

VĚDECKÝ ČASOPIS



VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

10

ROČNÍK 24 (LII)
PRAHA
ŘÍJEN 1979
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., akademik Jaroslav Vrtiak, DrSc.

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

Redaktorka ing. Jovanka Václavičková

© Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, Praha 1979

■

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, Слезка 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

ZMĚNY V ULTRASTRUKTUŘE SPERMIÍ BÝKŮ SE SNÍŽENOU AKTIVITOU A MRIZITELNOSTÍ SPERMATU

O. Rob, J. Rozinek, J. Somol, H. Adamovská, J. Kopecká, E. Kopecká

ROB, O. — ROZINEK, J. — SOMOL, J. — ADAMOVSÁ, H. — KOPECKÁ J. — KOPECKÁ, E. (Vysoká škola zemědělská, Praha - Suchdol; Okresní veterinární zařízení, Praha-východ): *Změny v ultrastruktuře spermií býků se sníženou aktivitou a mrazitelností spermatu*. Vet. Med., Praha, 24, 1979 (10) : 577-586.

Na plemenářské stanici K. došlo k poklesu mrazitelnosti spermatu, který trval déle než rok. Z 2550 ejakulátů odebraných za 12 měsíců od 42 plemenných býků bylo 685, tj. 26,7 %, nepoužitelných hned po odběru spermatu převážně pro nízkou aktivitu spermií a patologické formy jejich pohyblivosti a dalších 469 ejakulátů, tj. 18,3 %, bylo nepoužitelných po zmrazení spermatu; celkově byly tedy nepoužitelné 1154 (tj. 45,2 %) ejakuláty. Vítálně-letálním primulinovým testem jsme zjistili rychlé odumírání spermií po odběru. Vyšetřením spermií elektronovým mikroskopem již v začátku procesu byly zjistitelné změny v ultrastruktuře bičíku, zejména spojovací části (deformitní tvar, neúplná sada osových vláken, vakuolizace bičíku, abnormální uspořádání mitochondriální spirály), dále četné abnormality zevní cytoplazmatické membrány a invaginace, vakuolizace a abnormální denzita nukleoplazmy. Primární změny na bičících a v jádře spermií potvrzují alteraci tkáně varlete. Mezi možné etiologické činitele těchto procesů patřilo zeslabení odolnosti býků v důsledku dlouhodobé zdravotně závažné výživy krmiv kontaminovaných plísními *Aspergillus fumigatus*, nedostatečný pohyb a nízká zoohygiena býků s druhotným uplatněním infekčních zárodků *Mykoplasma bovis genitalium*, které byly kultivačně prokázány z 50 % ejakulátů býků; pozitivní titr protilátek byl prokázán u všech býků.

býk; ultrastruktura spermií; mykoplazmata; nízká mrazitelnost

Vysoké koncentrace v našich chovech skotu si vyžadují zvýšenou péči o reprodukční proces, který lze úspěšně zabezpečit pouze odpovídající výživou a zamezením šíření infekčních chorob, protože tyto dva faktory jsou nejčastější příčinou hromadných poruch plodnosti. Šířitelem infekčních nemocí mohou být i plemenní býci, protože většina zárodků se může přenášet i zmrazeným semenem. Příčiny poruch spermiogenní aktivity plemeníků a snížení oplozovací schopnosti jejich spermatu jsou vyvolávány buď vlivy alimentárními nebo infekčními (Rob aj., 1973). Správná výživa je základní podmínkou zdraví a dobré plodnosti. Ovlivňuje množství a kvalitu spermatu a pohlavní aktivitu. Nedostatečná výživa způsobuje degenerativní procesy na pohlavním aparátu (Gamčík a Kozumplík, 1976). Poruchy ve výživě se projeví špatnou funkcí neurohumorálního systému, poruchou spermiogeneze a vlastní semenné plazmy. Pro dobrý zdravotní stav býků je důležitá především zdravotní nezávadnost krmiv. Závadná krmiva, především zvýšené pro-

cento kyselosti, napadení plísněmi apod., mohou vyvolat poruchu spermiogeneze, fertilizační schopnosti ejakulátů, poruchu vlastností semené plazmy, ale i degeneraci zárodečného epitelu. Sperma je řidší, má sníženou aktivitu, kratší přežitelnost a zvýšený výskyt patologických spermií (Rob aj., 1973).

Organismus oslabený neadekvátní výživou je snadno přístupný různým infekcím. V současné době se velká pozornost věnuje problematice bedsoniízy, infekce virem IBR-IPV, BVD, PI-3 a infekce mykoplazmaty (Gamčík a Kozumplík, 1976).

V roce 1937 byla izolována mykoplazmata z pohlavního a močového ústrojí lidí. O deset let později byly popsány první izolace ze seminálních výtěrů býků a vaginálních výtěrů neplodných krav (Edward aj., 1947). Dosavadní poznatky nasvědčují tomu, že mykoplazmata jsou součástí mikrobiální flóry osidlující sliznice pohlavního ústrojí; při snížené rezistenci hostitele jsou některé kmeny schopny vyvolat nebo komplikovat onemocnění (Gamčík a Kozumplík, 1976). Mykoplazmata jsou drobná elementární tělíska o velikosti 125 až 150 milimikronů, procházející bakteriálními filtry. Velikostí se podobají myxovirům. Jsou vybavena enzymatickými systémy a genetickými mechanismy, proto mohou existovat nezávisle na buněčném substrátu. Mohou růst za aerobních i anaerobních podmínek, optimální pH je 7,6 až 8,0. Jsou citlivá na antibiotika tetracyklinové řady. Jsou přítomna u nejrozličnějších druhů živých organismů, v půdě i v odpadních vodách (Soběslavský aj., 1976). Skalka (1968) uvádí, že mykoplazmata mohou být u všech živých organismů jak patogenní, tak i nepatogenní. U živočichů se vyskytují také jako epifytní mikroflóra, hlavně na sliznici dýchacích cest a pohlavních orgánů. Hirth aj. (1966, 1967) uvádějí, že mykoplazmata jsou i ve zmrazeném ejakulátu. Tímto ejakulátem vyvolali onemocnění pohlavního aparátu a poruchy plodnosti u pokusných jalovic. Berchtold a Bögel (1962) popsali výskyt poruch spermiogeneze býků, vyvolaných mykoplazmaty, které vedly až k dočasným azoospermii. Hirth aj. (1966) popsali genitální mykoplazmózu u skotu a člověka. U infikovaných plemenic došlo k zánětu vejcovodů a dělohy. Otázkami neplodnosti skotu v důsledku infekcí mykoplazmaty se v roce 1974 zabývala komise mykoplazmologů při světové organizaci FAO/WHO. Členové této komise upozorňují na případy spontánních i experimentálních vezikulitid a salpingitid způsobených mykoplazmaty. Hirth aj. (1966) popsali záněty vejcovodů a vaječníků u skotu, vyvolané spermatem obsahujícím mykoplazmata, která bylo potom možné izolovat z cervikálního a poševního hlenu po osm měsíců po inseminaci. Cerkasová a Danylko (1974) izolovali mykoplazmata z cyst na vejcovodech a děložních rožích plemenic. Jurmanová a Jiránek (1977) izolovali pět až šest kmenů mykoplazmat z 202 vzorků. Většina byla identifikována jako *Mykoplasma bovigenitalium*. Z 202 vzorků 31 % vykazovalo pozitivní nálezy mykoplazmat. Za nejvhodnější antibiotikum doporučují tylan. Jurmanová aj. (1977) sledovali dále vztah mezi kvalitou ejakulátů a jejich kontaminací mykoplazmaty. U 13 % byla snížená koncentrace a u 27 % byla aktivita nižší než 70 %. Parsonson (1970) sledoval vztah mezi mykoplazmaty a morfologií spermatu. Morfologie se nemění, ale roste procento mrtvých spermií a klesá výrazně jejich životnost.

METODA

Pracovali jsme na plemenářské stanici K., kde byli v údobí 12 měsíců ustájeni v průměru 42 býci. Blíže jsme sledovali 25 býků plemene české strakaté. Od každého býka jsme odebrali nejméně deset ejakulátů. Hodnotili jsme výskyt morfologických abnormalit spermií, k čemuž jsme použili barvicí metody Wels-X (Rob, 1975) a vitálně-letálního testu s barvivem Primulin 0 čs. výroby, pH 6,8 (Rob, 1975). Dále jsme sledovali a hodnotili objem, koncentraci a aktivitu spermatu čerstvého a aktivitu spermatu hluboce zmrazeného. Šest ejakulátů bylo vyšetřeno elektronovým mikroskopem, elektronogramy byly zhotoveny v laboratoři elektronové mikroskopie katedry veterinárních disciplín VŠZ v Praze. V souvislosti s kvalitou spermatu jsme vyhodnotili zdravotní nezávadnost krmiv a výsledky sérologických a kulturních vyšetření na bedsoniízu, IBR, PI-3 a mykoplazmata. Tato vyšetření se dělala v ÚSVÚ Praha, SVÚ Český Brod a SVÚ Pardubice. Dále byla u odporazených býků s poruchami spermiogeneze histologicky vyšetřena varlata.

Na sledované plemenářské stanici se začátkem března začala u všech býků projevovat snižená mrazitelnost spermatu a později i zhoršená aktivita ejakulátu po odběru. Po odběru docházelo ke stáčení bičíků ve tvaru houslového klíče, často kolem zadržených protoplazmatických kapek, ke kolébavému pohybu na místě a ke kruhovému pohybu.

Před nástupem těchto změn se v ejakulátu masívně začaly objevovat miliární pleiomorfní buněčné útvary, barvící se Giemsou. Byly rovněž pozorovatelné ve fázově kontrastním mikroskopu, přičemž výskyt primárních morfologických abnormalit spermií zjištěných ve světelném mikroskopu byl v normálních hranicích. Již na začátku těchto procesů se však objevily morfologické abnormality v ultrastruktuře spermií, zjištěné vyšetřením elektronovým mikroskopem. Vyšetřeno bylo sperma čtyř býků s tímto výsledkem:

Býk A — vyšetření elektronovým mikroskopem prokazuje u vysokého počtu spermií tvarově abnormální vývoj bičíku, výrazné poškození zevní cytoplazmatické membrány, zejména její uvolnění, zřasení a bulózní ektaze často výrazného stupně. Závažný byl nálezní alterace nukleoplazmy, zejména výskyt invaginací nukleoplazmy, což je průkazem probíhajících degenerativních změn na zárodečném epitelu, výskyt inkluzních tělísek pod cytoplazmatickou membránou, vakuolizace jádra a bičíku. Dále byly zjištěny časté volné protoplazmatické kapky a nefyziologická přítomnost buněčného detritu.

Býk B — u více než 50 % hlaviček bylo zjištěno zbobtnání cytoplazmatických membrán různého stupně, uvolnění povrchových membrán hlavičky a krčku, abnormální vývoj zkrácených krčků, tvarové deformity bičíku, vakuolizace jádra a výskyt volných protoplazmatických kapek.

Býk C — vysoké procento alterovaných spermií vykazuje uvolnění a rozpad povrchové membrány, uvolnění akrosomu a postakrosomální čapky; často se vyskytovala i nepravidelná barvitelnost nukleoplazmy.

Býk D — v morfologickém obraze převládá morfologicky abnormální vývoj bičíků, vakuolizace v oblasti hlavní části bičíků, výskyt inkluzních tělísek pod povrchovou membránou, mírné uvolnění povrchových membrán u více než 50 % hlaviček a dále výskyt miliárních elementárních částic neznámé etiologie, volné cytoplazmatické kapky a buněčný detritus.

Spermilogická vyšetření dále ukázala, že u všech býků se zvyšoval výskyt nezralých spermií se zadržením protoplazmatické kapky na krčku nebo spojovací části bičíku, který dosahoval hodnoty až 60 %. Vedle toho byl pro tyto býky typický velký výskyt volných protoplazmatických kapek.

Fluorescenční mikroskopická vyšetření však prokázala zároveň poškození akrosomálního systému různého stupně u 18 až 56 % spermií.

Z těchto vyšetření vyplynul závěr: Morfologická vyšetření elektronovým mikroskopem potvrdila, že jde jednak o sekundární změny vyvolané působením neadekvátní semenné plazmy, jednak o primární změny, které poukazují na degenerativní změny na zárodečném epitelu. Zvýšené procento volných protoplazmatických kapek poukazuje na alterace epitelu nadvarlečního traktu. Lze soudit, že primární příčinou budou faktory

alimentární, ale nelze vyloučit druhotné působení infekčních agens na zeslabeném organismu. To však bylo nutné potvrdit laboratorním vyšetřením krmiv, metabolickými testy a sérologickým a kultivačním vyšetřením.

Vzhledem k tomu, že změny ve spermatu odpovídaly nejpravděpodobněji vlivům neadekvátní výživy, vyšetřili jsme zdravotní nezávadnost krmiv s těmito nálezy:

V květnu byla naklíčená pšenice silně přerostlá plísněmi *Aspergillus fumigatus*, *Absidia*;

krmná směs granule B vykazala střední výskyt plísně *Aspergillus fumigatus* a vysoké číslo kyselosti;

sušené řízky byly silně přerostlé plísní *Aspergillus fumigatus*;

sláma pšeničná byla pro silný výskyt plísně *Aspergillus fumigatus* hodnocena jako zdravotně závadná.

V červnu byla krmná směs granule B pro vysokou kyselost hodnocena jako podmíněně požitelná.

V červenci krmná směs granule B vykazala silný výskyt plísně *Aspergillus fumigatus* a vysoké číslo kyselosti.

V září krmná směs granule B opět vykazala kontaminaci plísně *Aspergillus fumigatus* a vysoké číslo kyselosti.

Uvedené nálezy potvrdily, že plísně vyskytující se v krmivu, které jsou patogenní pro pohlavní aparát, mohly působením svých toxinů nepříznivě ovlivnit kvalitu spermatu a zároveň snížit odolnost organismu býků vůči jiným infekcím.

Dále jsme věnovali pozornost jednotlivým složkám ředidel. Vyšetřili jsme glycerin, laktózu a vaječný žloutek. U glycerinu byla zjištěna nižší koncentrace, tj. 89,10 % (požadovaná koncentrace je 99,5 %), a nízké pH, tj. 5,8. Také u laktózy bylo zjištěno nízké pH, které dosahovalo hodnot až 4,8. Rozbor vaječného žloutku na přítomnost bakterií a salmonel byl negativní.

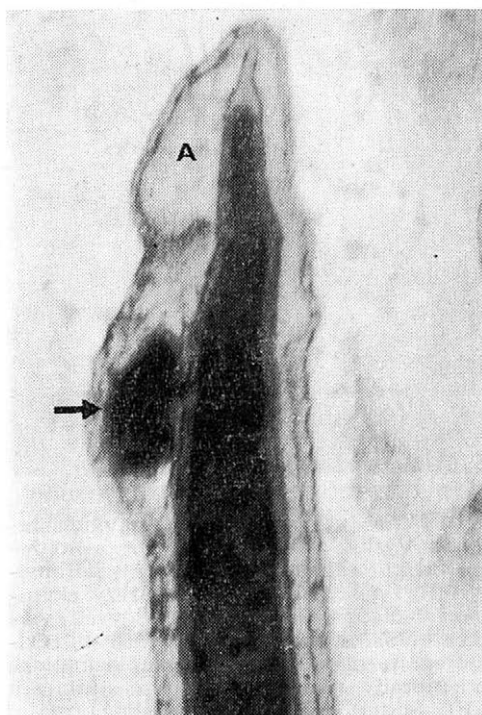
Býci chovaní na PS-X byli v prosinci roku 1976 sérologicky vyšetřeni na bedsoniózu, IBR a PI-3. Z býků prověřovaných na bedsoniózu byli zjištěni dva dubiózní a ostatní negativní, na IBR všichni negativní a na PI-3 bylo pět býků pozitivních, ostatní negativní.

Dále bylo v srpnu roku 1976 vyšetřeno deset býků na mykoplasmatu. Sérologickým vyšetřením byl prokázán u všech vysoce pozitivní titr protilátek na *Mycoplasma bovis genitalium*. Kultivačním vyšetřením byl izolován zárodek *M. bovis genitalium* u 50 % vyšetřovaných býků.

