g l}^{-1}$, Schuller aj. (1973) 0,05 $\mu\text{g l}^{-1}$. Tuinstra a Bronsgeest (1975) vypracovali metodu s citlivostí 0,004 μg v jednom litru mléka (= 4 ng l⁻¹). Bodine aj. (1977) uvádějí možnost detekce 0,005 $\mu\text{g l}^{-1}$. Můžeme předpokládat, že metody se budou i nadále zdokonalovat nejen z hlediska citlivosti, ale také vzhledem k časové náročnosti a k nákladům na rozbor.

Úkolem této práce bylo vybrat vhodnou screeningovou metodu na zjišťování přítomnosti aflatoxinů v tekutém mléce, která by byla přijatelná pro naše podmínky z hlediska chemikálií a laboratorního vybavení.

MATERIÁL A METODY

Při vyhledávání nejvhodnějších metod pro analýzu tekutého mléka na přítomnost aflatoxinů jsme se z celé řady nejrozličnějších postupů zaměřili na tyto práce: Jacobson aj. (1971), Pons aj. (1973), Stubblefield aj. (1973), Schuller aj. (1973), Fritz aj. (1977). Tuinstra a Bronsgeest (1975), Kiermeier aj. (1977). Převážnou většinu metod jsme však museli nejrozličnějším způsobem modifikovat, především proto, že jsme neměli vhodné chemikálie.

Vzorky tekutých mlék jsme odebírali z normální obchodní sítě. Při vyhledávání nejvhodnějších metod jsme celkem použili 95 vzorků mlék. Z toho 25 vzorků jsme použili na různé modifikace metod Jacobsona aj. (1971), Pons aj. (1973), Stubblefielda aj. (1973) a Kiermeiera aj. (1977). Některé vzorky jsme zpracovali až pěti různými postupy, celkově jsme udělali 169 různých testů. Metodami podle Schullera aj. (1973) a Fritze aj. (1977) jsme vyšetřili 27 vzorků a metodou podle Tuinstry a Bronsgeesta (1975) jsme analyzovali 43 vzorky. Vzorky jsme odebírali z běžné obchodní sítě a vyšetřovali jsme mléko plněné ve sklenicích (2 % tuku), v igelitových sáčcích (2 a 3,5 % tuku) a tekuté mléko trvanlivé s obsahem 3,5 % tuku (Milex, n. p., Bratislava). K některým vzorkům jsme uměle přidávali standardy aflatoxinů M_1 , popřípadě i B_1 . Převážnou většinu vzorků jsme vyšetřovali dvojmo. První vyšetření bylo bez přídavku aflatoxinů, druhé s přidáním standardů na fólii nebo v některých případech přímo k vzorkům. Pokusy probíhaly od února do prosince 1977.

VÝSLEDKY A DISKUSE

V první fázi pokusů jsme použili metodu, kterou popsali Jacobson aj. (1971). Pracovní postup jsme částečně upravili. Místo Celitu jsme použili Hyflo Super Cel, místo hexanu petroléter a vynechali jsme čištění na sloupcích. Vyvíjeli jsme nejdříve v dietyléteru, pak ve směsi chloroform : aceton (9:1). Při použití pouze standardu aflatoxinu B_1 jsou tímto postupem dobře odděleny nečistoty. Pro hledání přítomnosti jak aflatoxinu B_1 , tak i M_1 jsme přistoupili k další modifikaci, a to ve způsobu nanášení vzorků. Použili jsme fólie rozměrů 20 × 20 cm a na úhlopříčku jsme nanášeli vzorek se standardem. K vyvíjení jsme použili v prvním směru dietyléter, v druhém směs chloroform : aceton : izopropanol (85:10:5). Tímto způsobem se poměrně dobře oddělily nečistoty od standardů. Při zpracování některých vzorků mlék jsme však zjišťovali velké množství nečistot, které ztěžovaly posuzování. V orientačních pokusech s některými našimi modifikacemi postupů, které popsali Pons aj. (1973), Stubblefield aj. (1973), Kiermeier a Weiss (1976) a Kiermeier aj. (1977), jsme dospěli k podobným závěrům. Pro zvýšení citlivosti metod jsme nanášeli na plotny vždy veškeré množství extraktu. Proto jsme se při použití uvedených námi modifikovaných metod setkávali s poměrně velkým množstvím nečistot.

Vzhledem k našim podmínkám se nám jeví metoda, kterou popsali Schuller aj. (1973) a kterou nepatrně upravili Fritz aj. (1977), jako vhodnější. V našich podmínkách jsme museli nahradit Celit 545 křemelinou Hyflo Super Cel a n-pentan petroléterem. Při použití těchto dvou modifikací jsme si zjistili, že po přidání 5 ng aflatoxinu B_1 a 5 ng aflatoxinu M_1 k 25 ml mléka jsou aflatoxiny dobře detekovatelné. Proto jsme dále snížili množství obou aflatoxinů přidávaných k mléku o po-

lovinu. Tyto koncentrace byly velmi slabé, přece však byly ještě patrné a odpovídající citlivosti metody $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$. Naproti tomu Schuller aj. (1973) udávají větší citlivost metody $0,05 \mu\text{g l}^{-1}$. Rozdíly mohou být způsobeny lepším přístrojovým vybavením a kvalitnějšími chemikáliemi včetně standardu. Popsaná metoda umožňuje stanovit aflatoxiny M_1 i B_1 současně. Ve své práci jsme použili tento postup: K 25 ml tekutého mléka jsme přidali 25 ml acetonu a 30 g Hyflo Super Cel (v ojedinělých případech jsme použili Celit 545). Abychom mohli lépe přenést kaši do chromatografického sloupce (délka 350 mm, šířka 28 mm), přidávali jsme ještě chloroform, jímž jsme také vypláchli kádinku. Kaši jsme přelávali do sloupce nálevkou. Použili jsme asi 100 ml chloroformu. Po přenesení veškeré kaše na sloupec jsme přidali dalších 100 ml chloroformu, takže jsme eluovali sloupec celkovým množstvím 200 ml. Po překápání veškerého množství chloroformu do baňky jsme chloroformový extrakt odpařili při teplotě 40°C téměř do sucha rotačním vakuovým odpařovákem. Reziduum v baňce jsme rozpustili v 50 ml metanolu a přidali 40 ml petroléteru (v ojedinělých případech jsme použili n-pentan). Obsah jsme přelili kvantitativně do 250 ml dělicí nálevky, obsahující 3 g chloridu sodného v 75 ml destilované vody. Vodnou fázi jsme přenesli do další dělicí nálevky, přidali 50 ml petroléteru (v ojedinělých případech jsme použili n-pentan) a vytřepávali nečistoty. Po oddělení vodné fáze jsme tuto přenesli do další 250 ml dělicí nálevky a vytřepávali čtyřikrát 30 ml chloroformu. Chloroformové extrakty jsme sbírali do 250 ml baňky a odpařili na rotačním vakuovém odpařováku. Reziduum jsme přenesli kvantitativně v 5 ml chloroformu do lékovky, chloroform jsme odpařili pod dusíkem. Reziduum jsme rozpustili ve $100 \mu\text{l}$ chloroformu a nanášeli na neaktivovanou tenkou vrstvu silikagelu (Silufol UV 254, Sklářny Kavalier, n. p.). Veškeré množství vzorku, odpovídající 25 ml mléka, jsme nanесли na jeden bod $2,5 \text{ cm}$ nad spodním okrajem a $2,5 \text{ cm}$ od levé strany. Standardy aflatoxinů jsme umístili $2,5 \text{ cm}$ od levé strany a $2,5 \text{ cm}$ od horního okraje fólie. Pro druhý směr jsme nanášeli standardy na bod umístěný $2,5 \text{ cm}$ nad spodním okrajem a $2,5 \text{ cm}$ od pravého okraje. Dráhy standardů jsme oddělili od ostatní části fólie dvěma rýhami (vzdálenost od okraje 3 cm). Vyvíjeli jsme v prvním směru v soustavě dietyléter : metanol : voda (94 : 4, 5 : 1, 5) v nasycené komoře. Po uschnutí fólie jsme vyvíjeli v soustavě chloroform : aceton : metanol (90 : 10 : 2) v nenasyčené komoře. Chromatogram jsme prohlíželi pod UV lampou pomocí přístroje Fluotest universal (fy Original Hanau Quarzlampen, NSR) a srovnávali standardy se zkoušeným vzorkem.