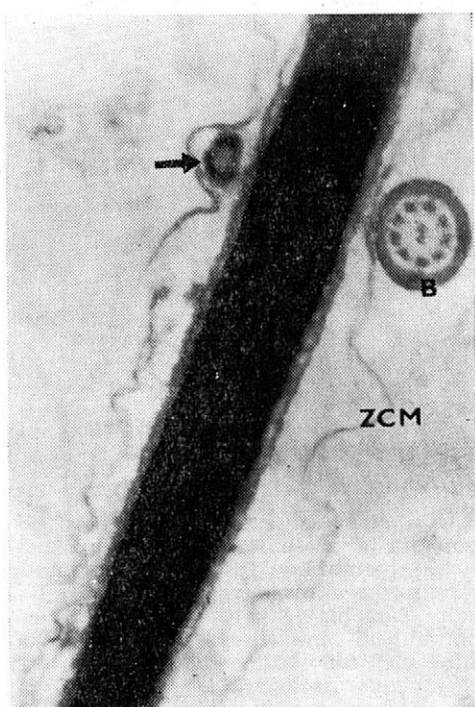
Během roku 1976 byly mikrobiologicky vyšetřeny ejakuláty. Z nich odpovídalo ČSN „Sperma býka“ 90,9 % ejakulátů, neodpovídalo 9,1 %. Mezi bakteriálními nálezy převládaly zárodky *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa* a saprofytické korynebakterie.

Protože u všech býků vyšetřených na mykoplasmatu byl sérologickým vyšetřením zjištěn vysoce pozitivní titr protilátek na *M. bovis genitalium* a kultivačním vyšetřením dále u 50 % býků izolován zárodek *M. bovis genitalium*, byli léčebně ošetřeni všichni býci antibiotickým preparátem TYLAN 200. S léčbou bylo započato koncem října. Léčba trvala pět dní, z toho první dva dny bylo antibiotikum aplikováno v dávce 10 mg na 1 kg živé hmotnosti, další tři dny v dávce 5 mg na 1 kg živé hmotnosti.

V souvislosti s touto léčbou jsme přistoupili ke speciálnímu morfolo-
gickému sledování ejakulátů skupiny 25 plemenných býků. Zvýšení
morfolo-
gických abnormalit vykazalo 20 % vyšetřených ejakulátů. Prů-
měrně bylo zjištěno ve světelném mikroskopu 13,6 % morfolo-
gických
abnormalit s variancí $\pm 8,96$ a $-2,35$. U všech býků se zvyšoval výskyt
nezralých spermií se zadržanou protoplazmatickou kapkou na krčku
nebo spojovací části a činil průměrně 6,8 % z celkového počtu sledova-
ných spermií. Ve většině ejakulátů se také vyskytovalo větší množství
volných protoplazmatických kapek. Z morfolo-
gických abnormalit se nej-
častěji vyskytovalo zbobtnání akrosomu, změny na bičících, ektaze spo-
jovací části (stočení ve formě houslového klíče, stočení kolem zadrže-

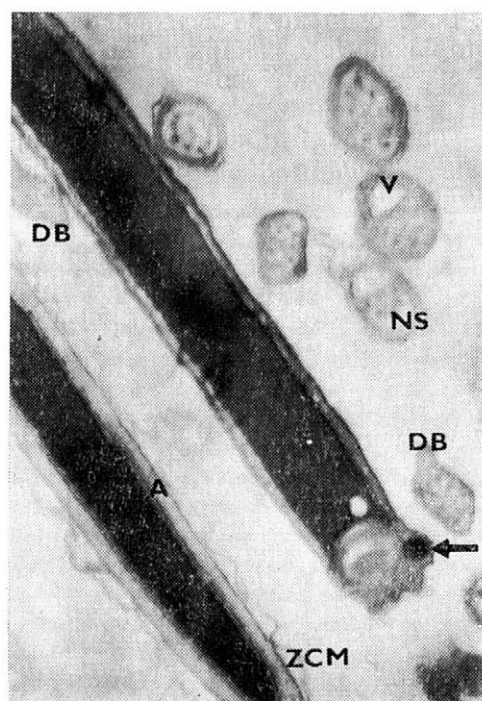


1. Apikální část hlavičky spermie s vý-
razným zbobtnáním akrosomu (A) a vý-
skytem velkého inkluzního tělíska (šíp-
ka) ledvinovitého tvaru s výraznou
elektronovou denzitou. Přímé zvětšení
36 000X — The apical part of the sper-
matozoon head with a marked swelling
of the acrosome (A) and with a large
kidney-shaped inclusion body (arrow)
with pronounced electron density. Direct
magnification 36 000 times

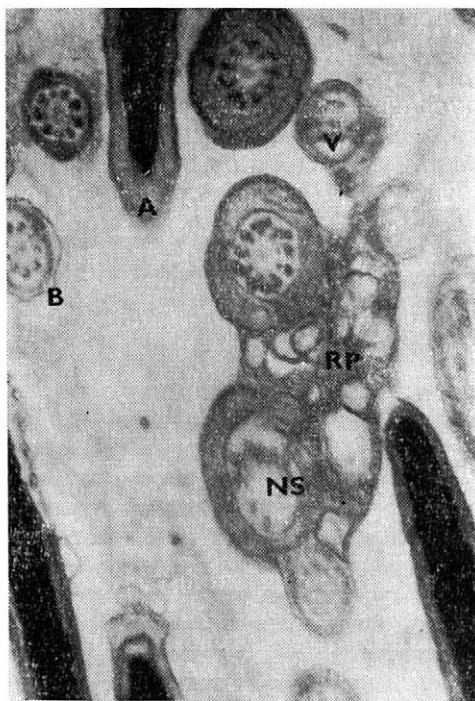


2. Střední část hlavičky spermie s vý-
razným uvolněním a zřasením zevní cy-
toplazmatické membrány (ZCM) a střed-
ně velkým inkluzním tělískem (šípka)
oválného tvaru s centrem o slabé elek-
tronové denzitě. Příčný řez hlavní čás-
tí bičíku (B) s normálním uspořádáním
osových vláken 2 + 9. Přímé zvětšení
36 000X — The central part of the sper-
matozoon head with the markedly loose-
ned and folded external cytoplasmic
membrane and a medium-sized oval
inclusion body (arrow), with a centre
of low electron density. Cross-section
through the main part of the flagellum
(B) with the normal arrangement of
the axial filaments 2 + 9. Direct magnifi-
cation 36 000 times

ných protoplazmatických kapek a zavinutí bičíků) a na třetím místě změny na spojovací části (spiralizace, ztlustění a jiné deformity). Podíl primárních abnormalit na hlavičce byl malý (obr. 1–4).



3. Apikální část spermie s mírným odpojením a zřasením zevní cytoplazmatické membrány (ZCM) a normální strukturou akrosomu (A) – vlevo. Bazální část hlavičky spermie s výskytem okrouhlého inkluzního tělíska (šipka) silné elektronové denzity – vpravo. Výrazné deformace struktury bičíku (DB); řez bičíkem s přítomností vakuoly (V); řez bičíkem s neúplnou sadou osových vláken (NS) a s odpojením a zřasením zevní cytoplazmatické membrány. Přímé zvětšení 22 500X – The apical part of a spermatozoon with slightly disconnected and folded external cytoplasmic membrane and the normal acrosome structure (A) – left. Basal part of the head with a round inclusion body (arrow), showing high electron density – right. Pronounced deformation of the structure of the flagellum (DB); cross-section through the flagellum with the presence of a vacuole (V); cross-section through the flagellum with an incomplete set of axial filaments (NS) and with the disconnected and folded external cytoplasmic membrane. Direct magnification 22 500 times



4. Příčné řezy v různých úrovních bičíků. Výskyt vakuoly (V) v příčném řezu bičíku; retence protoplazmatické hmoty (RP) ve vazbě na příčné řezy skupinou bičíků; neúplná sada osových vláken (NS) na šikmém řezu bičíkem. Odpojení a zřasení zevní cytoplazmatické membrány v úrovni hlavní části bičíku (B). Šikmý řez apikální částí normální hlavičky spermie (A). Přímé zvětšení 22 500X – Cross-sections through the flagellum at different levels. Occurrence of vacuole (V) in the cross-section; retention of protoplasmatic matter (RP) in relation to the cross-sections through a group of flagella; incomplete set of axial filaments (NS) in an oblique section through the flagellum. Disconnected and folded external cytoplasmic membrane at the level of the main part of the flagellum (B). Oblique section through the apical part of a normal spermatozoon head (A). Direct magnification 22 500 times

I. Přehled nepoužitelných ejakulátů po odběru a po zmrazení — A survey of the ejaculates unfit for use after collection and freezing

Měsíc	Počet ejakulátů				% nepoužitel- ných ejaku- látů
	odebraných	nepoužitelných po odběru	nepoužitelných po zmrazení	nepoužitel- ných celkem	
I.	155	31	20	51	32,9
II.	135	21	7	28	20,7
III.	146	44	30	74	50,7
IV.	143	61	32	93	65,0
V.	165	50	36	86	52,1
VI.	215	78	72	150	69,8
VII.	227	118	52	170	74,9
VIII.	245	76	60	136	55,5
IX.	289	66	56	122	42,2
X.	277	59	45	104	37,5
XI.	292	32	27	59	20,2
XII.	261	49	32	81	31,0
Celkem	2550	685	469	1154	
%		26,7	18,3	45,2	45,2

Během roku jsme dále sledovali mrazitelnost ejakulátů. Výsledky jsou shrnuty v tab. I, která znázorňuje přehled ejakulátů neodpovídajících po odběru ČSN „Sperma býka“ a počty ejakulátů nepoužitelných po zmrazení.

Celkově bylo zhodnoceno za rok 1976 2550 ejakulátů, z nichž po odběru neodpovídalo ČSN „Sperma býka“ 685 ejakulátů, tj. 26,7 %. Po zmrazení bylo nepoužitelných dalších 469 ejakulátů, tj. 25,1 % z ejakulátů zmrazovaných. Celkově byly tedy nepoužitelné 1154 ejakuláty, tj. 45,2 %. Nejvíce nepoužitelných ejakulátů bylo před zahájením léčby v měsících dubnu, červnu, červenci, tj. 65,0 %, 69,8 % a 74,9 %. V říjnu, kdy se léčba uskutečnila, bylo ještě 37,5 % ejakulátů nepoužitelných, ale po skončení léčby pouze 20,2 %, což byla nejnižší hranice za celý rok. V prosinci a u některých býků také v lednu a únoru se však opět zvýšil počet nepoužitelných ejakulátů, a to v prosinci na 31,0 %, v lednu na 22,0 % a v únoru na 25,0 %.

Z uvedených výsledků lze usoudit, že u sledované skupiny býků se zdravotní stav zlepšil pouze dočasně. To může nasvědčovat tomu, že antibiotikum TYLAN neovlivnilo terapeuticky trvale aktivitu a přežitelnost spermatu, ale že vyvolalo pouze dočasné zlepšení. Proto lze předpokládat, že došlo buď k nové infekci plemeníků, nebo že TYLAN nebylo antibiotikum na zvládnutí této infekce zcela dostačující, nebo že hlavní příčinou snížení aktivity byly jiné faktory, např. izolované plísňe z krmiv a jejich toxiny, a že mykoplasmata se mohla uplatnit až druhotně v oslabeném organismu.

Sledování ukázala dlouhodobé poruchy v kvalitě ejakulátů většiny býků na PS-X, které byly charakterizované poklesem aktivity spermatu, abnormálními formami pohybu spermií, zvýšeným procesem nezralých spermií a variabilním zvýšením morfologických abnormalit na spermiích zjištělých světelným mikroskopem. Vyšetření elektronovým mikroskopem prokázala dále některé specifické změny na bičících spermiích, na cytoplazmatických membránách, ale zejména invaginaci nukleoplazmy spermií a výskyt pleiomorfních inkluzních tělísek pod zevní cytoplazmatickou membránou a nepravidelnou barvitelnost nukleoplazmy spermií. V údobích s nejnižší mrazitelností spermatu byl i světelným mikroskopem pozorovatelný masivní výskyt miliárních pleiomorfních tělísek.

Výsledky laboratorních testů ukázaly, že na vzniku těchto procesů se mohly podílet plísně a jejich toxiny, zejména plíseň *Aspergillus fumigatus*, která byla zjištěna ve většině vzorků krmiv. V důsledku zeslabení organismu se druhotně mohly uplatnit izolované a sérologicky prokázané zárodky *Mykoplasma bovis genitalium*. Tyto zárodky byly v souvislosti se sníženou mrazitelností prokázány i na dalších plemenářských stanicích (Jurmanová aj., 1977). Tito autoři prokázali statisticky významný vztah mezi přítomností mykoplazmat a sníženou aktivitou spermií. Při tom však nedošlo u býků k procesům azoospermie, jak je popsali Berchtold a Bögel (1962). Jurmanová a Jiránek (1977) doporučili jako nejvhodnější antibiotikum TYLAN, které však na PS-X vyvolalo pouze dočasné zlepšení kvality spermatu. Vzhledem k tomu, že zárodky *Mykoplasma bovis genitalium* byly izolovány i z pohlavního aparátu plemenic skotu v okrese PV a protože řada autorů potvrzuje, že mykoplazmata přežívají i ve zmrazeném spermatu a vyvolávají infekce pohlavního aparátu a poruchy plodnosti (Hirth, 1967; Edward aj., 1947; Hirth aj., 1966; Albertsen, 1955 a jiní), je nutné i nadále otázce mykoplazmat býků věnovat mimořádnou pozornost, aby se předešlo zbytečnému vzniku národohospodářských ztrát při použití tohoto spermatu v inseminační praxi.

ZÁVĚR

Na PS-X se dlouhodobě snížila mrazitelnost spermatu. Za rok 1976 bylo nutné eliminovat celkem 45,2 % ejakulátů.

Ze 48 býků chovaných na stanici bylo sledováno 25 býků. Býci vykazovali v ejakulátu zvýšené procento nezralých spermií, zvýšený výskyt volných protoplazmatických kapek a dočasné zvýšení primárních morfologických abnormalit. Vyšetření elektronovým mikroskopem prokázala specifické změny na cytoplazmatických membránách, invaginaci nukleoplazmy, výskyt pleiomorfních inkluzních tělísek pod zevní cytoplazmatickou membránou spermií a nepravidelnou barvitelnost nukleoplazmy. V období s nejnižší mrazitelností byl i ve světelném mikroskopu pozorovatelný masivní výskyt miliárních pleiomorfních tělísek.

Jako příčinu těchto procesů bylo možné označit výskyt patogenních plísní *Aspergillus fumigatus* ve větši-

ně krmiv a infekci zárodky *Mykoplasma bovigenitalium*. Pětidenní léčba antibiotikem TYLAN 200 pouze dočasně zlepšila mrazitelnost spermatu a již za dva měsíce po léčbě bylo opět 31,0 % ejakulátů nepoužitelných. Vzhledem k tomu, že zárodky *M. bovigenitalium* přežívají i v hluboce zmrazeném spermatu a mohou vyvolávat vážné poruchy plodnosti u inseminovaných krav, je nutné věnovat této problematice i nadále zvýšenou pozornost.

Literatura

- ALBERTSEN, B. E.: Pleuropneumonia-like organisms in the semen of danish artificial insemination bulls. Nord. VetMed., 7, 1955, s. 169-201.
- BERCHTOLD, M. — BÖGEL, K.: Reversible Azoospermie bei Bullen und pleuropneumoniähnliche Organismen (PPLO). Schweiz. Arch. Tierheilk., 2, 1962, s. 104.
- CERKASOVA, G. V. — DANYLKO, L. M.: Gynekologische Erkrankungen der Schweine in großen Herdenbetrieben. Mh. VetMed., 31, 1974, s. 671-674.
- EDWARD, D. G. — HANCOCK, J. L. — HIGNETT, J. R.: Isolation of pleuropneumonia-like organisms from the bovine genital tract. Vet. Rec., 59, 1974, s. 329-330.
- GAMČÍK, P. — KOZUMPLÍK, J.: Alimentární příčiny poruch plodnosti. Umelá inseminácia a andrológia hospodárskych zvierat. Bratislava, SVPL 1976.
- HIRTH, R. S. — NIELSEN, S. W. — PLASTRIDGE, W. N.: Bovine salpingo-oophoritis produced with semen containing a mycoplasma. Pathologia vet., 3, 1966, s. 616-632.
- JURMANOVÁ, K. — JIRÁNEK, E.: Diagnostika mykoplazmat v reprodukčním traktu skotu. Reprodukce a genetika hosp. zvířat, 1977, s. 35-39.
- ROB, O. aj.: Alimentární příčiny poruch plodnosti. Porodnictví a prevence poruch reprodukce hospodárskych zvířat. Praha, Stát. pedagog. nakl. 1973.
- SKALKA, B.: Mykoplasmata a jejich význam v onemocnění hospodárskych zvířat. Veterinářství, 1968, č. 3-4.
- SOBĚSLAVSKÝ, O. aj.: Mykoplasmata a jejich význam v lidské patologii. Čs. Epidemiem. Mikrobiol. Imunol., 2, 1967, s. 16.

Došlo dne 22. 1. 1979

РОБ, О. — РОЗИНЕК, Й. — СОМОЛ, Й. — АДАМОВСКА, Г. — КОПЕЦКА, Й. — КОПЕЦКА, Э. (Сельскохозяйственный институт, Прага-Сухдол; Районное ветуправление, Прага): Изменения ультраструктуры спермиев у быков с пониженной активностью спермы. Vet. Med., Praha, 24, 1979 (10) : 577-586.

На племстанции К. была установлена пониженная замораживаемость спермы, что продолжалось более года. Из 2550 эякулятов, взятых в течение 12 мес. у 42 производителей, 685, 26,7 % оказались непригодными для немедленного использования из-за низкой активности спермиев и патологических форм их движения, а еще 469, или 18,3 %, оказались вовсе непригодными для замораживания. В общем итоге, неприменимыми были 1154 (45,2 %) эякулята. С помощью витально-детального примулинового теста установлено быстрое отмирание спермиев после взятия. Электронно-микроскопическое их исследование в начале процесса показали изменения ультраструктуры жгутиков, в частности соединяющей части (деформации, неполный набор осевых волокон, вакуолизация жгутика, абнормальное упорядочение митохондриальной спирали), кроме того, множество абнормальностей внешней цитоплазматической мембраны и инвагинации, вакуолизацию и абнормальную плотность нуклеоплазмы. Первичные изменения жгутиков и спермальных ядер свидетельствуют об альтерации ткани семенников. К возможным этиологическим факторам этих процессов относятся ослабление быков вследствие длительного скормливания испорченного корма, контаминированного плесенью *Aspergillus fumigatus*, недостаточный рацион, низкая зоогигиена при вторичном поражении зародками *Mycoplasma bovigenitalium*, выявленными в ходе культивирования у 50 % эякулятов; положительный титр антител доказан у всех быков.

бык; ультраструктура спермиев; микроплазмы; низкая замораживаемость

ROB, O. — ROZINEK, J. — SOMOL, J. — ADAMOVSKA, H. — KOPECKA J. — KOPECKA, E. (University of Agriculture, Praha-Suchdol; District Veterinary Centre, Praha): *Changes in Spermatozoon Ultrastructure in Bulls with a Decreased Sperm Activity and Freezability*. Vet. Med., Praha, 24, 1979 (10) : 577-586.

A decrease of sperm freezability occurred at the K. breeding station, and this situation lasted longer than a year. Out of the 2550 ejaculates taken from 42 breeding bulls within 12 months, 685, i. e. 26.7 %, were unfit for use immediately after sperm collection, mostly owing to a low activity of spermatozoa and pathological forms of their motility, and another 469 ejaculates, i. e. 18.3 %, were unfit for use after sperm freezing; on the whole, 1154 (i. e. 45.2 %) ejaculates had to be excluded. It was revealed by the vital-lethal primuline test that the spermatozoa died quickly after collection. The findings obtained during an electron-microscopic examination of the spermatozoa at the beginning of the process included visible changes in the ultrastructure of the flagellum, particularly its middle piece (deformed shape, incomplete set of axial filaments, vacuolization of the flagellum, abnormal arrangement of the mitochondrial spiral), numerous abnormalities of the external cytoplasmic membrane and invagination, vacuolization, and abnormal density of nucleoplasm. The primary changes on the flagella and in the nucleus give evidence that the testicular tissues were altered. The etiological factors behind these processes are believed to include a reduction in the resistance of bulls due to long-lasting consumption of feeds contaminated with the fungus *Aspergillus fumigatus*, insufficient movement and bad zoo-hygienic practices, all this combined with the secondary action of the infectious germs of *Mycoplasma bovis genitalium*, which were revealed by cultivation tests in 50 % of the ejaculates of the bulls; a positive antibody titre was demonstrated in all bulls.

bull; ultrastructure of spermatozoa; mycoplasma; low freezability

ROB, O. — ROZINEK, J. — SOMOL, J. — ADAMOVSKA, H. — KOPECKA J. — KOPECKA, E. (Hochschule für Landwirtschaft, Praha-Suchdol; Kreisveterinäreinrichtung, Praha): *Veränderungen in der Spermien-Ultrastruktur von Bullen mit verringerter Aktivität und Tiefkühlbarkeit des Spermas*. Vet. Med., Praha, 24, 1979 (10) : 577-586.

Auf der Zuchtstation K. kam es zu einer Verringerung der Tiefkühlbarkeit des Bullenspermas, die mehr als ein Jahr andauerte. Von den im Laufe von 12 Monaten von 42 Zuchtbullen entnommenen 2550 Ejakulaten waren 685, d. s. 26,7 %, sofort nach Entnahme des Spermas vorwiegend wegen der niedrigen Spermienaktivität und der pathologischen Formen der Spermienmotilität, und weitere 569 Ejakulate, d. s. 18,3 %, zur Tiefkühlung unbrauchbar, folglich waren insgesamt 1154 (d. h. 45,2 %) Ejakulate unbrauchbar. Mit Hilfe des vital-letalen Primulintestes stellten wir ein schnelles Absterben der Spermien nach der Entnahme fest. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Spermien konnten bereits zu Beginn des Prozesses Veränderungen in der Ultrastruktur des Spermienchwanzes, insbesondere des Verbindungsteils (Mißbildungen, unvollständige Anzahl der Achsenfasern, Schwanzvakuolisierung, abnormale Anordnung der Mitochondrialen Spiralen) und ferner zahlreiche Abnormitäten der äußeren zytoplasmatischen Membrane und Invasinierung, Vakuolisierung und eine abnormale Nukleoplasmadensität festgestellt werden. Primäre Veränderungen auf den Spermienchwänzen und in deren Kern bestätigen eine Hodengewebealteration. Zu möglichen ätiologischen Faktoren dieser Prozesse sind Schwächung der Resistenz der Bullen infolge einer langandauernden gesundheitlich fehlerhaften Ernährung mit *Aspergillus fumigatus* kontaminierten Futtermitteln, ferner ungenügende Bewegung sowie eine niedrige Zoohygiene der Bullen mit sekundärer Wirkung von *Mykoplasma-bovigenitalium*-Infektionserregern, die bei 50 % der Ejakulate durch Kultivation nachgewiesen wurden, zu zählen. Bei allen Bullen wurde ein positiver Antikörpertiter nachgewiesen.

Bulle; Spermienultrastruktur; Mykoplasmen; niedrige Tiefkühlbarkeit

Adresa autorů:

Doc. MVDr. Oldřich Rob, CSc., ing. Jiří Rozinek, CSc., ing. Hedvika Adamovská, ing. Jiřina Kopecká, ing. Eva Kopecká, Vysoká škola zemědělská, 160 21 Praha 6 - Suchdol

MVDr. Jiří Somol, Okresní veterinární zařízení, Praha-východ

VZŤAH MEDZI FERMENTÁCIOU A MORFOLOGICKOU ŠTRUKTÚROU EPITELU BACHORA OVIEC KŔMENÝCH TVAROVANÝM KRMIVOM

M. Baran, J. Marcaník, J. Kočišová, I. Zeleňák, M. Belák

BARAN, M. — MARCANÍK, J. — KOČIŠOVÁ, J. — ZELENÁK, I. — BELÁK, M. (Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice; Vysoká škola veterinárska, Košice): *Vzťah medzi fermentáciou a morfológickou štruktúrou epitelu bachora oviec kŕmených tvarovaným krmivom*. Vet. Med., Praha, 24, 1979 (10) : 587-595.

Vo vzorkách z dorzálneho bachorového vaku škopov kŕmených 24 týždňov kompletnou granulovanou kŕmnu dávkou, ktorá obsahovala v sušine 41,81 % lúčneho sena, 25,28 % jačmeňa, 15,37 % pilín, 14,98 % melasy, 1,32 % močoviny a 1,24 % minerálneho doplnku, bolo urobené patologicko-anatomické, histologické, histochemické a elektrónovo-mikroskopické vyšetrenie. V bachorovom obsahu zabitých zvierat boli stanovené aj unikavé masťné kyseliny (UMK). Kontrolná skupina dostávala rovnakú diétu v klasickej forme s dlhým senom. V bachorovom obsahu zabitých zvierat pokusnej skupiny bola zistená vyššia hladina celkových UMK (125,93 mM) a kyseliny maslovej (17,8 M%). Pomer acetát : propionát bol 1 : 3,66. V enzymatickej aktivite neboli pozorované podstatné rozdiely. V elektrónogramoch bolo zaznamenané zvýšenie počtu T buniek a rohovatejúcich buniek, čo svedčí o zvýšenej keratinizácii.

ovca; tvarované krmivo; piliny; bachor; fermentácia; unikavé masťné kyseliny; elektrónová mikroskopia; hyperkeratóza

Fermentačná činnosť v bachore je jedným zo špecifických faktorov určujúcich fyziologické zvláštnosti trávenia prežúvavcov. Je úzko spojená s motorickou činnosťou bachora a závisí od množstva a zloženia prijatého krmiva a energie. Hlavným zdrojom energie obsiahnutej v krmive sú glycidy, z ktorých sa vytvárajú unikavé masťné kyseliny (UMK) ako konečné produkty fermentácie glycidov. Medzi základné UMK patrí kyselina octová, ktorá je rezorbovaná bachorovým epitelom a slúži ako hlavný zdroj energie pre makroorganizmus, ďalej kyselina propiónová, z ktorej sa v procese glukoneogenézy vytvára glukóza, a konečne kyselina maslová, ktorá sa v bachorovom obsahu a epitelu bachora metabolizuje na ketónové látky.

Fyzikálna úprava krmív a najmä používanie tvarovaných a koncentrátových krmív vo výžive prežúvavcov priamo ovplyvňuje aj fermentačné procesy v bachore. Granulované krmivo zvyšuje (Levy a i., 1972; Svendsen, 1974; Baran a i., 1979), resp. znižuje (Kujmov a Tituzov, 1974) koncentráciu celkových UMK v bachore, naruša percentuálne zloženie UMK tým, že zvyšuje obsah kyseliny propiónovej na úkor kyseliny octovej (Nelson a i., 1967; Levy a i., 1972; Schin-goethe a i., 1973; Orskov a i., 1974; Piatkowski a i., 1974), zvyšuje obsah

kyseliny maslovej (Baran a i., 1979), redukuje pomer acetát : propionát (Davis, 1967; Moseley a i., 1976). Zvýšená tvorba a následná resorpcia UMK bachorovým epitelom znižuje pH bachorového obsahu (Kaufmann a Orth, 1966; Kaufmann a Rohr, 1966; Božinova a Želiazkov, 1971; Esdale a Satter, 1972; Kaufmann, 1976).

Tvarované krmivá však okrem vplyvu na bachorovú fermentáciu môžu vyvolávať funkčné a metabolické poruchy, ako aj zmeny v morfológickej skladbe bachorového epitelu, na ktorý bezprostredne pôsobia, a to jednak mechanickou cestou prostredníctvom mechanoreceptorov, jednak chemickou cestou prostredníctvom produktov bachorovej fermentácie, ktoré pôsobia na chemoreceptory bachorovej sliznice. Pri skrmovaní koncentrátových a granulovaných diét je častý výskyt ruminitíd (Jensen a i., 1954; Ahrens, 1967; Thomson, 1967; Wobeser a Runge, 1975), parakeratóz a hyperkeratóz bachorového epitelu (Jensen a i., 1954, 1958; Garrett a i., 1961; Bull a i., 1965; Jensen a Mackey, 1971; Kaufold a i., 1976). Berg a i. (1976) pozorovali pri skrmovaní granulovanej slamy okrem parakeratózy inflamatózne zmeny bachorových papíl až silnú lymfocytárnu infiltráciu. Hyperkeratóza môže viesť až k strate papíl a k funkčným poruchám bachorového epitelu, ktoré môžu negatívne vplyvať na resorpciu produktov fermentačnej činnosti z bachora.

Z hľadiska širšieho používania tvarovaných krmív vo výžive hospodárskych zvierat bolo zaujímavé sledovať vplyv skrmovania týchto krmív na fermentačnú činnosť bachora (Baran a i., 1979), ako aj na morfológickú stavbu bachorového epitelu, čo bolo cieľom tejto práce. Pokúsili sme sa nájsť aj vzťah medzi fermentačnými procesmi v bachore a ich chemickým vplyvom na morfológickú štruktúru epitelu bachora.

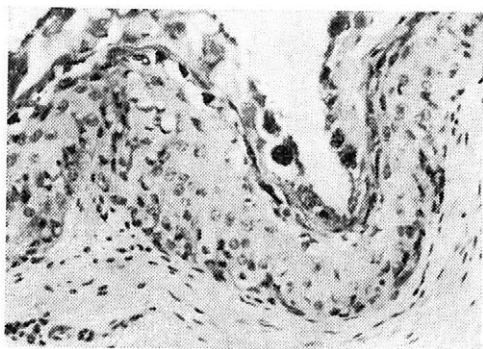
MATERIÁL A METÓDA

Patologicko-anatomické, histologické, histochemické a elektrónovomikroskopické vyšetrenie sme urobili na dvoch škopoch kontrolnej a dvoch škopoch pokusnej skupiny, ktoré boli zabitú po skončení pokusu, v ktorom sa sledoval vplyv tvarovaného krmiva na úroveň UMK v tráviacom trakte oviec (Baran a i., 1979). Kŕmna dávka obsahovala 41,81 % lúčneho sena, 25,28 % jačmeňa, 15,37 % neupravených bukových pilín, 14,98 % melasy, 1,32 % močoviny a 1,24 % vitamínovo-minerálneho doplnku. Kontrolná skupina dostávala diétu v klasickej forme s dlhým senom. Pokusná skupina dostávala celú diétu v granulovanej forme, keď veľkosť granúl bola 10 × 20–24 mm. Zvieratá konzumovali pokusnú diétu 24 týždňov. Vo vzorkách bachorového obsahu zvierat pokusnej skupiny sme po zabíjaní stanovili aj celkové množstvo UMK parovou destiláciou v mikrodestilačnom aparáte podľa Parnas-Wagnera po predchádzajúcej deproteinizácii bachorového obsahu nasýteným roztokom síranu horečnatého v 2,5 % kyseliny sírovej. UMK boli delené plynovou chromatografiou (Baše a Bartoš, 1970).