Jako dosud nejvhodnější se nám jeví metoda, kterou popsali Tuinstra a Bronsgeest (1975). Na trhu jsou běžně dostupné veškeré chemikálie. Menší modifikace postupu jsme udělali jen kvůli nedostatku určitého druhu laboratorního skla. Metodu uvádíme podrobně, neboť je vysoce citlivá a získaný extrakt je velmi čistý. Bodine aj. (1977) potvrdili, že metodou je možné stanovit $0,005 \mu\text{g}$ aflatoxinu M_1 v jednom litru mléka. Ve své práci jsme použili tento postup: 60 ml mléka se zahřívá v odstředivkové kyvetě 15 minut na vodní lázni při teplotě 60 až 80°C . V části pokusů jsme zpracovávali vzorky i bez zahřívání. Po zchlazení a zředění mléka 50 ml destilované vody se přidá 10 ml 10% síranu kademnatého a míchá se. Pak se odstředí, 100 ml

čirého roztoku (množství ekvivalentní asi 50 ml mléka) se filtruje skládaným filtračním papírem do dělicí nálevky. Roztok se extrahuje dvakrát 50 ml chloroformu a znovu se odstředí. Spodní chloroformová vrstva se přefiltruje filtračním papírem s 5 cm vrstvou bezvodého sí. anu sodného do baňky a odpaří téměř do sucha na rotačním vakuovém odpařováku. Reziduum se rozpustí v 5 ml suchého diethyléteru a nanese na silikagelový sloupec (výška 2,5 cm, šířka 8 mm). Baňka i sloupec se propláchne 10 ml suchého diethyléteru. Aflatoxin M_1 se eluuje 1 ml chloroformu obsahujícího 3 % metanolu. Eluát se odpaří do sucha. Reziduum se rozpustí v 50 μ l chloroformu a nanáší na neaktivovanou tenkou vrstvu silikagelu (Silufol UV 254, Sklářny Kavalier, n. p.). Veškeré množství se nanese 2 cm od spodního okraje a 6 cm od pravého okraje. Standard se nanese 4 cm od spodního okraje a 2 cm od pravého okraje. Mezi těmito dvěma body je možné nanést ještě dvě až tři různé koncentrace aflatoxinu. Standardy se nanáší také 6 cm od pravého okraje a 3 cm od horního okraje, jakož i 2 cm od spodního okraje a 3 cm od levého okraje. Rýhami 6 cm od horního okraje a 6 cm od levého okraje se oddělí dva pruhy. Vyvíjí se ve dvou směrech: a) první směr v nasycené komoře: diethyléter : metanol : voda (94,5 : 4,5 : 1,5) a po 10 minutách sušení tenké vrstvy silikagelu b) druhý směr: v nenasyčené komoře: chloroform : aceton : izopropanol (85 : 10 : 5). Po odpaření vyvíjecí směsi z tenké vrstvy silikagelu se chromatogram prohlíží pod UV lampou přístroje Fluotest universal (fy Original Hanau Quarzlampen, NSR) a srovnají se standardy se zkoušeným vzorkem. Z potvrzovacích testů jsme použili metodu postřiku podezřelých skvrn 20% kyselinou sírovou. Po přidání 2,5 ng aflatoxinu M_1 k vzorku tekutého mléka jsme zjistili aflatoxin na fólii, což odpovídá detekci 50 ng aflatoxinu M_1 v jednom litru. Tato citlivost metody je zcela postačující, neboť dovoluje zachytit nižší koncentrace, než jsou navrhované přípustné koncentrace pro konzum dospělých, dětí, ba i kojenců.

Pro screeningové testy je možné použít fólie s tenkou vrstvou silikagelu o rozměrech 5 X 6,5 cm. Fólii obrátíme tak, aby výšku tvořil kratší rozměr. Vzorek nanášíme v pravém spodním rohu fólie na bod 16 mm od spodního okraje a 8 mm od pravého okraje. Nejdříve vyvíjíme podél kratšího rozměru v soustavě diethyléter : metanol : voda v nasycené komoře. Po vysušení fólie při pokojové teplotě po 10 minutách nanášíme standard aflatoxinu M_1 v pravém dolním rohu na bod 8 mm od spodního okraje a 8 mm od pravého okraje. Vyvíjí se ve druhém směru podél delšího okraje fólie v nenasyčené komoře v soustavě chloroform : aceton : izopropanol. Takto se ušetří fólie s tenkou vrstvou silikagelu, zvýší se počet vyšetřených vzorků, zrychlí se vyšetření a sníží se spotřeba standardu.

Tyto dvě popsání metody navrhujeme pro screeningové vyšetřování tekutých mlék v ČSSR na možnou přítomnost aflatoxinů, neboť jsou citlivější než oficiální metody AOAC (1975).

V obchodních vzorcích tekutého mléka nezjistili mnozí pracovníci přítomnost aflatoxinů v USA, Anglii, Francii, Turecku, Polsku: Allcroftová a Carnaghan (1963), Boutibonnes a Jacquet (1969), Jacquet aj. (1970), Brewington aj. (1970), Keyl a Booth (1971), Stubblefield aj. (1973), Demirer (1973), Lemieszek — Chodorowska (1974).

Naproti tomu v Jihoafrické republice, v Německé spolkové republice a v Německé demokratické republice byly publikovány pozitivní nálezy aflatoxinu M_1 v tekutém mléce. Purchase a Vorster (1968) zachytili přítomnost aflatoxinu M_1 v pěti vzorcích z 21. Kiermeier aj. (1975) vyšetřili 165 vzorků čerstvého mléka, z nichž bylo 22 % pozitivních. Nejvyšší obsah aflatoxinu byl $1,6 \mu\text{g l}^{-1}$. Fritz aj. (1977) našli aflatoxin M_1 ve čtyřech z 24 analyzovaných vzorků obchodních mlék pocházejících ze zimního období. Kiermeier aj. (1975) uvedli, že nově byl zjištěn aflatoxin M_1 v Anglii (nejvyšší koncentrace byla $6 \mu\text{g l}^{-1}$), v Nizozemí (koncentrace se pohybovaly od 0,2 do $4,9 \mu\text{g l}^{-1}$) a v Íránu (během dvouletého období bylo zachyceno 56 % vzorků kontaminovaných aflatoxinem M_1 a M_2 , koncentrace se pohybovala v rozmezí 1 až $250 \mu\text{g l}^{-1}$). Kiermeier aj. (1977) vyšetřili 419 vzorků, z nichž 19 % bylo pozitivních. Jednalo se o mléko zasílané do mlékárny, tedy před pasterací. Obsah aflatoxinu se pohyboval od 0,02 do $0,54 \mu\text{g l}^{-1}$. Z pozitivních vzorků 33 % obsahovalo 0,05 až $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$ a 38 % vykazovalo koncentrace vyšší než $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$. Polzhofer (1977a) vyšetřil v letech 1972 až 1974 260 vzorků tekutých mlék, z nichž 45 % bylo pozitivních. Vzorky obsahovaly 0,05 až $0,33 \mu\text{g}$ aflatoxinu M_1 v jednom litru. Průměrná koncentrace byla $0,07 \mu\text{g l}^{-1}$.

Literaturu pojednávající o přítomnosti aflatoxinů v sušených mléčných výrobcích jsme uvedli v předchozí práci (Bartoš, Matyáš, 1976).

Opomeneme-li vyhledávací pokusy, při nichž jsme zjišťovali, která metoda by mohla být vhodná pro vyšetřování tekutého mléka na přítomnost aflatoxinů z hlediska našich podmínek, zjistíme, že standardně prováděnými pokusy dvěma námi navrhovanými postupy pro vyšetřování tekutých mlék jsme vyšetřili celkem 70 vzorků (období od června do prosince 1977), z nichž 25 vzorků bylo pozitivních (modrá barva skvrn se stejným R_f jako standard M_1 se změnila po postřiku 20% kyselinou sírovou do žluta; pro velmi malá množství jsme nemohli udělat další ověřovací testy). Pozitivní vzorky jsme zachytili ve všech třech druzích balení (skleněné láhve, igelitové sáčky, speciální obaly). Naše množství jsme porovnali semikvantitativně s různými koncentracemi standardu M_1 . Z 25 pozitivních vzorků jsme zjistili stopy ve třech případech, sedm vzorků jsme zařadili do koncentrace 5 ng aflatoxinu M_1 v 1 litru, tři vzorky do koncentrace 10 ng aflatoxinu M_1 v 1 litru, devět vzorků se shodovalo s obsahem 20 ng aflatoxinu M_1 v 1 litru, dva vzorky odpovídaly koncentraci 30 ng aflatoxinu M_1 v 1 litru a jeden vzorek obsahoval více než 40 ng aflatoxinu M_1 v 1 litru. I nejvyšší námi zjištěná koncentrace aflatoxinu M_1 v obchodním mléce je značně nižší, než je přípustná koncentrace navrhovaná v ČSR pro potraviny ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$). Zjištěné koncentrace ve vzorcích mlék byly také pod navrhovanými limity jak pro děti ($1 \mu\text{g kg}^{-1}$), tak i pro kojenče ($0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$). Převážná většina pozitivních vzorků byla zjištěna v listopadu a prosinci při použití metody Tuinstry a Bronsgeesta (1975).