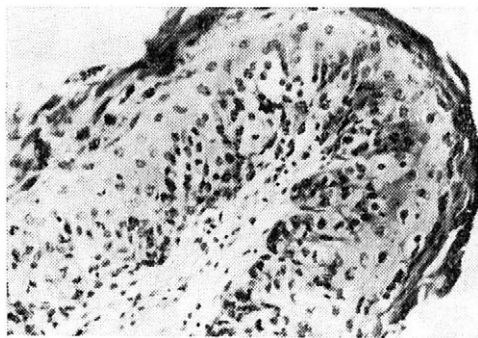
Vzorky na histologické a elektrónovomikroskopické vyšetrenie sme odobrali z dorzálneho bachorového vaku, a to na základe výsledkov našich predchádzajúcich pokusov s tvarovaným krmivom, v ktorých sme nezistili rozdiely v morfológickej štruktúre medzi epitelom sliznice dorzálneho a ventrálneho bachorového vaku. Preto sme v tomto pokuse ako miesto odberu vzoriek zvolili už len dorzálny bachorový vak. Na histologické vyšetrenie sme vzorky fixovali v 10 % neutrálnom formalíne a prehľadne farbili hematoxyln-eozínom. Histochemicky sme zisťovali aktivitu alkalického fosfatázy (v parafínových rezoch), kyslej fosfatázy, nešpecifickej esterázy, butyrylcholinesterázy, aminopeptidázy, laktátdehydrogenázy (v rezoch zo zmrazovacieho mikrotómu), sukcinátdehydrogenázy a glutamátdehydrogenázy (v kryostatových rezoch). Butyrylcholinesterázu sme stanovili priamou thiocholinovou metódou podľa Karnovského a Rootsa, na stanovenie dehydrogenáz sme použili inkubačné médiá v roztokoch, ostatné enzýmy sme zisťovali azokopulačnými metódami (Lojda a i., 1976). Excízie bachorového tkaniva pre elektrónovú mikroskopiu sme fixovali vo fixačnom roztoku podľa Caulfielda (1957), odvodnili v etanole a zaliali do eponu. Ultratenké rezy sme pripravili na ultratome LKB, kontrastovali uranylacetátom (Watson, 1958) a citrátom olova (Reynolds, 1963). Elektrónogramy sme zhotovili elektrónovým mikroskopom Tesla 613 a fotograficky spracovali.

Patologicko-anatomickou prehliadkou sme u jedného škopa z pokusnej skupiny zistili mierny akútny katarálny zápal sliznice slezu. Sliznica bachora a čepca bola ložiskovo čierne sfarbená. U druhého škopa z pokusnej skupiny sme zistili nadmerné množstvo tuku v srdcovej oblasti. Nadmerné množstvo podkožného tuku sme zistili aj u jedného škopa z kontrolnej skupiny.

Histologickým vyšetrením prehľadne farbených rezov sme zistili, že v sliznici bachora sa nachádza zvýšené množstvo T buniek a keratinizujúcich buniek s pretiahlym, silnejšie až silne bazofilne sa farbiacim jadrom (obr. 1 a 2). Ako zvýšený sa javil aj počet keratinizovaných buniek. Iné zmeny pri histologickom vyšetrení medzi jednotlivými skupinami neboli zistené. Rovnako ani v histochemickom vyšetrení sme nezistili podstatnejšie rozdiely v enzymatickej aktivite sledovaných enzýmov medzi pokusnou a kontrolnou skupinou.

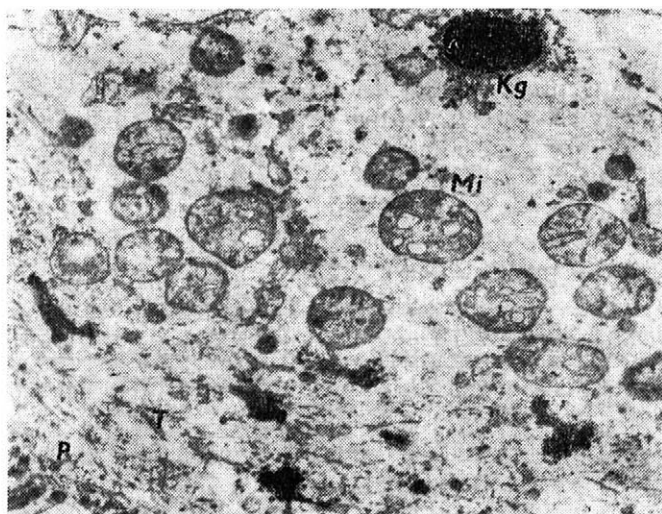


1. Obráz histologickej stavby sliznice steny bachora škopa z kontrolnej skupiny (zväčšenie: obj. 20, okul. 4X) — A picture of the histological structure of the mucous membrane of the rumen wall of a wether in the control group (magnification: lens 20, eyepiece 4 times)



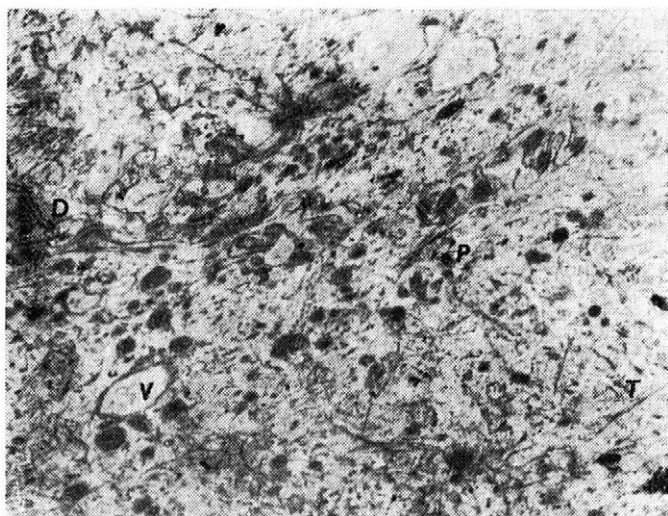
2. Obráz histologickej stavby sliznice steny bachora škopa z pokusnej skupiny (zväčšenie: obj. 20, okul. 4X) — A picture of the histological structure of the mucous membrane of the rumen wall of a wether in the experimental group (magnification: lens 20, eyepiece 4 times)

Elektrónogramy ukázali, že bachorovú sliznicu tvorí viacvrstevnatý plochý epitel tvorený niekoľkými vrstvami s odlišnými bunkovými typmi. Na bazálnu membránu priliehajú bazálne bunky s početnými dlhými cytoplazmatickými výbežkami zasahujúcimi do širokých medzibunkových priestorov. Cytoplazma týchto buniek obsahuje veľký počet mitochondrií, veľké oválne jadro a granulárny typ endoplazmatického retikula. Kým bazálne bunky vykazovali vysoký prizmatický tvar, intermediálne bunky sú mierne sploštené a majú šesťuholníkovú formu. Cytoplazma je bohatá na mitochondrie, ktoré však majú mierne narušenú vnútornú štruktúru, ďalej sa tu objavujú zväzky tonofibríl, ako aj početné ribozómy a malé vakuoly. Medzibunkové priestory sú široké, vyplnené cytoplazmatickými výbežkami. Hornú časť epitelu tvorili v niekoľkých vrstvách granulárne a zrohovatelé bunky. Pre granulárne bunky (obr. 3)



3. Časť granulárnej bunky škopa z pokusnej skupiny. V okrajovej zóne možno pozorovať keratohyalínové (Kg), ako aj fosfolipidné (P) granuly. Cytoplazmu bunky vyplňujú nabobtnané mitochondrie (Mi) a tonofibrily (T) (zväčšenie 24 240X) — Part of the granular cell of a wether from the experimental group. The marginal zone includes keratohyaline (Kg) and phospholipidic (P) granules. The cytoplasm of the cell is filled with swollen mitochondria (Mi) and tonofibrils (T) (magnification: 24 240 times)

4. Rozhranie a časť dvoch T buniek. V okrajovej zóne buniek vidieť fosfolipidné granuly (P). Medzibunkové priestory sú úzke, spájanie buniek obstarávajú dezmozómy (D). Cytoplazma buniek obsahuje vakuoly (V) a početné tonofibrily (T) (zväčšenie 24 240X) — The border and part of two T cells. Phospholipidic granules (P) can be seen in the marginal zone. The intercellular spaces are narrow, the cells are connected by desmosomes (D). The cytoplasm of the cells contains vacuoles (V) and numerous tonofibrils (T) (magnification: 24 240 times)

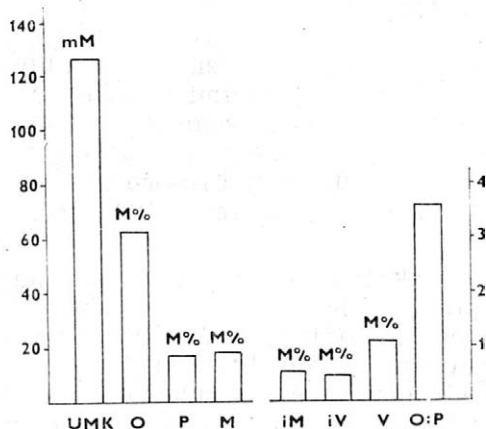
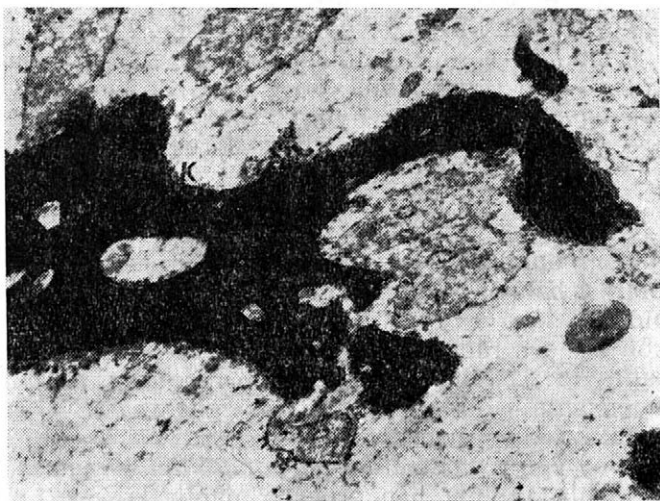


je charakteristický ich pretiahly tvar, keratohyalínové a fosfolipidné granuly. V okrajovej zóne nachádzame spleť tonofibríl a nabobtnané mitochondrie. Medzibunkové priestory sú užšie, vyplnené krátkymi cytoplazmatickými výbežkami s dezmozómami. Medzi granulárnymi a zrohovatými bunkami sme zistili súvislú vrstvu T buniek (obr. 4), ktorých značnú časť cytoplazmy vyplňajú vakuoly. Ďalej sme pozorovali niekoľko vrstiev zrohovatých buniek A a B typu, ktorých vnútro bolo vyplnené keratínom, hustou spleťou tonofibríl, ako aj zbytkami bunko-

vých organel (obr. 5). Nakoľko bunky priliehali k sebe, ich medzibunkové priestory boli štrbinovité, s krátkymi cytoplazmatickými výbežkami a zachovalými dezmozómami.

Diagramy na obr. 6 znázorňujú hladinu celkových UMK (v mM) a molárne percento jednotlivých UMK, ako aj pomer acetát : propionát v bachorovom obsahu zvierat pokusnej skupiny po zabití. Zistili sme pomerne vysoké hodnoty celkových UMK (125,93 mM) a kyseliny maslovej (17,8 M%), avšak pomer acetát : propionát (1 : 3,66) nebol narušený.

5. Zrohovatělá bunka. V cytoplazme sa rozprestiera masa keratohyalínu (K) (zväčšenie 24 240X) — A keratinized cell. Keratohyaline mass (K) is distributed in the cytoplasm (magnification 24 240 times)



6. Priemerné hodnoty unikavých mastných kyselín v bachore zvierat pokusnej skupiny po odporazení — The average values of volatile fatty acids in the rumen of the slaughtered animals from the experimental group

DISKUSIA

Charakteristickým znakom pre histologické, histochemické ako aj elektrónovo-mikroskopické vyšetrenie bola skutočnosť, že sme nezistili

podstatnejšie rozdiely medzi zvieratmi kŕmenými tvarovaným krmivom a kontrolnou skupinou. Výskyt zvýšeného počtu T buniek a zrohovateľných buniek svedčí o zvýšenej keratinizácii. Fell (1968) dáva podobné zmeny do súvislosti s nutnosťou ochrany epitelu pred dráždivými účinkami. Zvýšenú keratinizáciu bachorového epitelu zistili mnohí autori ako následok jednostranného kŕmenia (Warner a i., 1956; Harisson a i., 1960; Fell, 1968). Hyperkeratóza je typická najmä pre vysokokoncentrátové diéty, ako aj pre objemovo-jadrové diéty v mletej či granulovanej forme (Kauffold a Piatkowski, 1971). Kauffold a i. (1976) zaznamenali pri jemne mletých a granulovaných diétach hyperkeratózu, atrofiu a stratu papíl viac ako na 50 % povrchu mukózy bachora. Spôsobovali to jemné častice krmiva o veľkosti 0,05 až 0,5 mm, ktoré sa ukladali v mukóze alebo pôsobili ako tzv. „cementové látky“ medzi papilami, čím bránili deskvamácii buniek vrstvy *stratum corneum*, čo viedlo k hyperkeratóze epitelu a k hypertrofii nepoškodených bachorových papíl. Práve porucha deskvamácie epitelových buniek je hranicou medzi reverzibilnými a ireverzibilnými zmenami. Na tento fakt, ako aj na vplyv zvýšenej produkcie UMK a na ostatné chemické faktory, poukázali Kauffold a i. (1977). Štrukturálne zmeny bachorového epitelu boli totiž často sprevádzané zvýšenou koncentráciou UMK v bachore (Kauffold a i., 1975), znížením pomeru acetát:propionát až na 1:1 (Kauffold a Piatkowski, 1971), ako aj nízkou koncentráciou pH (Kauffold a i., 1977). Infúzia mastných kyselín do bachora zvyšovala proces keratinizácie a mala za následok zmenšenie jadier buniek *stratum corneum*. Kyselina propiónová spôsobovala zhrubnutie vrstvy *lamina propria*, kyselina maslová mala proliferatívny vplyv na *stratum germinativum*, zatiaľ čo kyselina octová značne zmenšila hrúbku bachorových papíl (Kauffold a i., 1977). Podľa tých istých autorov je rozhodujúcim faktorom chemickými vplyvmi vyvolanej hyperkeratózy hromadenie keratínu, nízke pH bachorového obsahu a malé množstvo metabolitov vyvolávajúcich proliferatívne procesy. Zvýšené množstvo celkových UMK a nízke pH v pokusnej skupine s granulovanou diétou (Baran a i., 1979), ako aj zistená vysoká hladina UMK po zabití zvierat, by mohli byť predispozičnými faktormi tak pre funkčné, ako aj pre morfológické zmeny bachorového epitelu. Výsledky nášho pokusu to však nepotvrdili a sú v súlade s prácou Bulla a i., (1965), ktorí zistili u teliat s parakeratózou zníženú resorpciu UMK, avšak nepotvrdili súvislosť medzi množstvom a proporciou UMK v bachore a výskytom parakeratózy.

Výsledky nášho pokusu ukázali, že skrmovanie tvarovanej kŕmnej dávky zloženej zo 42 % sena, 15 % pilín, 25 % jačmeňa a ostatných komponentov nevyvolalo okrem tendencie zvýšiť keratinizáciu žiadne alterácie bunkových elementov vrstevnatého epitelu bachora. Z výsledkov ďalej vyplýva, že ani 15% náhrada objemového krmiva neupravenými bukovými pilinami u malých prežúvavcov nemala negatívny vplyv na fyziologické funkcie bachorového epitelu a na jeho morfológickú štruktúru. Do akej miery a pre aký druh zvierat je možné v budúcnosti počítať s náhradou objemových kŕmív odpadmi drevárskeho priemyslu, napr. pilinami, môžu ukázať len dlhodobé experimenty s použitím väčšieho počtu pokusných zvierat, v ktorých sa zohľadní úžitkovosť, vekové a druhové rozdiely.

- AHRENS, F. A.: Histamine, lactic acid and hypertonicity as factors in the development of rumenitis in cattle. *Am. J. vet. Res.*, 28, 1967, s. 1335-1342.
- BARAN, M. — ZELENÁK, I. — PIATKOVÁ, M.: Vplyv skrmovania tvarovaného krmiva na úroveň unikavých mastných kyselín v tráviacom trakte oviec. *Vet. Med.*, Praha, 24, 1979 s. 49-57.
- BAŠE, J. — BARTOŠ, S.: Stanovení UMK v krvi a v bachorové tekutině přezvýkavců plynovou chromatografií. *Živočišná Výroba*, 15, 1970, s. 369-376.
- BERG, R. — BARTKE, W. — KAATZ, W.: Untersuchungen über die Struktur der Pansenmukosa von Schafen in Abhängigkeit vom Rationstyp. *Arch. Tierernähr.*, 26, 1976, s. 587-597.
- BOŽINOVA, O. — ŽELIAZKOV, T.: Proučvane vijanieto na nariazvaneto, smilaneto, granulirane to na lucernovo seno pri ugojavene na mžki šileta. *Životn. Nauki*, Sofia, 8, 1971, s. 73-80.
- BULL, L. S. — BUSH, L. J. — FRIEND, J. D. — HARRIS, B. Jr. — JONES, E. W.: Incidence of ruminal parakeratosis in calves fed different rations and its relation to volatile fatty acids absorption. *J. Dairy Sci.*, 48, 1956, s. 1459-1466.
- CAULFIELD, J. B.: Effects of varying the vehicle for OsO_4 in tissue fixation. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 3, 1957, s. 827-829.
- DAVIS, C. L.: Acetate production in the rumen of cows fed either control or low-fiber, high-grain diets. *J. Dairy Sci.*, 50, 1967, s. 1621-1625.
- ESDALE, W. J. — SATTER, L. D.: Manipulation of ruminal fermentation. IV. Effect of altering ruminal pH on volatile fatty acids production. *J. Dairy Sci.*, 55, 1972, s. 964-970.
- FELL, B. F.: Observations on the development of ruminal lesions in calves fed on barley. *Res. vet. Sci.*, 9, 1968, s. 458-466.
- GARRETT, W. M. — MEYER, J. H. — LOFGREEN, G. F. — DOBIE, J. B.: Effect of pellet size and composition on feedlot performance, carcass characteristics and rumen parakeratosis of fattening steers. *J. Anim. Sci.*, 20, 1961, s. 833-838.
- HARRISSON, H. N. — WARNER, R. G. — SANDER, E. G. — LOOSLI, J. K.: Changes in the tissue and volume of the stomachs of calves following the removal of dry feed on consumption of inert bulk. *J. Dairy Sci.*, 43, 1960, s. 1301-1312.
- JENSEN, R. — DEANE, H. M. — COOPER, L. J. — MILLER, V. A. — GRAHAM, W. R.: The rumenitis-liver abscess complex in beef cattle. *Am. J. vet. Res.*, 15, 1954, s. 202-216.
- JENSEN, R. — FLINT, J. C. — UDALL, R. H. — DEEN, A. W. — SEGER, C. L.: Parakeratosis of the rumens of lambs fattened on pelleted food. *Am. J. vet. Res.*, 19, 1958, s. 277-282.
- JENSEN, R. — MACKEY, D. R.: Diseases of feedlot cattle (2nd edition), Philadelphia, Lea and Febiger Ltd. 1971.
- KAUFFOLD, P. — PIATKOWSKI, B.: Zur Morphologie der Pansenmukosa junger Wiederkäuer bei unterschiedlicher Fütterung. *Arch. Tierernähr.*, 21, 1971, s. 171-181.
- KAUFFOLD, P. — VOIGT, J. — PIATKOWSKI, B.: Untersuchungen über den Einfluß von Ernährungsfaktoren auf die Pansenschleimhaut. 1. Strukturen und Funktionen nach Fütterung extremer Rationen und plötzlichem Futterwechsel. *Arch. Tierernähr.*, 25, 1975, s. 274-256.
- KAUFFOLD, P. — KÖHLER, M. — FISCHER, W.: Untersuchungen über den Einfluß von Ernährungsfaktoren auf die Pansenschleimhaut. 2. Morphologische Zustände nach Fütterung mit Mastrationen in unterschiedlicher physikalischer Form. *Arch. Tierernähr.*, 26, 1976, s. 233-244.
- KAUFFOLD, P. — VOIGT, J. — HERRENDÖRFER, G.: Untersuchungen über den Einfluß von Ernährungsfaktoren auf die Pansenschleimhaut. 3. Schleimhautzustände nach Infusion von Propion-, Essig- und Buttersäure. *Arch. Tierernähr.*, 27, 1977, s. 201-211.
- KAUFMANN, W.: Influence of the composition of the ration and the feeding frequency on pH-regulation in the rumen and on the feed intake in ruminants. *Livest. Prod. Sci.*, 3, 1976, s. 103-114.
- KAUFMANN, W. — ORTH, A.: Untersuchungen über Einflüsse des Futters und der Pansenfermentation auf die Speichelsekretion. *Z. Tierernähr. Futtermittelk.*, 21, 1966, s. 110-120.
- KAUFMANN, W. — ROHR, K.: Ergebnisse gaschromatographischer Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren in Pansen bei unterschiedlicher Fütterung. *Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk.*, 22, 1966, s. 1-8.

- KUJMOV, D. K. — TITUZOV, I. G.: Želudočnoje piščevarenje u ovec pri soderžanji na polnoračionnyh granulirovannyh zmesach iz kormov raznogo razmola. SeI.-choz. Biol., 9, 1974, s. 700-714.
- LEVY, D. — AMIR, S. — HOLZER, Z. — NEUMARK, H.: Ground and pelleted straw and hay for fattening Israeli-Friesian male calves. Anim. Prod., 15, 1972, s. 157-165.
- LOJDA, Z. — GOSSRAU, R. — SCHIEBLER, T. H.: Enzymhistochemische Methoden. Heidelberg, Springer Verlag 1976.
- MOSELEY, J. E. — COPPOCK, C. E. — LAKE G. B.: Abrupt changes in forage-concentrate ratios of complete feeds fed *ad libitum* to dairy cows. J. Dairy Sci., 59, 1976, s. 1471-1483.
- NELSON, A. B. — KNOX, J. H. — RAY, E. E. — NEUMANN, A. L.: Effects of grinding and pelleting ration on performance of yearling steers. Bull. New Mex. State Univ., 1967, s. 512.
- ORSKOV, E. R. — FRASER, C. — GORDON, J. G.: Effect of processing of cereals on rumen fermentation, digestibility, rumination time and firmness of subcutaneous fat in lambs. Br. J. Nutr., 32, 1974, s. 59-69.
- PIATKOWSKI, B. — VOIGT, J. — BOLDUAN, G. — NAGEL, S.: Die Produktion flüchtiger Fettsäuren und die Verweildauer des Futters in Pansen bei Verabreichung von gehäckseltem und pelletiertem Grobfutter in Versuchen an Milchkühen. Arch. Tierernähr., 24, 1974, s. 375-383.
- REYNOLDS, E. S.: The use of lead citrate at high pH and electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 17, 1963, s. 208-212.
- SCHINGOETHE, D. J. — STAKE, P. E. — OWENS, M. J.: Whey components in restricted roughage rations, milk composition and rumen volatile fatty acids. J. Dairy Sci., 56, 1973, s. 909-914.
- SVENDSEN, P.: Gastro-intestinal atony in ruminants. Copenhagen, DSR Forlag 1974.
- THOMSON, R. G.: Rumenitis in cattle. Can. vet. J., 8, 1967, s. 189-192.
- WARNER, R. G. — FLATT, W. P. — LOOSLI, J. K.: Dietary factors influencing the development of the ruminant stomach. J. agric. Fd Chem., 4, 1956, s. 788-792.
- WATSON, M. L.: Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. J. Biophys. Biochem. Cytol., 4, 1958, s. 475-478.
- WOBESER, G. — RUNGE, W.: Rumen overload and rumenitis in white-tailed deer. J. Wildlife Man., 39, 1975, s. 596-600.

Došlo dňa 22. 11. 1978

БАРАН, М. — МАРЦАНИК, Й. — КОЧИШОВА, Й. — ЗЕЛЕНЯК, И. — БЕЛАК, М. (Институт физиологии сельскохозяйственных животных АН СССР, Кошице; Ветеринарный институт, Кошице): Отношение между ферментацией и морфологической структурой эпителия рубца у овец, кормленных фасонными кормами. Vet. Med., Praha, 24, 1979 (10): 587-595.

На основе образцов спинного рубцового мешка валухов, которым скормливали в течение 24 недель полносоставный гранулированный рацион с 41,81% лугового сена, 25,28% ячменя, 15,37% опилок, 14,98% мялассы, 1,32% мочевины и 1,24% минеральной добавки в сухом веществе, осуществили патолого-анатомическое, гистологическое, гистохимическое и электрон-микроскопическое исследование. В содержимом рубца забитых животных определили и летучие жирные кислоты. Контрольной группе скормливали ту же диету в классической форме с сеном длинной резки; в содержимом рубца установлен повышенный уровень всех летучих жирных кислот (125,93% мМ) и масляной кислоты (17,8 = М%). Соотношение ацетат : пропионат = 3,66. Что касается ферментной активности, существенных различий не отмечено. В электронограммах отмечен рост количества Т-клеток и роговых клеток, что свидетельствует о повышенной кератинизации.

овца; фасонированный корм; опилки; рубец; ферментация; летучие жирные кислоты; электронная микроскопия; гиперкератоз

BARAN, M. — MARCANÍK, J. — KOČISOVÁ, J. — ZELENÁK, I. — BELÁK, M. (Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Košice; University of Veterinary Medicine, Košice): The Relationship between Fermentation and the Morphological Structure of Rumen Epithelium in Sheep Given Pelleted Feeds. Vet. Med., Praha, 24, 1979 (10): 587-595.

Wethers were fed complete granular feed rations including 41.81% of grass hay,

25.28 % of barley, 15.37 % of sawdust, 14.98 % of molasses, 1.32 % of urea, and 1.24 % of mineral supplement in dry matter for 24 weeks. Samples of the dorsal rumen sac of these wethers were subjected to patho-anatomical, histological, histochemical, and electron-microscopical examination. Volatile fatty acids were also determined in the rumen fluid of slaughtered animals. The control group was given the same diet in the classical form with long hay. The rumen contents of the slaughtered animals of the experimental group had an increased level of total volatile fatty acids (125.93 mM) and butyric acid (17.8 M%). The acetate : propionate ratio was 3.66. No substantial differences were observed in enzymatic activity. Electronograms recorded an increase in the number of T cells and keratinizing cells — this suggests an increased intensity of the process of keratinization.

sheep; pelleted feed; sawdust; rumen; fermentation; volatile fatty acids; electron microscopy; hyperkeratosis

BARAN, M. — MARCANÍK, J. — KOČIŠOVÁ, J. — ZELENÁK, I. — BELÁK, M. (Institut für Physiologie der Haustiere der slowakischen Akademie der Wissenschaften, Košice; Veterinärmedizinische Hochschule, Košice): *Beziehungen zwischen der Fermentation und der morphologischen Struktur des Pansenepithels bei mit granuliertem Futter gefütterten Schafen*. Vet. Med., Praha, 24, 1979 (10) : 587-595.

Proben aus dem dorsalen Pansensack von mit einer kompletten granulierten Futtermischung 24 Wochen hindurch gefütterten Hammeln wurden einer pathologisch-anatomischen, histologischen, histochemischen und elektronmikroskopischen Untersuchung unterstellt. Die Futtermischung enthielt, bezogen auf Trockensubstanz, 41,81 % Wiesenheu, 25,28 % Gerste, 15,37 % Sägespäne, 14,98 % Melasse, 1,32 % Harnstoff und 1,24 % Mineralergänzungsfutter. Im Panseninhalt der geschlachteten Tiere wurde auch flüchtige Fettsäuren (FFS) bestimmt. Die Kontrollgruppe erhielt dieselbe Diät in klassischer Form mit Langheu. Im Panseninhalt der Versuchsgruppe wurde ein höheres Niveau der Gesamt-FFS (125,93 mM) und der Buttersäure (17,8 M%) festgestellt. Das Azetat-Propionat-Verhältnis betrug 3,66. In bezug auf die Enzymaktivität wurden keine wesentlichen Unterschiede beobachtet. In den Elektronogrammen wurde eine Erhöhung der Anzahl der T-Zellen und der hornigen Zellen verzeichnet, was von einer erhöhten Keratinisierung zeugt.

Schaf; granuliertes Futter; Sägespäne; Pansen; Fermentation; flüchtige Fettsäuren; Elektronenmikroskopie; Hyperkeratose

Adresa autorov:

MVDr. Miroslav Baran, CSc., MVDr. Jolana Kočišová, CSc., MVDr. Imrich Zeleňák, CSc., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Palackého 12, 040 01 Košice

MVDr. Jozef Marcaník, CSc., prof. MVDr. Milan Belák, DrSc., Vysoká škola veterinárska, Komenského 73, 041 81 Košice

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

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

D 68.802/7

Kurzberichte. 7. Internationales Symposium W. A. V. F. H. 11.—16. 9. 1977
Garmisch-Partenkirchen.

Garmisch-Partenkirchen, Deutsche veterinärmediz. Gesellschaft e. V.
(1979). 240 s., res. angl., fr. (Veterinární konference mezinárodní — Garmisch-Partenkirchen — 7. /1977/ — sborníky)

D 68.587

PETKOV, G. — BAJKOV, B.
Veterinarnomedicinska ekologija.

Sofija, Zemizdat 1978. 342 s., obr. tab. (Veterinární ekologie — příručka)

E 39.414

NOWICKI, B.
Zachowanie sie zwierzat gospodarskich wprowadzenie.

Warszawa, PWRiL 1978. 231 s., obr., tab. (Chování zvířat — hospodářská zvířata — příručka)

D 34.761/68

ALGERS, B. — EKESBO, I. — STRÖMBERG, S.
Noise measurements in farm animal environments.

Skara, Swedish university of agric. sciences 1978. 19 s., 7 obr., 6 tab.
Acta veterinaria Scandinavica 68. (Hospodářská zvířata — hluk — měření — výzkum — Švédsko)

D 66.440

MICHEL, G.
Kompedium der Embryologie der Haustiere. 2. Aufl.

Jena, VEB G. Fischer 1977. 398 s., 232 obr., 15 tab. (Embryologie hospodářských zvířat — příručka)

C 24.928

Morfologija životnyh. Mežvuzovskij sbornik.

Kišinev, Min. sel. chozjajstva SSSR 1978. 67 s., obr. (Morfologie hospodářských zvířat — sborník — SSSR-MSSR)

C 19.552/19

MENCO, B. P. M.
A qualitative and quantitative investigation of olfactory and nasal respiratory mucosal surfaces of cow and sheep based on various ultrastructural and biochemical methods. Proefschrift.

Wageningen, Landbouwhogeschool 1977. 158 s., 56 obr., 17 tab. (Čichové ústrojí — skot a ovce — výzkum — metody biochemické a ultrastrukturalní — Holandsko)

VÝSKYT AFLATOXINU V NĚKTERÝCH KOMPONENTECH A KOMPLETNÍCH KRMNÝCH SMĚSÍCH PRO PRASATA

J. Drábek, A. Piskač

DRÁBEK, J. — PISKAČ, A. (Vysoká škola veterinární, Brno): *Výskyt aflatoxinu v některých komponentech a kompletních krmných směsích pro prasata*. Vet. Med., Praha, 24, 1979 (10) : 597-602.