Ve svých pokusech jsme vyšetřovali mléko z běžné obchodní sítě po pasteraci. Většina pozitivních nálezů uváděných v literatuře pochází však z čerstvého surového mléka, neovlivněného pasterací. Tato skutečnost je v souladu se zjištěním, že pasterace může podstatně

snížit obsah aflatoxinu M₁ v mléce. Purchase aj. (1972) zjistili snížení obsahu aflatoxinu v mléce po pasteraci při teplotě 80 °C z 385 µg kg⁻¹ na 140 µg kg⁻¹. Mc Kinney aj. (1973) uvedli, že obsah aflatoxinu se snižuje při pouhém stání mléka. Po čtyřech dnech uchovávání při teplotě 0 °C se koncentrace snížila o 40 % a po šesti dnech asi o 80 %. Naproti tomu Allcroftová a Carnaghan (1963) nezjistili ovlivnění toxicity aflatoxinu pasterací. Mann aj. (1967) pozorovali zanedbatelné snížení koncentrace aflatoxinu při teplotě 60 °C a 80 °C, zatímco zřetelné snížení nastalo při teplotě 100 °C. Stoloff aj. (1975) nezjistili snížené množství aflatoxinu při pasteraci po dobu 30 minut při teplotě 63 °C, ani při 77 °C po 16 vteřin. Polzhofer (1977b) zjistil, že při tavení sýrů při teplotě 90 °C po dobu 3 až 30 minut se aflatoxin M₁ podstatně nerozrušil. Někteří autoři, jako např. Kiermeier aj. (1977) a Polzhofer (1977a), uvádějí výskyt aflatoxinu M₁ i v různých výrobcích z mléka.

Na základě uvedených literárních údajů je možné předpokládat, že při vyšetřování vzorků metodou podle Tuinstry a Bronsgeesta (1975), kteří zahřívají mléko na vodní lázni při teplotě 90 °C po dobu 15 minut, nebude mít zahřátí podstatný vliv na koncentraci aflatoxinu. V části pokusů jsme vyšetřovali vzorky mlék i bez zahřívání, popřípadě při zahřívání při nižších teplotách (60 °C, 80 °C). Zjistili jsme, že i bez zahřívání mohou být vzorky úspěšně vyšetřovány, i když při vyšších teplotách je množství nečistot na fólii nesrovnatelně menší. Některé vzorky jsme vyšetřovali ve větším rozsahu. Do pokusů jsme brali dvojnásobná množství vzorků mlék (tj. místo 60 ml 120 ml) s patřičnou úpravou analytického postupu. V některých případech jsme vzorky v dvojnásobném množství vyšetřovali dvojmo a oba eluáty jsme spojili. Na fólii jsme pak nanášeli veškeré reziduum, které odpovídalo 240 ml mléka. Tímto způsobem jsme zachytili pozitivní vzorky i v případech, kdy při nanesení rezidua odpovídajícího 60 ml mléka byl výsledek negativní.

Pozitivní nálezy aflatoxinu M₁ v mléce krav jsou možné i u nás, poněvadž krmiva mohou obsahovat aflatoxiny buď přímo z dovozu — např. podzemnicové výlisky dovezené z Indie (Bartoš, Matyáš, 1977), popřípadě zkrmováním krmiva napadeného produkčními kmeny *A. flavus* a *A. parasiticus*. Častější výskyt s vyššími koncentracemi aflatoxinu M₁ v mléce je možné očekávat v zimních a jarních měsících (Polzhofer, 1977a). EHS stanovilo, že krmné komponenty pro dojnice nemají obsahovat více než 20 µg aflatoxinu B₁ v jednom kilogramu. Kiermeier aj. (1975) uvedli, že aflatoxin může být zjištěn v mléce ještě při zkrmování 0,25 µg aflatoxinu v 1 kg krmiva. Pro dojnice v ČSSR je navrhován limit 10 µg aflatoxinů v 1 kg krmiva. Kiermeier (1974) se domnívá, že z hlediska konzumenta nejsou přijatelná ani malá množství toxinu v mléce a mléčných produktech a uzavírá, že mlékárenský průmysl musí udělat vše, co je v jeho silách, aby udržel obsah aflatoxinu v mléce a mléčných výrobcích na tak nízké úrovni, jak je to jen technicky možné.

Poděkování: Za poskytnutí standardů aflatoxinů B₁ a M₁ děkujeme ing. D. Veselému z Ústavu experimentální medicíny ČSAV. Za technickou spolupráci děkujeme s. B. Seidlové a s. L. Helánovi.

- 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.
- BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z.: Metody zjišťování přítomnosti aflatoxinů v sušených mléčných výrobcích. IX. Lenfeldovy a Höklovy dny, Brno 10.-11. VI. 1976.
- BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z.: Screening na přítomnost aflatoxinu B₁ v krmivech. *Vet. Med.*, Praha, 21, 1977, s. 729-735.
- BODINE, A. B. — DAVIS, R. W. — JANZEN, J. J. — CRAWFORD, F. M.: Comparison of two methods for analysis of aflatoxin M₁ in milk. *J. Dairy Sci.*, 60, 1977, s. 450-452.
- BOUTIBONNES, P. — JACQUET, J.: Sur la fréquence de l'aflatoxine et des Aspergillus dans les aliments. *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, 163, 1969, s. 1119-1124.
- BREWINGTON, C. R. — WEIHRAUCH, J. L. — OGG, C. L.: Survey of commercial milk samples for aflatoxin M. *J. Dairy Sci.*, 53, 1970, s. 1509-1510.
- DEMIRER, M. A.: Süt ve süt mamüllerinde aflatoxine M₁ ve B₁ aranması üzerinde araştırmalar. *Veteriner Fakültesi Degrisi*, Ankara, 20, 1973, s. 421-443.
- FRITZ, W. — DONATH, R. — ENGST, R.: Bestimmung und Vorkommen von Aflatoxin M₁ und B₁ in Milch und Milchprodukten. *Nahrung*, 21, 1977, s. 79-84.
- JACOBSON, W. C. — HARMEYER, W. C. — WISEMAN, H. H.: Determination of aflatoxins B₁ and M₁ in milk. *J. Dairy Sci.*, 54, 1971, s. 21-24.
- JACQUET, J. — BOUTIBONNES, P. — TEHERANI, A.: Sur la présence des flavatoxines dans les aliments des animaux et dans les aliments d'origine animale destinés à l'homme. *Bull. Acad. vét. Fr.*, 43, 1970, s. 35-43.
- KEYL, A. C. — BOOTH, A. N.: Aflatoxin effects in livestock. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 48, 1971, s. 599-604.
- KIERMEIER, F.: The significance of aflatoxins in the dairy industry In: International Dairy Federation 58th Annual Sessions in Delhi (India) 25.-29. November 1974. Commission F, s. 1-33.
- KIERMEIER, F. — MÜCKE, W.: Über den Nachweis von Aflatoxin M in Milch. *Z. Lebensmittelunters. Forsch.*, 150, 1972, s. 137-140.
- KIERMEIER, F. — WEISS, G.: Zur Untersuchung von Milch und Milchprodukten auf die Aflatoxine B₁, B₂, G₁, G₂ und M₁. *Z. Lebensmittelunters. Forsch.*, 160, 1976, s. 337-344.
- KIERMEIER, F. — REINHARDT, V. — BEHRINGER, G.: Zum Vorkommen von Aflatoxin in Rohmilch. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 71, 1975, s. 35-38.
- KIERMEIER, F. — WEISS, G. — BEHRINGER, G. — MILLER, M.: Über das Vorkommen und den Gehalt von Aflatoxin M₁ in Käsen des Handels. *Z. Lebensmittelunters. Forsch.*, 163, 1977, s. 268-271.
- KIERMEIER, F. — WEISS, G. — BEHRINGER, G. — MILLER, M. — RANFFT, K.: Vorkommen und Gehalt an Aflatoxin M₁ in Molkerei-Anlieferungsmilch. *Z. Lebensmittelunters. Forsch.*, 163, 1977, s. 171-174.
- LANCASTER, M. C. — JENKINS, F. P. — PHILP, J. Mc L.: Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature*, 192, 1961, s. 1095-1096.
- LEMIESZEK-CHODOROWSKA, K.: Detection and estimation of aflatoxin M₁ in milk. *Roczn. państw. Zakł. Hig.*, 25, 1974, s. 489-494.
- MANN, G. E. — CODIFER, L. P. — DOLLEAR, F. G.: J. agric. Fd Chem., 15, 1967, s. 1090. In: CIEGLER, A. — KADIS, S. — AJL, S. L.: Microbial Toxins. Volume VI. Fungal Toxins 1971, 434 s., Academic Press New York and London.
- McKINNEY, J. D. — CACANAGH, G. C. — BELL, J. T. — HOVERSLAND, A. S. — NELSON, D. M. — PEARSON, J. — SELKIRK, R. J.: J. Am. Oil Chem. Soc., 50, 1973, s. 79. In: KIERMEIER, F.: The significance of aflatoxins in the dairy industry. International Dairy Federation 58th Annual Sessions in Delhi (India) 25.-29. November 1974, Commission F, s. 1-33.
- Official methods of analysis of the Association of official analytical chemists, 12. vydání, 1975.
- POLZHOFFER, K.: Aflatoxinbestimmung in Milch und Milchprodukten. *Z. Lebensmittelunters. Forsch.*, 163, 1977a, s. 175-177.
- POLZHOFFER, K. P.: Hitzestabilität von Aflatoxin M₁. *Z. Lebensmittelunters. Forsch.*, 164, 1977b, s. 80-81.