Krmné komponenty a kompletní krmné směsi používané v chovu a výkrmu prasat v červnu 1978 jsme vyšetřili kvalitativně chromatografickou metodou v tenké vrstvě silikagelu a kvantitativně metodou podle Velasca na obsah aflatoxinů. Celkem jsme odebrali a laboratorně vyšetřili 104 vzorky krmiv, z čehož 77 vzorků (74,0 %) pocházelo ze 14 zemědělských závodů a 27 vzorků (26,0 %) z osmi výroben krmných směsí v Jihomoravském kraji. Přítomnost aflatoxinů byla zjištěna ve 14 vzorcích vyšetřovaných krmiv, tj. ve 13,4 %. Nejvyšší obsah — 1920 $\mu\text{g kg}^{-1}$ — byl zjištěn v podzemnici olejné, pocházející z Indie. Z kompletních krmných směsí byl aflatoxin zjištěn ve směsích pro výkrm prasat (A₁ a SOL), ve směsích pro prasnice březí (KPB), prasnice kojící (KPK) a v kompletní krmné směsi pro kance, a to nejčastěji v množství 50 až 350 $\mu\text{g kg}^{-1}$ krmiva. Smyslově změněné vzorky krmiva, odebrané v zemědělských závodech z kovových zásobníků před stájovými objekty, obsahovaly aflatoxin téměř ve všech případech. Na základě těchto zjištění je nutné učinit taková preventivní opatření během sklizně, posklizňové úpravy, skladování obilovin a komponentů krmných směsí, aby se krmiva nezneškodnovala pomnožováním plísní.

aflatoxiny; kvantitativní stanovení; krmiva; prasata

Jednou ze závažných příčin snižování efektivnosti živočišné výroby na úseku výroby vepřového masa mohou být ztráty způsobené zkrmováním krmiv, která obsahují toxické metabolity plísní. Odhaduje se, že okolo 120 druhů plísní je toxinogenních, to znamená, že v závislosti na podmínkách prostředí — teploty, vlhkosti a složení substrátu — produkuje různé toxické substance. Zvláštní pozornost je v posledních letech věnována skupině aflatoxinů, které mohou být v všech věkových kategoriích prasat významným etiologickým faktorem poruch jejich zdraví (Piskač aj., 1976; Drábek, 1977).

Krmiva, resp. jednotlivé komponenty používané k výrobě kompletních krmiv pro prasata, nejsou u nás běžně vyšetřována na obsah aflatoxinů. Platí to zejména o arašidech a sóji, které pocházejí z tropických a subtropických oblastí. Na arašidy se však soustřeďovala pozornost jako na hlavní rostlinný materiál kontaminovaný toxinogenními kmeny plísní *Aspergillus flavus* a jejími toxickými metabolity již od roku 1960 (Reiss, 1968). Aflatoxiny mohou být kontaminovány i obiloviny, masokostní moučky, rybí moučky, ale také zelenina, ovoce a mléčné výrobky (Bean aj., 1972; Waart aj., 1974; Lillehoj a Fennell, 1975 a jiní).

Plísně produkující aflatoxiny rostou na většině krmiv pro prasata. Při kvantitativním stanovení aflatoxinů v nich bylo zjištěno, že krmiva používaná v chovu a výkrmu prasat byla u nás v roce 1977 zhruba z jedné čtvrtiny tímto mykotoxinem kontaminována (Piskač a Drábek, 1978). Screeningem na přítomnost aflatoxinu B₁ v tuzemských krmivech se zabývali Bartoš a Matyáš (1977). Vyšetřili celkem 158 různých vzorků krmiv a zjistili, že 27,2 % vzorků bylo kontaminováno aflatoxinem. Závažné je to, že všechny vzorky byly hodnoceny provozními průmyslových výroben krmiv jako nezávadné, ani v jednom případě nebylo pozorováno zjevné zaplísnění nebo jiné nedostatky. Z krmiv pro prasata byla nejvyšší kontaminace aflatoxinem zjištěna v podzemnicových výliscích, a to v 96,2 % vzorků, pozitivní nálezy byly také v bílkovinném koncentrátu pro chovná prasata, v maso-kostní moučce a v doplňkové směsi pro kojící prasnice. Juszkievicz a Piskorska-Pliszczynska (1977) sledovali výskyt aflatoxinů v krmivech pro drůbež, skot a prasata. Zjistili, že aflatoxinem jsou nejvíce kontaminována krmiva pro prasata (17,0 % vzorků), a to ve většině případů v koncentracích, které překračovaly 200 µg kg⁻¹ krmiva.

V krmivech, která obsahují aflatoxiny, jsou zpravidla zjišťovány i další metabolity toxinních plísní, jako např. ochratoxin, sterigmatocystin, rubratoxin a zearalenon, které jsou zdrojem toxicity pro hospodářská zvířata.

Poruchy zdravotního stavu prasat způsobené toxickými metabolity plísní mohou v produkci vepřového masa vyvolat významné ekonomické ztráty.

MATERIÁL A METODY

K vyšetření na obsah aflatoxinů byly v průběhu června 1978 odebrány vzorky krmiv pro prasata v zemědělských závodech a ve výrobních krmných směsích v Jiho-moravském kraji. Vzorky jsme odebírali přímo ze skladů krmiv, ze zásobníků a technologických linek výroben kompletních krmných směsí a ze zemědělských závodů pro chov a výkrm prasat s velkovýrobní technologií. V zemědělských závodech jsme se zaměřili zejména na odběr vzorků ze zásobníků před jednotlivými hálami tak, aby mohl být zároveň posouzen technický stav zásobníků.

Celkem jsme odebrali a laboratorně vyšetřili 104 různé vzorky krmiv pro prasata, z čehož 77 vzorků (74,0 %) pocházelo ze čtrnácti zemědělských závodů a 27 vzorků (26,0 %) z osmi výroben kompletních krmných směsí nebo jejich komponentů. Odebraná krmiva (mimo šest vzorků, které pocházely z nálepů krmiva na stěnách zásobníků) nebyla zjevně prorostlá plísními a byla považována za nezávadná. Z celkového počtu odebraných vzorků krmiv bylo 56 vzorků (53,8 %) granulovaných krmných směsí, zbývající vzorky představovala krmiva v sypké formě. V zemědělských závodech byly 62 vzorky (59,6 %) odebrány přímo z kovových zásobníků umístěných před stáji.

Vzorky krmiv byly do sedmi dnů po odběru laboratorně zpracovány a do doby analýzy byly uchovány při teplotě +4 °C. Krmiva byla zpracována postupem podle Velasco (1970), metodou ověřenou při vyšetřování krmiv pro prasata Piskačem a Drábkem (1978). Chloroform-metanolový extrakt z každého vzorku krmiva byl podroben kvalitativnímu průkazu aflatoxinu chromatografickým vyšetřením v tenké vrstvě silikagelu (Silufol UV 254, Sklárný Kavalier, n. p.) při srovnání se standardy aflatoxinů (fy Calbiochem – USA a ÚSOL Praha), a to jako vnějších, tak také vnitřních svědků. Chromatogramy byly vyhodnocovány v UV světle při 366 nm vlnové délky a pro odlišení balastních látek byly chromatogramy postříkány 20 % kyselinou sírovou.

Pro kvantitativní stanovení aflatoxinů s použitím přístroje Velasco Fluorotoxin Meter, Neotec, Instruments, INC., USA (Piskač a Drábek, 1978) byly použity pouze ty vzorky krmiva, ve kterých byla při chromatografickém zpracování zjištěna fluoreskující skvrna odpovídající R_f použitého standardu aflatoxinu B₁ a po postříku 20 % kyselinou sírovou měnila modrou barvu fluorescence ve žlutou.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Z celkového počtu 104 vyšetřovaných vzorků krmiv pro prasata byly aflatoxiny prokázány ve 14 vzorcích, tj. ve 13,4 %. Jednotlivé druhy vyšetřených krmných komponentů a kompletních krmných směsí spolu

Druh krmiva	Počet vyšetřených vzorků krmiv	% vyšetřených vzorků krmiv z celého souboru	Počet pozitivních	Obsah AFB ₁ v $\mu\text{g kg}^{-1}$	Charakteristika odběrů pozitivních vzorků AFB ₁
Podzemnice olejná	2	1,9	2	93 1920	odběr z pytlů v ZNZ, dovoz z Indie, použita k výrobě kompletních krmných směsí
Sója	3	2,9	0		
Zrniny (oves, ječmen, pšenice)	8	7,7	0		
Krmná směs ČOS II	5	4,8	0		
Kompletní směs pro výkrm prasat A ₁	14	13,5	2	80 350	– SZP, zásobník před halou, náplň 1/3, odběr od stěny, směs granulovaná – SZP Ja., směs sypká, odběr z technologické linky krmení
Kompletní směs pro výkrm prasat SOL	10	9,6	3	50 96 180	– odběr v ZNZ z pytlů na výrobní lince, směs sypká – odběr SZP, zásobník před halou, sypká, náplň 1/3, nálepy na stěně, zápach po plisni – SZP, směs sypká, odběr z technologické linky krmení
Kompletní krmná směs pro prasnice březí (KPB)	25	24,0	3	94 62 stopy	– SZP, směs granulovaná, zásobník před halou, 1/4 náplň stěny čisté, odběr od stěny – SZP, odběr ze zásobníku před halou, směs granulovaná – SZP, zásobník před halou, náplň 1/3, směs granulovaná, nálepy na stěně, zápach po plisni, stěny zásobníku korodované
Kompletní krmná směs pro prasnice kojící (KPK)	26	25,0	3	140 stopy stopy	– SZP, zásobník před halou, směs granulovaná, náplň 1/2, odběr od stěny – ZNZ, odběr z pytlů na výrobní lince, směs sypká – SZP, zásobník před halou, směs granulovaná, náplň 1/2, nálepy až 50 cm, směs u stěny vlhká, zápach po plisni, místy porost plisni, odběr od stěny
Rybí moučka	3	2,9	0		
Bílkovinný koncentrát BKP 3	5	4,8	0		
Kompletní krmná směs pro kance	2	1,9	1	70	– JZD, odběr z pytlů v přípravně krmiva, směs sypká
Krmná směs pro odchov prasniček	1	1,0	0		
Celkem	104	100,0	14		

s výsledky vyšetření na obsah aflatoxinů a charakteristikou odběru pozitivních vzorků krmiv jsou uvedeny v tab. I.

Nejvyšší obsah aflatoxinu $1920 \mu\text{g kg}^{-1}$ byl zjištěn ve vzorku podzemnice olejně, pocházející z dovozu z Indie. V našem vyšetřovaném souboru krmiv byly výlisky podzemnice olejně zastoupeny pouze v 1,9 % (dva vzorky). Vzhledem k tomu, že ve všech výrobních krmných směsích byla v době odběru vzorků k dispozici stejná dovozní šarže tohoto krmného komponentu, považujeme počet vzorků za dostačující pro posouzení jeho kvality. Bartoš a Matyáš (1977) z celkového počtu 27 vzorků podzemnicových výlisků zjistili přítomnost aflatoxinu B₁ ve 26 případech, a to v koncentracích do $106 \mu\text{g kg}^{-1}$ krmiva. Podobně již dříve Fleischer (1971) uvádí, že dovážené podzemnicové šroty téměř vždy obsahují aflatoxiny. Z těchto výsledků je patrné, že dovážená podzemnice olejná pro krmné účely je často kontaminována i vysokým množstvím aflatoxinů, což je možné považovat za jeden ze zdrojů mykotoxinů i v krmných směsích pro prasata. Bylo by proto žádoucí zjišťovat přítomnost aflatoxinů v tomto krmivu, a to již v době nákupu nebo převzetí od zahraničního dodavatele.

Z vyšetřovaných kompletních krmných směsí pro prasata byl aflatoxin zjištěn ve směsích pro výkrm prasat (A₁ a SOL), ve směsích pro prasnice březí (KPB) a kojící (KPK) a v kompletní krmné směsi pro kance. Nejčastější kontaminace těchto krmiv aflatoxinem byla 50 až $350 \mu\text{g kg}^{-1}$. Většina vzorků krmiva pozitivních na aflatoxin pocházela z kovových zásobníků umístěných před halami pro ustájení prasat. Ve všech případech, kdy byly zjištěny smyslové změny krmiva (tvorba nálepu krmiva na stěnách zásobníků, zápach a zjevné zaplísnění), obsahovaly analyzované vzorky aflatoxin.

Základní příčinou znehodnocování krmných směsí v zásobnících před stájovými objekty je zahřívání pláště s následným zvyšováním teploty v zásobnících, tvoření vodních par, které se potom při náhlém ochlazení srážejí a tak dochází uvnitř pláště k orosení. To má za následek nalepování částec krmiva na stěny, čímž jsou vytvořeny dobré podmínky (teplota a vlhkost) pro růst plísní. Intenzivní růst plísní za tři až deset dnů po uskladnění krmiva může způsobit zvýšení koncentrace mykotoxinů na takovou mez, že dojde k různému stupni poruch zdravotního stavu u prasat (Pristaš, 1977). Studium vztahů mezi použitým substrátem, teplotou a vlhkostí při kultivaci se u nás zabývali např. Zapletal a Zima (1970), Piskač aj. (1971), Veselá aj. (1978) a jiní.

Námi zjištěný kvantitativní obsah aflatoxinů v krmných směsích pro prasata může být příčinou mnoha zdánlivě nevysvětlitelných snížení užitkovosti, zvýšení spotřeby krmiva na jednotku přírůstku a klinického onemocnění prasat. Příčinou je buď jenom účinek plísňových toxinů, nebo i snížení nutriční hodnoty krmné směsi, způsobené růstem různých druhů plísní.

V zájmu zábrany vzniku aflatoxikóz u prasat je třeba dořešit sklizeň, posklizňovou úpravu a skladování zrnin tak, aby se ani v jednom z těchto úseků nevytvářely podmínky pro množení plísní a nežádoucích mikroorganismů. Jde zejména o ochranu zrna před mechanickým poškozením při sklizni a skladové manipulaci. Kategoricky je třeba požadovat, aby obilí hned po sklizni bylo dosušeno na požadovanou vlhkost,

kteřá neumožňuje nárůst a pomnožování toxinogenních plísní. Všechny prostory určené k manipulaci a skladování obilí a krmiv je třeba před použitím spolehlivě dezinfikovat. V kontinuálních provozech pak je nutná pravidelná dezinfekce v závislosti na nebezpečí pomnožování mikroorganismů.

V rámci obecné prevence je třeba všestranně využít nových poznatků a nových prostředků k trvalé ochraně pracovního a provozního prostředí (fungicidní přípravky — formaldehyd, Lastanox Q, Lastanox F apod.). Jestliže by bylo nevyhnutelné skladovat vlhké obilí určené k výživě zvířat, je třeba využít nových metod skladování (skladování obilí při snížených teplotách, skladování v bezkyslíkatém prostředí, popřípadě použití mykostatických prostředků). V zemědělských závodech je třeba věnovat pozornost rovněž skladům, zejména pak zásobníkům a technologickým linkám pro dopravu krmiva. V případě, že v zařízeních nákupních podniků a v dalších skladech jsou krmiva zaplísňená, je třeba je před použitím toxikologicky vyšetřit. Podle výsledků tohoto vyšetření se pak bude rozhodovat o jeho použití, přičemž nelze aflatoxinem kontaminované krmivo použít pro přípravu krmných směsí pro nejcitlivější druhy hospodářských zvířat, mláďata a dojnice, které vylučují aflatoxiny nebo jejich metabolity mlékem.

Ochrana krmiv před plísněmi je organizačně i ekonomicky náročným opatřením a je jí třeba věnovat maximální pozornost v období přípravy nové sklizně obilí a jeho dalšího zpracování, skladování obilí a krmiv a výroby kompletních krmných směsí.