PONS, W. A. — CUCULLU, A. F. — LEE, L. S.: Method for the determination of aflatoxin M₁ in fluid milk and milk products. J. Ass. off. analyt. Chem., 56, 1973, s. 1431-1436.

PURCHASE, I. F. H.: The control of aflatoxin residues in food of animal origin. In: KROGH, P.: Control of Mycotoxins. London, Butterworths 1973, s. 283-289.

PURCHASE, I. F. H. — VORSTER, L. J.: Aflatoxin in commercial milk samples. S. Afr. med. J., 42, 1968, s. 219.

PURCHASE, I. F. H. — STEYN, M. — RINSMA, R. — TUSTIN, R. C.: Reduction of the aflatoxin M content of milk by processing. Fd Cosmet. Toxicol., 10, 1972, s. 383-387.

SCHULLER, P. L. — VERHÜLSDONK, C. A. H. — PAULSCH, W. E.: Analysis of aflatoxin M₁ in liquid and powdered milk. In: KROGH, P.: Control of Mycotoxins. London, Butterworths 1973, s. 291-296.

STOLOFF, L. — TRUCKESS, M. — HARDIN, N. — FRANCIS, O. J. — HAYES, J. R. — POLAN, C. E. — CAMPBELL, T. C.: Stability of aflatoxin M in milk. J. Dairy Sci., 58, 1975, s. 1789-1793.

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.

TUINSTRAL, L. G. M. Th. — BRONGEEST, J. M.: Determination of aflatoxin M₁ in milk at the parts per trillion level. J. Chromat., 111, 1975, s. 448-451.

Došlo dne 9. 6. 1973

БАПТОШ, Й. — МАТИАШ, З. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): Выбор методов определения присутствия афлатоксинов в жидком молоке. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 559-567.

Испытано 7 методов, рекомендованных для определения присутствия афлатоксинов в жидком молоке. Большинство методов по-разному модифицированы, главное, из-за недостатка некоторых химических веществ. Образцы видов молока, предназначенного для непосредственного потребления, брали из текущей торговой сети (молоко в бутылках, полиэтиленовых мешочках, в специальной таре — стойкое). Подробно описан рабочий прием двух методов, представляющих подходящими для текущего скрининг-исследования торговых образцов жидкого молока. С помощью этих методов исследовано 70 таких образцов. 25 из которых оказались положительными. Однако ни в одном из образцов концентрация афлатоксина не достигла рекомендуемой допустимой концентрации для пищевых продуктов.

чужеродные вещества; микотоксины; аналитические методы; скрининг; TLC

BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z. (Veterinary Research Institute, Brno): *The Choice of Methods for Determining the Presence of Aflatoxins in Liquid Milk*. Vet. Met., Praha, 23, 1978 (9) : 559-567.

Seven methods, recommended for determining aflatoxins in liquid milk, were tested. Most of them were variously modified, mainly for the unavailability of some chemicals needed. Samples of liquid milk, normally prepared for direct consumption, were taken from the retail market (bottled and plastic-sacheted milk, durable milk in special boxes). The authors describe in detail the two methods now appearing to be the best for current screening tests of market samples of liquid milk. Seventy samples of market liquid milk were tested by these methods, and 25 of them were found to be positive. However, there was no sample to contain as much aflatoxin as determined in the proposed admissible concentration for food.

heterogenous substances; mycotoxins; analytic methods; screening; TLC

BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): *Auswahl von Methoden zur Feststellung der Anwesenheit von Aflatoxinen in flüssiger Milch*. Met. Vet., Praha, 23, 1978 (9) : 559-567.

Wir überprüften insgesamt sieben für Untersuchungen der Anwesenheit der Aflatoxine in flüssiger Milch empfohlene Methoden. Die Mehrzahl der Methoden modifizierten wir unterschiedlich, vor allem aus Mangel an einigen Chemikalien. Die

Handelsnetz (Milch in Flaschen, Igelitsäckchen sowie Dauermilch in Sperrverpackung). In der Arbeit wird der Arbeitsvorgang von zwei Methoden eingehend beschrieben, die derzeit als geeignet für laufende Screening-Untersuchungen von Proben flüssiger Marktmilch erscheinen. Mittels dieser Methoden untersuchten wir 70 Proben flüssiger Marktmilch, von denen 25 positiv waren. Aber in keiner einzigen Probe erreichte die Aflatoxinkonzentration die für Nahrungsmittel zulässigen Konzentrationswerte.

Fremdstoffe; Mykotoxine; analytische Methoden; Screening; TLC

Adresa autorů:

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

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.

REMMEN, J. W. A.

D 51.973/88

Een onderzoek naar mogelijkheden om perinatale sterfte bij het rund te beperken. Proefschrift aan de Rijksuniversiteit te Utrecht. (Souhrn angl).

Utrecht, n. vl., 1976. 150 s. 10 obr. 52 tab. (Telata — úmrtnost perinatální — vlivy a ochrana — výzkum — Holandsko)

JANOWSKI, T. M.

D 67.291

Metodyka badań zoohigienicznych.

Warszawa, PWN 1977. 192 s. 48 obr. 26 tab. (Hygiena hospodářských zvířat — příručka)

D 67.611

Higiena weterynaryjna w przemyslowym chowie zwierząt.

Warszawa, PWRiL 1977. 298 s. tab. obr. (Veterinární hygiena — chov velkokapacitní — příručka)

PETROV, K. — PETKOV, G. — NECOV, N.

E 38.311

Veterinarnochigijenni metodi, normi i parametri pri promišlenoto životnovadstvo.

Sofija, Zemizdat 1975. 204 s. 49 obr. (Chov hospodářských zvířat — velkokapacitní — hygiena — příručka)

BAYOUMI, ADB EL LATIF LASAN

E 38.066/196

Enzymhistochemische Untersuchungen an der thrombosierten und nicht thrombosierten Aortenwand der Ratte beim experimentellen Rotlauf.

Inaug.-Diss. d. Tierärztl. Hochschule Hannover.

Hanover, Inst. f. Pathologie 1977. 92 s. obr. tab. (Krysy — nemoci nakažlivé — červenka — krev tepenná — enzymy — aktivita — vztahy — výzkum — NSR — disertační práce)

GLÜNDER, G.

E 38.066/178

Einfluss eines elektrostatischen Feldes und eines elektrischen Impulses auf die humorale Antikörperbildung und die Mastleistung beim Huhn. Inaug.-Diss. d. Tierärztl. Hochschule Hannover.

Hanover, n. vl. 1976. s. obr. tab. (Drůbež jatečná — nemoci nakažlivé — ochrana humorální — elektrostatické vlny a impulsy — vliv — výzkum — NSR — disertační práce)

S. Konečný

KONEČNÝ, S. (Státní veterinární ústav, Ostrava): *Detekce inhibičních látek v mléce modifikovanou redukční mikrometodou*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 569-572.

Ve snaze o racionalizaci práce a snížení potřeby laboratorního skla byla modifikována redukční metoda s bakteriálním kmenem *Streptococcus thermophilus* na detekci přítomnosti inhibičních látek v syrovém, pasterovaném i sušeném mléce, která se dělá na sérologické desce z organického skla. Metoda je citlivá vůči většině antibiotik používaných ve veterinární klinické praxi. Detekční citlivost na rezidua penicilinu je v rozmezí 0,0015 až 0,015 m. j. v ml mléka. Metodu lze rovněž hodnotit jako semikvantitativní.

sérologická deska; *Streptococcus thermophilus*; semikvantitativní hodnocení

Problematika výskytu antibiotik v mléce je nadále aktuální, zvláště v tomto období, kdy je věnována mimořádná pozornost programu tlumení mastitid. Přítomnost antibiotik v mléce je nežádoucí jak z hlediska hygienického, tak i technologického. Přesto však není doposud na úseku laboratorní diagnostiky zajištěn jednotný postup při detekci antibiotik i jiných antibakteriálních substancí v mléku.