Literatura

- BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z.: Screening na přítomnost aflatoxinu B₁ v krmivech. Vet. Med., Praha, 22, 1977, č. 12, s. 729-735.
- BEAN, A. G. — SCHILLINGER, A. J. — KLARMAN, L. W.: Occurrence of aflatoxins and aflatoxin producing strains of *Aspergillus* sp. in soybeans. Appl. Microbiol., 24, 1972, s. 437-439.
- DRÁBEK, J.: Studium biologického účinku aflatoxinu na organismus prasat (aflatoxikóza prasat). [Kandidátská disertace.] Brno 1977, 198 s. — Vysoká škola veterinární.
- FLEISCHER, I.: Studie o rozsahu kontaminace podzemnicových a sojových extrahovaných šrotů aflatoxinem. Krmivářství, 7, 1971, s. 101-104.
- JUSZKIEWICZ, T. — PISKORSKA-PLISZCZYŃSKA, J.: Zawartość mikotoksyn w przemysłowych mieszankach i koncentraty paszowych. Medycyna Wet., 33, 1977, č. 4, s. 193-196.
- LILIEHOJ, E. B. — FENNEL, D. I.: Fungi and aflatoxin in a bin of stored white maize. J. Stor. Prod. Res., 11, 1975, s. 47-51.
- PISKAČ, A. — MERTLÍK, J. — ZAPLETAL, O. — ZIMA, S. — KŘÍŽ, H.: Chemický průkaz aflatoxinu a sledování jeho účinku na metabolismus zvířat. [Výzkumná zpráva.] Brno, 1971, 63 s. — Vysoká škola veterinární.
- PISKAČ, A. — ZAPLETAL, O. — DRAŽAN, J. ml. — DRAŽAN, J. — DRÁBEK, J. — JERÁBEK, J. — ČERNÝ, L. — GROCH, L. — ROŽEK, J.: Záchyt a průkaz aflatoxikózy prasnic ve velkochovu. Veterinářství, 26, 1976, s. 120-122.
- PISKAČ, A. — DRÁBEK, J.: Výskyt aflatoxinů v krmivech pro prasata. Vet. Med., Praha, 23, 1978, č. 7, s. 437-446.
- FRISTAS, O.: Zásady správného uskladňování krmných zmesí v zásobnících. Krmivářství, 13, 1977, č. 8-9, s. 187-189.
- REISS, J.: Mycotoxine. I. Mycotoxine von *Aspergillus*-Arten. Z. allg. Mikrobiol., 8, 1968, č. 4, s. 303-330.
- VELASCO, J.: Determination of aflatoxin in cottonseed by ferric hydroxide gel cleanup. J. Ass. off. analyt. Chem., 53, 1970, č. 3, s. 611-616.

VESELÁ, D. — VESELÝ, D. — JELÍNEK, S. — KUSÁK, V.: Nález ochratoxinu A v krnmém ječmeni. Vet. Med., Praha, 23, 1978, č. 7, s. 431-436.
WAART, J. — ZADELHOFF, C. — EDELBROEK, A.: Aflatoxin. Mould types, criteria, toxicity, detoxification, standards, chemical and biological detection. Alimenta, 13, 1974, č. 2, s. 35-43.
ZAPLETAL, O. — ZIMA, S.: Některé podmínky tvorby aflatoxinů produktivními kmeny plísně *Aspergillus flavus*. Vet. Med., Praha, 15, 1970, č. 9, s. 529-534.
—, Návod k použití přístroje Velasco Flurotoxin-meter, Neotec Instruments, INC, Linden Lane, Silver Spring, Maryland, USA.

Došlo dne 25. 5. 1979

ДРАБЕК, Й. — ПИСКАЧ, А. (Ветеринарный институт, Брно): Распространение афлатоксина в некоторых компонентах и полносоставных комбикормах для свиней. Vet. Med., Praha, 24, 1979 (10) : 597-602.

В июне 1978 г. с помощью качественно-хроматографического метода на таком слое силикагеля и количественного метода по Веласке определяли содержание алфатоксинов в кормовых компонентах и полносоставных комбикормах, предназначенных для выращивания и откорма свиней. Всего было взято и исследовано в лаборатории 104 образца кормов, в том числе 77 образцов (74,0 %) происходили из 14 хозяйств и 27 образцов (26,0 %) — из 8 комбикормовых предприятий Южной Моравии. Афлатоксины установлены в 14 образцах, или в 13,4 %. Наибольшее их содержание — 1920 $\mu\text{g kg}^{-1}$ — установлено в арахисе из Индии. Из полносоставных комбикормов они обнаружены в кормах для откорма свиней (A₁ и SOL), для супоросных маток, подсосных маток и для хряков, чаще всего в количестве 50—350 $\mu\text{g kg}^{-1}$ корма. В измененных по вкусу образцах кормов, взятых из металлических баков перед животноводческими помещениями в хозяйстве, афлатоксин содержался почти во всех случаях. На основе этих данных необходимо наметить такие профилактические меры в ходе уборки, послеуборочного хранения зерновых и компонентов комбикормов, которые предупреждают обесценивание кормов из-за размножения плесеней.

афлатоксины; количественное определение; корма; свиньи

DRÁBEK, J. — PISKAČ, A. (University of Veterinary Medicine, Brno): The Occurrence of Aflatoxin in Some Components and Complete Feed Mixtures for Pigs. Vet. Med., Praha, 24, 1979 (10) : 597-602.

The feed components and complete feed mixtures used in pig breeding and fattening in June 1978 were examined qualitatively by the silica-gel thin-layer chromatographic method, and quantitatively by the method after Velasco. The object of the examination was the occurrence of aflatoxins. On the whole, 104 feed samples were taken and subjected to the laboratory examination; this total number included 77 samples (74.0 %) coming from 24 farms and 27 samples (26.0 %) from eight feed plants in the South Moravian region. The presence of aflatoxins was detected in 14 samples of the examined feeds, i. e. 13.4 %. The highest content — 1920 $\mu\text{g kg}^{-1}$ — was found in groundnut from India. As to the complete feed mixtures, aflatoxin was found in mixtures for pig fattening (A₁ and SOL), in mixtures for pregnant sows (KPB), for lactating sows (KPK), and in the complete feed mixture for boars; the most frequently detected amounts ranged between 50 and 350 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of feed. The organoleptically altered feed samples, taken from metallic containers standing in front of the stables on the farms, contained aflatoxin almost in all cases. It will be necessary, on the basis of these findings, to take preventive measures during the harvesting, post-harvest treatment, and storage of grain and feed components, in order to avert the multiplication of the mould and deterioration of the feeds.

aflatoxins; quantitative determination; feeds; pigs

Adresa autorů:

MVDr. Josef Drábek, CSc., doc. MVDr. Alois Piskač, CSc., Vysoká škola veterinární, Palackého 1-3, 612 42 Brno

D. Dvořáková

DVOŘÁKOVÁ, D. (Státní veterinární ústav, Brno): *Detekce chlamydií imuno-fluorescenční metodou*. Vet. Med., Praha, 24, 1979 (10) : 603-614.

Ověřovali jsme možnost detekce chlamydií přímou imuno fluorescenční metodou v otiskových preparátech orgánů a tkání experimentálně infikovaných myši, kuřecích zárodků a přirozeně infikovaných domácích savců. Byla prokázána citlivost a časnost metody ve srovnání s průkazem ve světelném mikroskopu. Největší množství antigenu bylo možné detekovat v plicích myši po intranazální infekci, a to již za 6 až 12 hodin. V ostatních orgánech byly nálezy méně hojné; vizualizace antigenu měla dostatečnou brilanci fluorescence, dosáhl-li log 10 KEID₅₀ více než 3,0. Ve tkáních kuřecích zárodků bylo možné detekovat antigen postupně v otiskových preparátech alantoamniotické tekutiny, svaloviny zárodku, žloutkového vaku a chorioalantoidní blány pátý den po infekci. Po intratracheální infekci kachňat 1 000 000 infekčních dávek byly prokázány v preparátech orgánů kachňat usmrčených za 22 až 57 dní po infekci jen ojedinělé specificky zářící buňky s nízkou brilancí fluorescence. Metoda se osvědčila při detekci chlamydií v orgánech přirozeně infikovaných domácích savců, kde bylo zjištěno větší množství specificky fluoreskujících buněk o vysoké brilanci.

detekce ptačích a savčích chlamydií; přímá imuno fluorescenční reakce; experimentální a přirozená infekce

Chlamydie, ptačí i savčí, se staly v posledních desetiletích pozoruhodným epidemickým i epizootickým problémem. U skotu, ovcí a prasat je nejméně šest syndromů onemocnění přesvědčivě spojeno s různými druhy chlamydií. Mnohé otázky ve výzkumu protiepidemických a proti-epizootických opatřeních — zvláště u savčích chlamydií — zůstávají stále ještě otevřené. Nejjistějším základem pro sledování závažnosti chlamydií je laboratorní diagnostika. Jsou to především izolační a identifikační testy, které mohou dát uspokojivou odpověď na některé otázky týkající se zdroje infekce, šíření mezi zvířecí populací a mezi zvířetem a lidmi.

Novější studia prokázala, že antigenní složení chlamydií jsou specifická pro onemocnění (Storz, 1966). Fraser a Berman (1965) například zjistili, že chlamydie enzootického zmetání ovcí se antigenně liší od chlamydií způsobujících u ovcí polyartritidu. Z hlediska diagnostiky získávají na významu ty metody, které analyzují původce. Jednou z perspektivních metod je metoda imuno fluorescenční. Byla ověřována metoda přímá a nepřímá, jejich specifita a citlivost (Buckley aj., 1955; Ross a Borman, 1963; Zelenková a Strauss, 1963; Ba-

tes aj., 1965; Rehn a Červa, 1966; Baumann a Ilchmann, 1975). Významné je zjištění Serbezova aj. (1965), že konjugátem připraveným z rekonvalescentního antiséra enzootického zmetání ovcí je možné detekovat antigeny celé skupiny *Chlamydia*.

Ve své práci jsme se zabývali hodnocením přímé imunofluorescenční metody. Na experimentálně infikovaných myších a kuřecích zárodcích jsme při akutní a chronické infekci sledovali specifitu reakce, možnost nejranější detekce chlamydií po infekci a citlivost ve srovnání s ostatními laboratorními metodami.

V další etapě jsme ověřovali možnost detekce savčích chlamydií v orgánech přirozeně infikovaného skotu, ovcí a prasat.

MATERIÁL A METODY

K experimentální infekci myší jsme použili kmen K₂₂₉P/56, izolovaný z kachen Straussem, a kmeny V-178, V-121, rovněž izolované z kachen, ze sbírky Státního veterinárního ústavu v Brně.

Citlivost imunofluorescenční reakce jsme srovnávali s metodou průkazu vývojových částic ornitózy ve světelném mikroskopu, po obarvení otiskových preparátů metodou podle Macchiawella. Nálezy jsme doplňovali stanovením výše KELD₅₀ směsných vzorků těch orgánů, které jsme vyšetřovali imunofluorescenčně a mikroskopicky.

Holubí, kohoutí a hovězí protilátky proti antigenu chlamydií, navázané na FITC (Bioveta, n. p., Ivanovice na Hané), jsme testovali titrací. Jako antigeny jsme použili otiskové preparáty plic myší infikovaných kmenem V-178. Nejvyšší barvicí potence byla prokázána u konjugátu připravovaného z gamaglobulinové frakce rekonvalescentního séra skotu, jež dosahovalo komplement fixačním testem (KF) titru 640. Barvicí titr konjugátu dosahoval 128. U konjugátu připraveného z gamaglobulinové frakce holubího hyperimunního antiséra (KF 2048) byl dosažen barvicí titr 32. Kohoutí hyperimunní antisérum dosahovalo nepřímým komplement fixačním testem titru 256 až 512 a po navázání na FITC barvicího titru 8 až 16.

Ke zjišťování nejvhodnějšího způsobu infekce myší ve vztahu k určení optimálního orgánu pro imunofluorescenční detekci jsme hodnotili infekci intranazální, intracerebrální a intraperitoneální. Určovali jsme také možnost nejčasnější detekce chlamydií po infekci. Možnost detekce antigenu jsme sledovali v otiskových preparátech myších plic od 0 do 336 hodin po infekci 1000 infekčních dávek kmene V-178. Do pokusu byly zařazeny 32 myší.

Imunofluorescenční průkaz ornitózy jsme dělali v orgánech a tkáních 13 sedmidenních kuřecích zárodků infikovaných 1000 infekčními dávkami do žloutkového vaku. V pravidelných intervalech po usmrcení nebo úhynu jsme jednotlivé tkáně vyšetřovali imunofluorescenčně, mikroskopicky a stanovili jsme KELD₅₀.

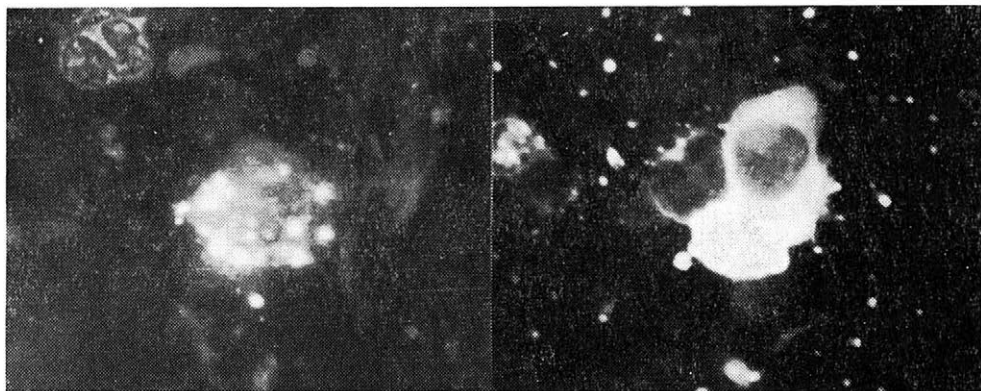
Za stejným účelem jsme infikovali intratracheálně 12 sedmidenních kachňat ($2 \cdot 10^6$ LD₅₀ pro myš — kmen V-178 a K₂₂₉P/56). Tři kachňata sloužila jako kontrola. Kachňata jsme usmrcovali za 18 dní (1), za 22 dny (6), 30 dní (2), 38 dní (2) a za 57 dní (1) po infekci. K imunofluorescenčnímu a mikroskopickému vyšetření a k izolaci agens na myších a kuřecích zárodcích jsme odebírali plíce, játra, slezinu, vzdušné vaky, larynx, konchy a mozek.

Možnost detekce savčích chlamydií imunofluorescenční metodou jsme prováděli v plicích 54 přirozeně infikovaných telat, osmi jehňat a dvou beranů s katarální bronchopneumonií, dále v 16 plicích zmetků krav, ve třech plicích zmetků prasnic a v jednom varleti býka se zánětlivou granulomatózní orchitidou.

VÝSLEDKY

Imunofluorescenčně byl antigen chlamydií znázorněn jako protoplazmatická fluorescence buněk o brilanci na ++ až ++++, s větším či menším množstvím žlutozeleně zářících kulovitých útvarů různé velikosti.

U myší, které hynuly čtvrtý až sedmý den po intranazální infekci, jsme zjistili v otiskových preparátech plic 60 až 188 specificky fluores-



1. Imunofluorescence antigenu chlamydií v protoplasmě buňky myších plic (zvětšení 540X) — Immunofluorescence of the antigen of chlamydia in the cell protoplasm of mouse lungs (magnified 540 times)

kujících buněk na 50 zorných polí (obr. 1). V mizních uzlinách peribronchiálních byly nálezy méně časté (14/50). V játrech, slezině a mozku byly prokazovány ojediněle svítící buňky, a to jen u omezeného množství preparátů. Mikroskopicky zjišťované vývojové částice ornitózy (elementární, iniciační tělíska, plaky, vesikuly apod.) se objevovaly především v pozdějším stadiu onemocnění, šestý až sedmý den. Výše log KELD₅₀ ve směsných vzorcích jednotlivých orgánů se pohybovala v rozmezí 0 až 5,0 a byla přímo úměrná mikroskopickým a imunofluorescenčním nálezům (tab. I).

Po intracerebrální infekci myši bylo největší množství fluoreskujících buněk zaznamenáno v mozku. V 70 % pozitivních preparátů byly prokázány zářící buňky v množství 1 až 40 (na 50 zorných polích). V plicích byly zjištěny specifické nálezy jen ojediněle. Otiskové preparáty sleziny a částečně i jater byly v důsledku nespecifické fluorescence buněk bílé krevní řady nehodnotitelné. Ve světelném mikroskopu byly vývojové částice nejčastěji prokazovány v mozku, dále v plicích a jen ojediněle ve slezině. Jára byla zcela negativní (tab. II).

Po intraperitoneální infekci myši byly imunofluorescenční metodou prokazovány nálezy také nejhojněji v plicích. Zvláště u myši uhynulých do 17. dne po infekci bylo zjištěno 6 až 30 zářících buněk na 50 zorných polí. U myši usmrcených 24. den po infekci se počet svítících buněk pohyboval v rozmezí 1 až 8/50. V játrech, slezině a mozku byly prokazovány jen sporadické nálezy u omezeného procenta preparátů (23 až 45 %). Krvetvorné orgány vykazovaly dosti silnou nespecifickou fluorescenci. Mikroskopicky byla ornitóza u uhynulých myši nejčastěji prokazována ve slezině, u usmrcených myši byl nález pozitivní jen v jednom preparátu (tab. III).