V poslední době byla věnována pozornost detekční metodě „Delvotest P“ (výrobek firmy Gist Brocades N. V. Posbus-Delf z Holandska), která při délce trvání testu 2,5 hodiny a absolutní úspoře skla (výrobek dodáván v ampulkách, v kterých se vzorky mléka vyšetřují) dosahuje testační citlivosti 0,0025 m. j. PNC na ml. Nevýhodou je cenová nedostupnost (Pater, 1976; Černá, Pičmanová, 1976; Konečný, 1976).

Mezinárodní mlékárenskou federací v Bruselu byla v r. 1970 schválena difúzní metoda FIL-IDF s testovacím kmenem *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, která při citlivosti 0,0025 m. j. PNC na ml mléka vykazuje výsledky za dvě až pět hodin. Pracnost této metody je minimální, a proto se v rámci unifikace laboratorních metodik počítá, že bude zavedena jako jedna z rozhodčích metod detekce inhibičních látek v mléku jak pro laboratoře veterinárních pracovišť, tak i laboratoře mlékárenského průmyslu.

Velmi účinnou metodou na stanovení inhibičních látek v mléce se jeví TTC-test zkumavkový s testovacím kmenem *Streptococcus thermophilus*. Při něm se 10 ml vyšetřovaného mléka ve zkumavce smíchá s 1 ml kultury *Streptococcus thermophilus*, ředěné 1:1 se sterilním, inhibitorů prostým mlékem, a inkubuje se 90 minut při teplotě 43 °C ve vodní lázni. Po této době se přidá ke vzorku 0,3 ml roztoku TTC a vloží se opět do vodní lázně. Výsledek se odečítá po dalších 15 až 30 minutách. Citlivost metody je uváděna v hodnotách 0,01 m. j. PNC na ml mléka (Pičmanová aj., 1974).

TTC test, jako redukční zkumavková metoda, se jeví jako metoda vhodná pro terénní laboratorní praxi. Přesto, ve snaze o snížení pracnosti a úsporu laboratorního skla i pracovního prostoru při zachování dané citlivosti a rychlosti získání výsledků vyšetření, byla na pracovišti SVÚ Ostrava modifikována a na větším množství vzorků prověřena (1140 vzorků) redukční mikrometoda na stanovení přítomnosti inhibičních látek ve vzorcích mléka.

MATERIÁL A METODA

Vzorky mléka (syrové pasterované i rekonstituované sušené mléko) se inaktivují ve vodní lázni o teplotě 80 °C po dobu 5 minut. Vzorky mléka se promíchají a napi-petují jednotlivě po 1 ml do jamek na sérologické desce Z-P 2, typ TYPY 21-177-63, výroba Okula, n. p., Nýrsko. Destička je z poloprůhledného organického skla a je na ní možné vyšetřit až 80 vzorků mléka.

Testovací kultura se připraví předem z originální kultury Laktoflora s kmenem *Streptococcus thermophilus* T 280 (dodává výrobce Mlékárenský průmysl, vývojový závod, Praha 6 - Vokovice) buď přímo zředěním v poměru 1 : 1 se sterilním, inhibič-ních látek prostým mlékem, nebo se připraví 1% základní kultura tak, že 1 ml pů-vodní Laktoflóry se sterilně přidá ke 100 ml sterilního mléka, které se předem zahřívá ve vodní lázni o teplotě 100 °C po dobu 30 minut. Inokulované mléko se inkubuje 14 až 18 hodin při teplotě 37 °C v termostatu. Po této době vznikne kom-paktní sraženina kultury, kterou je možné uchovávat při teplotě 5 °C maximálně pět dnů. Před vlastním použitím se ředí sterilním mlékem v poměru 1 : 1.

Ke vzorkům mléka, rozplněným po 1 ml do jamek na sérologické desce, se na-pipetuje po dvou kapkách předem připravené testovací kultury kmene *Strepto-coccus thermophilus* T 280. Obsah jamek se promíchá sterilními skleněnými ty-činkami a celá destička se vloží do termostatu vyhřátého na teplotu 45 °C. Inkubuje se po dobu 120 minut.

Po inkubaci se přidá do každé jamky s mlékem jedna kapka vodného roztoku resazurinu, který se připravuje bezprostředně před použitím rozpuštěním jedné tablety resazurinu (Feinchemie, K. H. Kallies) v 50 ml destilované vody (0,01% roztok). Po rozpuštění resazurinu se roztok důkladně promíchá.

Po přidání indikátoru se obsah jamek opět promíchá a deska se vloží do ter-mostatu. Výsledek redukce, projevující se barevnými změnami indikátoru, se odečítá po 30 minutách.

Při každém vyšetřování je nutné dělat kontrolu s mlékem, u něhož přítomnost inhibičních látek byla vyloučena.

Pro semikvantitativní stanovení přítomnosti látek s inhibičním účinkem při-pravíme paralelně s vyšetřovanými vzorky kontrolní řadu mlék s různými koncent-racemi penicilinu, např. v koncentracích 1,5 — 0,15 — 0,015 — 0,0015 m. j. PNC na ml. Zabarvení vyšetřovaných vzorků mlék pak srovnáváme s kontrolními negativními vzorky a vzorky mléka o různé koncentraci PNC v ml.

Mléka bez přítomnosti inhibičních látek jsou bílá, mléka s přítomností látek s vysokým antibakteriálním účinkem nebo ve větší koncentraci jsou fialová (pří-tomnost 0,15—1,5 a výše m. j. PNC na ml). Mléka s nižšími až prahovými koncentra-cemi přítomných antibakteriálních substancí, látek inhibující testovací kulturu, jsou růžová až světle růžová (přítomnost 0,0015—0,015 m. j. PNC na ml).

Citlivost metody při dodržování uvedeného postupu je 0,0015 až 0,015 m. j. PNC na ml mléka.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Modifikovanou redukční metodou se snížila pracnost a vznikla úspora laboratorního skla (zkumavek) i pracovního prostoru, protože na destičce o velikosti 18 X 14,5 cm lze vyšetřit až 80 vzorků mléka.

Rovněž doba trvání testu je příznivá — 135 až 150 minut. Výhodou je i skutečnost, že je možné vyšetřovat i malé množství mléka — 1 ml.

Dosahovaná detekční citlivost je pro běžnou praxi velmi dobrá — vůči penicilinu 0,015 až 0,0015 m.j. PNC na ml. Prokázala se i vysoká citlivost této redukční metody na přítomnost některých desinfekčních kontaminantů (přítomnost NaOH, Na₂CO₃, chloraminu B, Alkonu či peroxidu vodíku byla detekována při koncentracích 0,01 %).

U mikrodifúzní metody je třeba dodržovat některé zásady, aby výsledek vyšetřování nebyl nepříznivě ovlivňován. Vzhledem k opakovanému přeočkovávání testovací kultury se snižuje detekční citlivost kmene *Streptococcus thermophilus*. Je proto nutné zajišťovat ve 14denních až 28denních intervalech novou originální kulturu Laktoflory pro přípravu základní testovací kultury.

Vzhledem k tomu, že pracovní destičku z organického skla nelze sterilizovat za vyšších teplot, doporučujeme sterilizaci pod UV lampou ve vzdálenosti 0,5 m od zdroje po dobu 30 minut. Takto sterilizovanou destičku uchováváme zabalenou v alobalu.

V případě, že po stanovené inkubaci vyšetřovaných vzorků dojde na přímém světle k nežádoucí změně barvy všech vzorků mléka, tedy i kontrolních, doporučujeme destičku vložit opět do termostatu na 15 minut a výsledek odečíst bez vlivu přímého světla ihned po otevření termostatu.

Při semikvantitativním stanovení inhibičních látek ve vzorcích mléka je nutné kontrolní roztoky PNC připravovat čerstvé nebo maximálně použít 48 hodin staré roztoky, které byly uchovány při teplotě 5 °C. Vodný roztok resazurinu je třeba připravovat před každým vyšetřením.

Redukční mikrometoda s roztokem resazurinu jako indikátorem a s testovacím kmenem *Streptococcus thermophilus* T 280 se jeví jako vhodná metoda na stanovení přítomnosti inhibičních látek v mléce, použitelná v laboratořích SVÚ, event. OVL, nebo i v laboratořích mlékárenského průmyslu. Metoda vykazuje dostatečnou detekční citlivost, je málo pracná. Snížení spotřeby laboratorního skla i pracovní plochy umožňuje rutinní i hromadná vyšetření většího množství vzorků mléka na přítomnost antibakteriálních substancí. Společně s mezinárodní metodou FIL-IDF jsou vhodnými rozhodčími metodami detekce inhibičních látek ve vzorcích mléka syrového, pasterovaného i sušeného. Rovněž doba potřebná k získání výsledků umožňuje rychlou a bezprostřední informaci zpracovatelských závodů mlékárenského průmyslu, a tím zajišťuje eliminaci mléka s obsahem inhibičních látek ze speciální výroby, čímž se zabrání nejen ekonomickým ztrátám ve výrobě, ale je i plně odstraněno zdravotní riziko pro konzumenty.

Literatura

- ČERNÁ, E. — PIČMANOVÁ, B.: Zajišťování přítomnosti antibiotik v mléce pomocí difúzního testu Delvotest P. Výzkumný ústav mlékárenského průmyslu — služební informace, 1976.
- KONEČNÝ, S.: Vyšetřování na přítomnost inhibičních látek v mléce pomocí Delvotestu P. Sdělení pro ÚSVÚ Praha, č. j. 22/1607, r. 1976.
- KONEČNÝ, S. — SEDLÁČEK, O.: Vhodnost a spolehlivost laboratorních metod na detekci přítomnosti inhibičních látek v mléce. Přednáška na X. Lenfeldových a Höcklových dnech, Vysoká škola veterinární, Brno 1977.
- PATER, B.: A Collaborative Study of the Delvotest-P Method to Detect Low Concentrations of Penicillin in Milk. J. Fd Protect., 140, 1976, č. 1, s. 23-24.

PICMANOVA, B. — CERNÁ, E. — HAVLOVÁ, K.: Provéření metody s *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* a testu s TTC ke stanovení některých antibiotik. Prům. potravin, 25, 1974, č. 11, s. 351-352.

—: Detection of Penicillin in Milk by a Disk assay technique. International Standard FIL-IDF 57: 1970. International Dairy Federation, General Secretariat, Square Vergote 41, Brussels.

Došlo dne 28. 3. 1978

KONEČNÝ, S. (Государственный ветеринарный институт, Острава): Детектирование ингибирующих веществ в молоке при помощи модифицированного восстановительного микрометода. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9): 569-572.

Стремясь достичь рационализации труда и понижения затраты лабораторного стекла был модифицирован восстановительный метод с бактериальным штаммом *Streptococcus thermophilus* на детектирование наличия ингибирующих веществ в сыром, пастеризованном и сухом молоке, который осуществляется на серологической доске из органического стекла. Метод чувствителен к большинству антибиотиков, применяемых в ветеринарной клинической практике. Детектированная чувствительность к остаткам пенициллина колеблется в пределах 0,0015—0,015 м. е. в мл молока. Метод можно расценивать как семиквантитативный.

серологическая доска; *Streptococcus thermophilus*; семиквантитативная оценка

KONEČNÝ, S. (State Veterinary Institute, Ostrava): Detection of Inhibitory Substances in Milk by means of a Modified Reduction Micromethod. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9): 569-572.

In order to rationalize work and to reduce the consumption of laboratory glassware a reduction micromethod with the bacterial strain *Streptococcus thermophilus* has been modified; the method is used to detect inhibitory substances in genuine, pasteurized and dried milk, and it is performed on a serological plate made from organic glass. The method is sensitive to most antibiotics used in the veterinary clinical practice. The detection sensitivity to penicillin residua ranges from 0.0015 to 0.015 i. u. in 1 ml of milk. The method may be assessed as semi-quantitative.

serological plate; *Streptococcus thermophilus*; semi-quantitative assessment

KONEČNÝ, S. (Staatsveterinärinstitut, Ostrava): Nachweis von Inhibitionsstoffen in Milch durch die modifizierte Reduktionsmikromethode. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9): 569-572.

Um die Arbeit zu rationalisieren und den Bedarf an Laborglas herabzusetzen, wurde die Reduktionsmethode mit dem Bakterienstamm *Streptococcus thermophilus* zum Nachweis des Vorkommens von Inhibitionsstoffen in kuhwarmer, pasteurisierter Milch und Trockenmilch modifiziert. Diese Detektion wird auf einer serologischen Platte aus organischem Glas vorgenommen. Die Methode ist gegenüber den meisten Antibiotika, die man in der klinischen Veterinärpraxis verwendet, empfindlich. Die Detektionsempfindlichkeit gegen Residuum des Penizillins bewegt sich zwischen 0,0015 und 0,015 Milcheinheiten in ml Milch. Die Methode kann man gleichfalls als semi-quantitativ bewerten.

serologische Platte; *Streptococcus thermophilus*; semiquantitative Bewertung

Adresa autora:

MVDr. Stanislav Konečný, Státní veterinární ústav, pošt. schránka Ostrava 86, 723 08 Ostrava-Martinov

DYNAMIKA KONCENTRACE KYSELINY MOČOVÉ V JÁTRECH KOHOUTKŮ PŘI MODELOVÉ STRESSOVÉ SITUACI NAVOZENÉ HLADOVĚNÍM

K. Koudela

KOUDELA, K. (Vysoká škola zemědělská, Praha): *Dynamika koncentrace kyseliny močové v játrech kohoutků při modelové stressové situaci navozené hladověním*. Vet.Med., Praha, 23, 1978 (9) : 573-576.

Nutriční deprivaci jsme navodili modelovou stressovou situací. Do pokusu bylo zařazeno celkem 130 kohoutků výchozího plemene leghornka bílá. Pokusní kohoutci ve věku 18 až 24 dny hladověli po dobu 24, 48 a 72 hodiny. Kyselinu močovou jsme stanovili v supernatantu jaterního homogenátu kolorimetricky reduktometrickou metodou s fosfowolframovým činidlem. Při modelovém stresu byl zjištěn signifikantní vzestup koncentrace kyseliny močové v játrech pokusných kohoutků: z výchozích $70,25 \pm 8,94$ mg na 100 g se progresivně zvyšovala koncentrace kyseliny močové na $93,15 \pm 9,66$ mg na 100 g po 24 hodinách hladovění, na $90,23 \pm 7,84$ mg na 100 g po 48 hodinách pokusného období a dokonce na $137,04 \pm 15,59$ mg na 100 g po třídním hladovění po dobu 72 hodin. Po realimentaci se vrátily koncentrace kyseliny močové k fyziologickým hodnotám již do 24 hodin.

kur domácí; modelový stress; hlad; kyselina močová; játra

Velkochovy drůbeže je nutné chránit před vlivy a účinky stressorů, zvláště před jejich negativními metabolickými důsledky. V jiné naší práci se prokázalo významné ovlivnění tkáňových a sérových bílkovin za modelové stressové situace (Koudela aj., 1975a, b). Vlivy bílkovinné deplece a při drastických pokusných podmínkách krátkodobého nebo protrahovaného hladu na změny v syntéze kyseliny močové v játrech ptáků nejsou v dostupné literatuře popsány.

Cílem studia bylo poskytnout zprávy o změnách v koncentracích kyseliny močové v játrech hladovějících kuřat.

MATERIÁL A METODA

Do pokusu jsme zařadili celkem 130 kohoutků, výchozí plemeno LB, užitkový hybrid Primant, věk 18 dní. Kohoutci byli ustájeni za vyhovujících zootechnických podmínek v bateriové odchovně BIOS. Kontrolní kohoutci dostávali krmnou směs „K“, vodu a grit *ad libitum*. Pokusným kohoutkům bylo 18. den života v 06.00 hodin odstraněno krmivo, napájení bylo zachováno. Po 24, 48 a 72 hodinách hladovění jsme kohoutky utráceli dekapitací. Po 75 hodinách pokusu jsme jedné skupině pokusných kohoutků podali krmnou směs „K“, realimentaci jsme sledovali po dobu tří dnů.

Kyselinu močovou jsme stanovili v supernatantu homogenátu jater kolorimetricky podle Hořejšího aj. (1964). Výsledky jsme hodnotili běžnými metodami variační statistiky.

Množství kyseliny močové v jaterním homogenátu bylo u skupiny hladovějících kohoutků 19., 20. a 21. den života vyšší než u zvířat kontrolních (tab. I).

I. Koncentrace kyseliny močové v homogenátu jater kohoutků při modelové stressové situaci (v mg na 100 g) — Uric acid concentration in the liver homogenate of cockerels subjected to a model stress situation (mg per 100 g)

Věk	Skupina	$\bar{x}$	s	v
18	kontrolní (K)	70,25	8,94	12,72 %
19	kontrolní	71,44	9,23	12,92
	pokusná (H)	93,15	9,66	10,36
20	kontrolní	62,42	5,58	8,94
	pokusná	90,23	7,84	8,68
21	kontrolní	115,72	5,93	5,12
	pokusná	137,04	15,59	11,37
Realimentace				
22	kontrolní	72,06	5,45	7,56
	pokusná	73,66	10,77	14,61
23	kontrolní	53,49	8,06	15,07
	pokusná	53,84	7,44	13,81
24	kontrolní	77,34	6,85	8,85
	pokusná	77,25	6,38	8,25

Vzestup koncentrace kyseliny močové v játrech byl statisticky významný. Na 5% hladině významnosti jsme zjistili statisticky významné rozdílné průměry mezi těmito skupinami pokusných a kontrolních kohoutků:

$19_H \times 18_K, 19_K$

20_H a 20_K

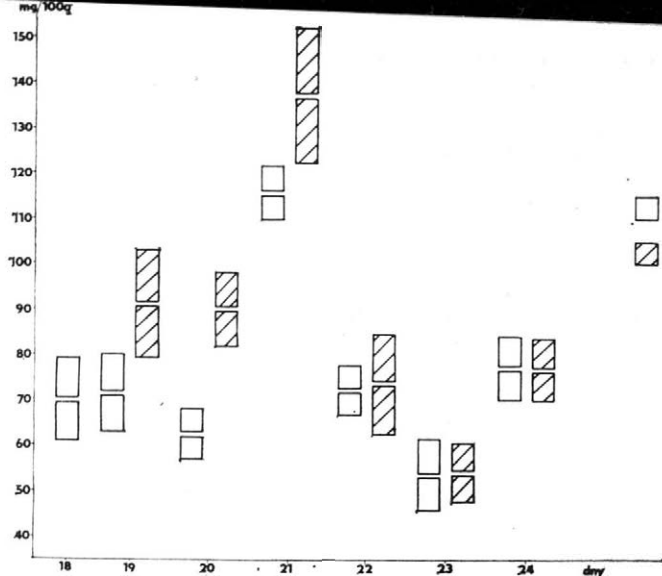
$21_H \times 21_K, 18_K, 19_{H,K}, 20_{H,K}, 22_{H,K}, 23_{H,K}, 24_{H,K}$

Signifikantní zvýšení koncentrace kyseliny močové u hladovějících kohoutků dosáhlo průměrně 20 až 30 mg na 100 g ve srovnání s kohoutky kontrolními.

Realimentace od 21. dne života kohoutků vyvolala již po 24 hodinách normalizaci koncentrace kyseliny močové. Pozoruhodné je, že koncentrace kyseliny močové byla po realimentaci u obou skupin vyšetřovaných kohoutků téměř shodná (obr. 1).

Koncentrace kyseliny močové v jaterním homogenátu dosáhly fyziologických hodnot, které jsme zjistili při studiu ontogenetické dynamiky kyseliny močové v játrech kohoutků.

Výrazné změny v koncentracích kyseliny močové v jaterním homogenátu ilustrují změny v její biosyntéze. Zvýšený katabolismus bílkovin u hladovějících kohoutků, příznačný pro procesy glukoneogeneze, poskytuje játrům z rozkládaných endogenních nukleoproteinů dostatek ma-



1. Změny v koncentraci kyseliny močové v jaterním homogenátu kohoutků výchozího plemene leghornka bílá při modelovém stresu navozeném nutriční deprivací — Changes in uric acid concentration in the liver homogenate of cockerels of the initial breed White Leghorn subjected to a model stress situation created by nutrition deprivation

teriálu pro biosyntézu kyseliny močové. Při hladovění se rozkládají tkáňové bílkoviny až na aminokyseliny, které vstupují do společné „aminokyselinové hotovosti“. O aminokyselinách věděl již před 100 lety Knierie (1877), že stimulují syntézu kyseliny močové, zvláště glutamin, arginin, lysin a glycin (Karasawa aj., 1973; Kadirvel aj., 1974), stejně tak jako octan amonný (Scholz, 1970; Karasawa a Tasaki, 1973). Při hladovění se zmíněných metabolitů dostává krví do jater zvýšené množství (Sykes, 1971; Bell, 1971), což se následně projeví zvýšením syntézy kyseliny močové v játrech. Otevřená zatím zůstává interakce proteinového metabolismu a glukokortikoidů i ACTH, které studujeme v jedné etapě výzkumu stressových reakcí kura domácího. Lehké zvýšení koncentrace kyseliny močové v játrech kontrolních kohoutků ve věku 21 den bylo vyvoláno sníženým a opožděným příjmem krmiva při krátkodobém výpadku elektrického proudu.

Literatura

- BELL, D. J.: NPN and its fractions in plasma and erythrocytes. In: BELL, D. J. — FREEMAN, B. J.: Physiology and biochemistry of the domestic fowl. London — New York, Academic Press 1971, s. 921-931, Vol. 2.
- HOREJŠÍ, J. — FASSATI, M. — JÍCHA, J. aj.: Základy chemického vyšetřování v lékařství. 6. vyd. Praha, Stát. zdrav. nakl. 1964. 643 s.
- KADIRVEL, R. — VOHRA, P. — KRATZER, F. H.: Arginine, lysine and glycine interactions in the nutrition of chick. J. Nutr., 104, 1974, č. 9, s. 1127-1134.
- KARASAWA, Y. — TASAKI, I. — YOKOTA, H. O. — SHIBATA, F.: Effect of infused glutamine on uric acid synthesis in chickens fed high and low protein diets. J. Nutr., 103, 1973, č. 4, s. 526-529.
- KARASAWA, Y. — TASAKI, I.: Effect on uric acid synthesis of the infusion of various levels of ammonium acetate or glutamine in chickens. J. Nutr., 103, 1973, č. 12, s. 1727-1730.
- KOUDELA, K. — SOVA, Z. aj.: Dynamika kyseliny močové a močoviny ve tkáních a v krvi kura domácího za fyziologických a modelových stressových podmínek. [Závěrečná zpráva výzk. úkolu VI-6-5/14.] Praha, Vysoká škola zemědělská 1975a. 215 s.
- KOUDELA, K. — SOVA, Z. — BALOUN, F. aj.: Dynamika sérových a tkáňových bílkovin kura domácího za modelové stressové situace. [Závěrečná zpráva 1. etapy výzk. úkolu VI-6-5/14.] Praha, Vysoká škola zemědělská 1975b. 77 s.

KOUDELA, K. — VEVERKOVÁ, K. — KETTNEROVÁ, O. — SOVA, Z. — FUČÍKOVÁ, A. — NĚMEC, Z.: Úloha jater a ledvin v biosyntéze kyseliny močové u kura domácího včasně postinkubační ontogenezi. In: Sborník VŠZ Praha, fak. agronom., řada B, díl 1, 1976, s. 73-82.

SCHOLZ, R. W.: Comparative studies on liver and kidney xanthine dehydrogenase in two breeds of domestic chicks (*Gallus domesticus*) during prolonged starvation. Comp. Biochem. Physiol., 36, 1970, č. 4, s. 503-512.

SYKES, A. H.: Formation and composition of urine. In: BELL, D. J. — FREEMAN, B. M.: Physiology and biochemistry of the domestic fowl. London-New York, Academic Press 1971, s. 233-278, Vol. 1.

Došlo dne 23. 1. 1978

КОУДЕЛА, К. (Сельскохозяйственный институт, Прага): Динамика концентрации мочевой кислоты в печени петушков в модельной стрессовой ситуации, вызванной голоданием. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 573-576.

С помощью лишения петушков пищи была установлена модельная стрессовая ситуация с участием около 130 петушков исходной породы леггорн белый. Петушки в возрасте 18—24 дней голодали в течение 24, 48 и 72 час. Мочевую кислоту определяли в супернатанте гомогената печени по колориметрическому редуктометрическому методу с фосфовольфрамовым реагентом. В ходе модельного стресса установлен значимый рост концентрации мочевой кислоты в печени подопытных петушков: с исходных $70,25 \pm 8,94$ мг на 100 г, этот рост прогрессировал до $93,15 \pm 9,66$ мг на 100 г спустя 24 часа голодания, до $90,23 \pm 7,84$ мг на 100 г спустя 48 часа голодания и даже $137,04 \pm 15,59$ мг на 100 г после трехдневного голодания, 72 часа. После восстановления питания концентрации мочевой кислоты вернулись к своим физиологическим значениям уже спустя 24 часа.

домашняя птица; модельный стресс; голод; мочевая кислота; печень

KOUDELA, K. (University of Agriculture, Praha): Dynamics of Uric Acid Concentration in the Liver of Cockerels Subjected to Model Stress Situation Created by Fasting. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 573-576.

A model stress situation was created by nutrition deprivation. The experiment was performed with 130 cockerels of the initial breed White Leghorn. The experimental cockerels of the age of 18 to 24 days fasted for 24, 48 and 72 hours. Uric acid was determined in the supernatant of liver homogenate by means of a colorimetrically reductometric method with the phospho-wolframic agent. A significant increase in the uric acid concentration in the liver of the cockerels was found out during the model stress: the concentration of uric acid increased progressively from the initial 70.25 ± 8.94 mg per 100 g to 93.15 ± 9.66 mg per 100 g after 24-hour fasting, to 90.23 ± 7.84 mg per 100 g after 48-hour fasting and even to 137.04 ± 15.59 mg per 100 g after three-day fasting of 72 hours. After re-alimentation, the concentrations of uric acid were reduced to physiological values already within 24 hours.

domestic fowl; model stress; fasting; uric acid; liver

KOUDELA, K. (Landwirtschaftliche Hochschule, Praha): Dynamik der Konzentration der Harnsäure bei der durch Hunger herbeigeführten Modellstresssituation. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (9) : 573-576.

Die Nutritionsdeprivation wurde durch die Modellstresssituation herbeigeführt. In den Versuch wurden insgesamt 130 junge Hähne der Ausgangsrasse weißes Leghornhuhn eingereiht. Die jungen Versuchshähne im Alter von 18 bis 24 Tagen hungerten im Laufe von 24, 48 und 72 Stunden. Die Harnsäure wurde im Supernatant des Leberhomogenats durch die kolometrisch reduktometrische Methode mit Wolframatophosphatmittel bestimmt. Bei dem Modellstreß wurde der signifikante Aufstieg der Konzentration der Harnsäure in den Lebern junger Hähne festgestellt: von dem Ausgangswert $70,25 \pm 8,94$ mg je 100 g erhöhte sich progressiv die Konzentration der Harnsäure auf $93,15 \pm 9,66$ mg je 100 g nach 24 Stunden des Hungerns, auf $90,23 \pm 7,84$ mg je 100 g nach 48 Stunden des Versuchszeitraums und sogar auf $137,04 \pm 15,59$ mg je 100 g nach dreiwöchigem Hungern im Laufe von 72 Stunden. Nach der Realimentation wiesen die Konzentrationen der Harnsäure schon nach 24 Stunden die früheren physiologischen Werte auf.

Haushuhn; Modellstreß; Hunger; Harnsäure; Leber

Adresa autora:

Doc. MVDr. Karel Koudela, CSc., Vysoká škola zemědělská, 160 21 Praha 6 - Suchbát

Kubiček K., Hojovec J.: Vliv různého množství 3% a 5% Jodonalu A na účinnost dezinfekce ve výkrmnách prasat	513
Žižková P., Goiš M., Kuksa F.: Identifikace některých porcinních mykoplazmat epi-imunofluorescencí	521
Šišák F., Goiš M., Kuksa F.: Citlivost kmenů <i>Bordetella bronchiseptica</i> , <i>Pasteurella multocida</i> a <i>Mycoplasma hyorhinis</i> izolovaných z prasat k antibiotikům a chemoterapeutikům	531
Bartoš J., Matyáš Z.: Průzkum možné přítomnosti aflatoxinu B ₁ v játrech a svalovině jatečných zvířat	541
Malíková M., Habrda J., Matyáš Z.: Vyšetření tržních kaprů na rezidua antimikrobiálních látek	549
Veselý D., Veselá D., Kusák V., Nesnídal P.: Distribuce perorálně podaného aflatoxinu B ₁ ve tkáních a orgánech kozy (<i>Capra</i>)	555
Bartoš J., Matyáš Z.: Výběr metod pro zjišťování přítomnosti aflatoxinů v tekutém mléce	559
Konečný S.: Detekce inhibičních látek v mléce modifikovanou redukční mikrometodou	569
Koudela K.: Dynamika koncentrace kyseliny močové v játrech kohoutků při modelové stressové situaci navozené hladověním	573

СОДЕРЖАНИЕ

Кубичек К., Гойовец Й.: Влияние разного количества 3% и 5% раствора Йодонала А на действенность дезинфекции в свиноматочниках	513
Жиждова П., Гоиш М., Куksa Ф.: Идентификация некоторых свиных микоплазм с помощью эпи-иммунофлуоресценции	521
Шишак Ф., Гоиш М., Куksa Ф.: Восприимчивость штаммов <i>Bordetella bronchiseptica</i> , <i>Pasteurella multocida</i> и <i>Mycoplasma hyorhinis</i> , изолированных у свиней, к антибиотикам и химиотерапевтикам	531
Бартош Й., Матиаш З.: Определение возможного наличия aflatoxина B ₁ в печени и мышцах боенских животных	541
Маликова М., Габрда Й., Матиаш З.: Исследование товарного карпа на остатки антимикробных веществ	549
Веселы Д., Весела Д., Кусак В., Неснидал П.: Распределение получаемого через рот aflatoxина B ₁ в тканях и органах козы (<i>Capra</i>)	555
Бартош Й., Матиаш З.: Выбор методов определения присутствия aflatoxinов в жидком молоке	559
Конечны С.: Детектирование ингибирующих веществ в молоке при помощи модифицированного восстановительного микрометода	569
Коудела К.: Динамика концентрации мочевой кислоты в печени петушков в модельной стрессовой ситуации, вызванной голоданием	573

CONTENTS

Kubiček K., Hojovec J.: The Effect of Different Amounts of 3% and 5% Solutions of Jodonal A on the Effectiveness of Disinfection in Pig Fattening Houses	513
Žižková P., Goiš M., Kuksa F.: The Epi-immunofluorescent Identification of Some Porcine Mycoplasmas	521
Šišák F., Goiš M., Kuksa F.: The Sterility of the Strains of <i>Bordetella bronchiseptica</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , and <i>Mycoplasma hyorhinis</i> , Isolated from Pigs, to Antibiotics and Chemotherapeutics	531
Bartoš J., Matyáš Z.: Research on the Contingent Presence of Aflatoxin B ₁ in the Liver and Muscle of Slaughter Animals	541
Malíková M., Habrda J., Matyáš Z.: Examination of Market Carp for Residues of Antimicrobial Substances	549
Veselý D., Veselá D., Kusák V., Nesnídal P.: Distribution of Perorally Administered Aflatoxin B ₁ in the Tissues and Organs of Goat (<i>Capra</i>)	555
Bartoš J., Matyáš Z.: The Choice of Methods for Determining the Presence of Aflatoxin in Liquid Milk	559
Konečný S.: Detection of Inhibitory Substances in Milk by means of a Modified Reduction Micromethod	569
Koudela K.: Dynamics of Uric Acid Concentration in the Liver of Cockrels Subjected to Model Stress Situation Created by Fasting	573

Kubiček K., Hojovec J.: Einfluß einer unterschiedlichen Menge von drei- und fünfprozentiger A-Jodonal-Lösungen auf die Desinfektionswirkung in Schweinemästereien	513
Žižková P., Goiš M., Kuksa F.: Identifizierung einiger porciner Mykoplasmen mit Hilfe der Epi-Immuno-fluoreszenz	521
Šišák F., Goiš M., Kuksa F.: Sensibilität der aus Schweinen isolierten Stämme <i>Bordetella bronchiseptica</i> , <i>Pasteurella multocida</i> und <i>Mycoplasma hyorhinis</i> gegen Antibiotika und Chemotherapeutika	531
Bartoš J., Matyáš Z.: Untersuchungen über die mögliche Anwesenheit von Aflatoxin B ₁ in der Leber und Muskulatur von Schlachttieren	541
Malíková M., Habrda J., Matyáš Z.: Untersuchungen von Marktkarpfen und Residuen antimikrobieller Stoffe	549
Veselý D., Veselá D., Kusák V., Nesnídal P.: Distribution vom peroral verabreichten Aflatoxin B ₁ Geweben und Organen der Ziege (<i>Capra</i>)	555
Bartoš J., Matyáš Z.: Auswahl von Methoden zur Feststellung der Anwesenheit von Aflatoxinen in flüssiger Milch	559
Konečný S.: Nachweis von Inhibitionsstoffen in Milch durch die modifizierte Reduktionsmikromethode	569
Koudela K.: Dynamik der Konzentration der Harnsäure in den Lebern junger Hähne bei der durch Hunger herbeigeführten Modellstreßsituation	573

Rukopis odevzdán k tisku 4. 7. 1978 – Podepsáno k tisku 13. 9. 1978

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.