Při sledování nejranější detekce ornitózy při intranazální infekci myši byly již za šest až osm hodin po infekci zjišťovány v plicích ojedinělé buňky v počtu 1 až 2/50, které vykazovaly homogenní fluorescenci části protoplazmy s brilancí na ++. U myši usmrcených za 12 hodin po infekci jsme zjistili v plicích již 22 až 44 buňky na 50 zorných polí s brilancí fluorescence na +++ až +++++. V buňce byla kromě homo-

I. Detekce antigenu ornitózy po intranazální infekci myši — Ornithosis antigen detection after intranasal infection in mice

Myš — číslo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Procento pozitivních preparátů	log 10 LD ₅₀ (průměrný vzorek jednotlivých orgánů)
Klinické příznaky		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Úhyn (den po infekci)		4	4	5	5	5	5	6	6	7	7		
P. a. nález		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Plíce	IF	75	114	104	70	—++	—++	188	139	60	116	80	5,00
	Macch.	18	67	3	38	12	16	45	70	137	136	100	
Mízní uzliny peribronchiální	IF	1	14	0	6	1	—++	—++	—++	—++	—++	40	+++)
	Macch.	22	2	0	3	0	31	103	18	3	0	70	
Játra	IF	2	0	0	0	0	0	0	0	3	3	30	2,33
	Macch.	5	0	0	0	0	0	0	0	3	3	30	
Slezina	IF	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	2,00
	Macch.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Mozek	IF	3	3	2	0	0	0	0	1	0	0	40	0,00
	Macch.	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	10	

Legenda: +++ = pozitivní izolace na kuřecích embryích
 —++ = nehodnotitelné

IF = imunofluorescenční metoda
 Macch. = mikroskopický průkaz (barvení podle Macchiawella)

II. Detekce původce ornitózy po intracerebrální infekci myši — Detection of the causative agent of ornithosis after intracerebral infection in mice

Pokus		I.					II.						
Myš — číslo		1	2	3	4	5	log 10 LD ₅₀ (průměrný vzorek jednotlivých orgánů)	1	2	3	4	5	log 10 LD ₅₀ (průměrný vzorek jednotlivých orgánů)
Klinické příznaky		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	
Úhyn (den po infekci)		3	3	3	4	5		3	3	3	4	4	
Plíce	IF	1	0	1	1	0	2,46	5	— +	2	0	3	1,00
	Macch.	1	1	2	6	7		0	2	0	0	0	
Játra	IF	0	0	0	0	0	1,46	— ++	— ++	— ++	— ++	— ++	2,00
	Macch.	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	
Slezina	IF	— ++	— ++	— ++	— ++	— ++	3,36	— ++	— ++	— ++	— ++	— ++	+++)
	Macch.	0	1	0	2	2		0	0	0	2	2	
Mozek	IF	0	0	0	— +	18	3,50	40	32	1	10	6	4,20
	Macch.	12	1	0	— +	21		2	3	1	0	2	

Legenda: — + = neprováděno
 — ++ = nehodnotitelné
 +++) = pozitivní izolace na kuřecích zárodcích

III. Detekce původce ornitózy po intraperitoneální infekci myši — Detection of the causative agent of ornithosis after intraperitoneal infection in mice

Myš — číslo		1	2	3	4	5	6	log 10 LD ₅₀ (průměrný vzorek jednotlivých orgánů)	7	8	9	10	11	12	13
Klinické příznaky		+	+	+	+	+	+		0	0	0	0	0	0	0
Den po infekci	úhyn	4	6	7	14	14	17								
	vyřazení								24	24	24	24	24	24	24
P. a. nález		+	+	+	+	+	+		0	0	0	0	0	0	0
Plíce	IF	13	6	27	30	7	12	3,66	5	8	—+	2	1	5	3
	Macch.	—+	—+	0	0	—+	1		1	0	2	0	0	1	0
Játra	IF	—++	1	15	4	24	0	3,17	7	11	0	0	0	3	0
	Macch.	2	1	2	0	—+	1		0	0	0	0	0	3	0
Slezina	IF	—++	—++	6	0	32	—++	3,36	—++	1	—++	—++	—++	—++	—++
	Macch.	9	2	3	0	—++	1		0	1	1	0	0	0	5
Mozek	IF	0	0	1	—+	2	0	2,35	0	2	0	0	0	0	0
	Macch.	0	0	—+	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0

Legenda: —+ = neprováděno
—++ = nehodnotitelné

IF = imunofluorescenční metoda
Macch. = mikroskopický průkaz (barvení podle Macciawella)

IV. Detekce původce ornitózy v plicích myší v průběhu 4 až 336 hodin po infekci — Detection of the causative agent of ornithosis in the lungs of mice within 4 to 336 hours after infection

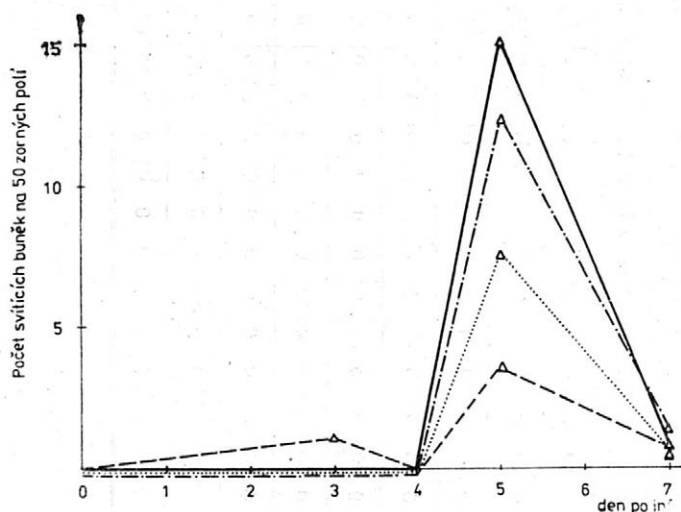
Myš — číslo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Klinické příznaky		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hodina po infekci	úhyn																	48	48	48	48	48	48	48	48	48	52	52	52	192	336
	vyřazení	4	4	6	6	8	8	12	12	24	24	28	28	32	32	37	37														
P. a. nález		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Plíce	IF	0	0	2	1	2	1	44	22	20	44	63	78	22	24	61	-++	138	126	77	114	53	74	70	57	94	134	86	0	144	11
	Macch.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	3	2	0	5	1	0	54	22	16	13	41	72	10	4	37	52	13	9	34	43
Játra	IF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	5	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	41	0
	Macch.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
Slezina	IF	0	-+	0	0	0	0	0	-+	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	4	0	-++	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Macch.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-++	0	1	1	0	0	1	0	0	-++	0	1
Mozek	IF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Macch.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	-+	0	0	0
Mízní uzliny peribronchiální	IF	0	0	-++	-++	-++	-++	0	9	-++	13	0	5	7	7	25	39	14	66	19	50	9	4	3	1	0	-+	0	0	5	5
	Macch.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	19	3	5	3	0	1	0	1	2	2	3	1	2	13	6

Legenda: -+ = neprováděno
-++ = nehodnotitelné

IF = imunofluorescenční metoda
Macch. = mikroskopický průkaz (barvení podle Macchiawella)

genně zářící protoplazmy viditelná i žlutozeleně svítící granula. V dalším vývoji infekčního procesu zůstalo množství fluoreskujících buněk přibližně na stejné úrovni. Od 48 hodin po infekci, kdy myšky začínaly hynout, množství specificky fluoreskujících buněk narůstalo a dosáhlo maxima osmý den po infekci: byly zaznamenány 144 fluoreskující buňky na 50 polí. Za 336 hodin počet zářících buněk prudce poklesl. Nejvíce antigenu bylo prokázáno v plicích a mízních uzlinách peribronchiálních. V ostatních orgánech — v játrech, slezině a mozku — byly nálezy ojedinělé. Adekvátní kvantitativní nálezy jsme zjistili i ve světelném mikroskopu. Poprvé byly vývojové částice ornitózy touto metodou patrné v plicích za 24 hodiny a v mízních uzlinách peribronchiálních za 37 hodin po infekci. Zpoždění mikroskopických nálezů proti imunofluorescenčnímu znázornění činilo 18 až 25 hodin. V první fázi infekce byla imunofluorescenční metoda výrazně citlivější [tab. IV].

V otiskových preparátech chorioalantoidní blány kuřecího zárodku infikovaného do žloutkového vaku byly zjištěny již třetí den po infekci ojediněle zářící buňky. Od pátého dne, kdy začala ambrya hynout, jsme



2. Detekce původce ornitózy IF metodou v tekutinách a tkáních embryonovaného vejce — Detection of the causative agent of ornithosis by the IF method in the fluids and tissues of an embryonated egg

— alantoamniotická tekutina
 žloutkový vak
 --- chorialantoická blána
 - · - · - svalovina zárodku

3. Imunofluorescence antigenu chlamydií v protoplasmě buňky chorioalantoické blány kuřecího zárodku (zvětšení 540X) — Immunofluorescence of the antigen of chlamydia in the cell protoplasm of the chorio-allantoid membrane of a chick embryo (magnified 540 times)

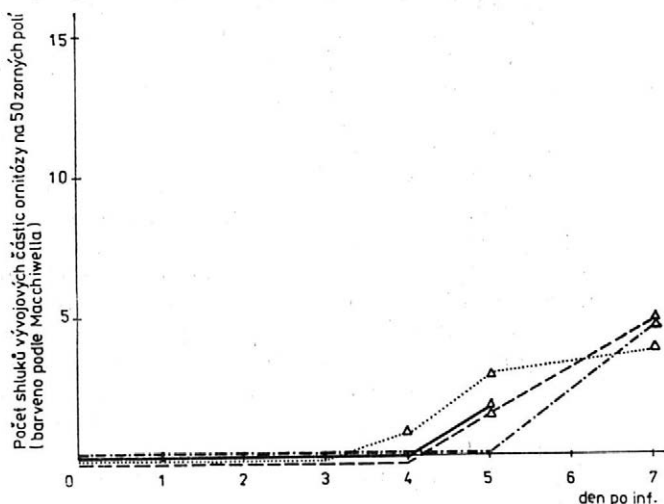


zaznamenali specifickou fluorescenci již ve všech vyšetřovaných tkáních a v alantoamniotické tekutině. Nejvyšší počet fluoreskujících buněk, o brilanci na + + +, jsme zaznamenali pátý den po infekci postupně v alantoamniotické tekutině, svalovině zárodku, žloutkovém vaku a v chorioalantoidní bláně. V průměru byla zjištěna 1 až 21 svítící buňka na 50 zorných polí (obr. 2, 3).

První nález vývojových forem ve světelném mikroskopu se nám podařilo prokázat v otiskovém preparátu chorioalantoidní blány třetí den a žloutkového vaku čtvrtý den po infekci. Kromě shluků iniciálních tělísek jsme v preparátech žloutkového vaku zaznamenali hojně a v preparátech chorioalantoidní blány a svaloviny ojediněle i rozsev elementárních tělísek po celém preparátě (obr. 4).

4. Detekce původce ornitózy mikroskopickým průkazem v tekutinách a tkáních embryonovaného vejce — Detection of the causative agent of ornithosis by microscopic demonstration in the fluids and tissues of an embryonated egg

— alantoamniotická tekutina
 žloutkový vak
 --- chorioalantoická blána
 ····· svalovina zárodku



Jen u čtyř kachňat se po experimentální infekci projeví nevýrazné příznaky onemocnění a patologicko-anatomický nález. Jen u osmi kachňat byly zjištěny ložiskové katarální pneumonie podél hlavních bronchů, sinusitidy, katarální aerosakulitidy a ojediněle tumor sleziny. Titr IRVK kachňat usmrčených 22. den po infekci dosahoval výše 4 až 8, kachňat usmrčených 30. den po infekci 16 a 32. Kachňata usmrčená 38. a 57. den, stejně jako kachňata kontrolní, měla titr nulový. Zpětná reizolace agens z orgánů kachňat na myších a kuřecích zárodcích se nezdařila. Specifická fluorescence se projevila pouze u nízkého procenta otiskových preparátů, a to jen v menším množství s nízkou brilancí na + +, výjimečně na + + +. Poměrně nejvíce fluoreskujících buněk bylo zjištěno v plicích kachňat (2 až 5/50): ve 40 % preparátů. Ve slezině, játrech, vzdušných vacích a konchách byly nálezy ojedinělé, a to v 15 % preparátů. Mozek a larynx byly zcela negativní. Ve světelném mikroskopu nebyla zjištěna vývojová stadia ornitózy.

V otiskových preparátech plic 11 telat, pěti zmetků krav, jednoho berana a ve varleti býka byly prokázány specificky fluoreskující buňky o brilanci fluorescence na + + + až + + + + v počtu 5 až 70/50 zorných polí. Z celkového počtu 84 vyšetřených vzorků bylo pozitivních 22 %. Ve všech případech byla izolace v kuřecích zárodcích s následným mikroskopickým průkazem pozitivní.

Ross a Borman (1963), Bates aj. (1965), Serbezov aj. (1965), Schabinski (1966), Baumanová (1974) a Baumanová a Ilchman (1975) použili s dobrými výsledky přímou imunofluorescenční metodu k detekci chlamydií.

Připravili jsme a vyzkoušeli na podkladě zkušeností Goldina a Krasnika (1963) a Rehna a Červy (1966) holubí a kohoutí konjugáty. Konjugát hovězí, připravený z rekonvalescentního séra skotu, jsme použili na základě poznatků Serbezova aj. (1965) o vhodnosti ovčích antiséra proti enzootickému zmetání ovcí pro imunofluorescenční studia celé skupiny *Chlamydia*. Obdobně i nám se zdařila detekce ornitózických kmenů hovězím konjugátem. Hodnocení specificity reakce bylo zajištěno využitím systémů kontrol, souběžným průkazem vývojových částic chlamydií ve světelném mikroskopu a titrací reizolovaného původce na kuřecích zárodcích.

Názory na využití imunofluorescenční reakce k diagnostice nebyly vždy jednotné. Zelenková a Strauss (1963) referují o možnosti detekce ornitózy ve slezinách latentně infikovaných kachen. Rehn a Červa (1966) označují diagnostiku ornitózy v otiskových preparátech jater a slezin ptáků, zejména latentně infikovaných, za choulostivou. Podle nich platí zásada předmnožení na citlivém zvířeti.

Na modelovém pokusu za použití referenčních kmenů jsme vytvořili standardní podmínky pro posouzení reakce, abychom vyvodili některé praktické poznatky pro využití metody k diagnostice. Nejčasněji po infekci a také v největším množství byl antigen znázorněn v plicích myši po intranazální infekci. Shodné výsledky vykázali i Baumanová a Ilchmann (1975), kteří zjistili, že po intranazální infekci morčat boviním kmenem základními orgány, kde šlo k multiplikaci viru, byly plice a trachea. Ostatní orgány jako slezina, CNS a intestinální mukóza do vývoje infekčního procesu zasáhly méně. Tak jako v našich pokusech se specificky fluoreskující buňky objevovaly v orgánech za šest až dvanáct hodin po infekci. Podle nás však má fluorescence buněk diagnostickou hodnotu až za 12 hodin po infekci, poněvadž dříve zjišťovaná fluorescence dosahovala brilance jen na ++. Franěk (1963) podmínku hodnocení brilance fluorescence na +++ až ++++ považuje za důležitou, chceme-li se vyhnout omylům. Podobně se jeví tato otázka i u studia chronické infekce kachňat. Nálezy v otiskových preparátech orgánů pro nízkou brilanci fluorescence nebylo možné diagnosticky hodnotit. Při srovnání imunofluorescenční metody s průkazem vývojových částic ve světelném mikroskopu znázornila IF metoda 2× až 3,5× více antigenu. Citlivost reakce měla však svoje omezení. Koncentrace chlamydií byla přímo úměrná jejich detekci. Klesl-li log 10 KELD₅₀ pod 3,0, snižovalo se i množství buněk a brilance fluorescence.

Naše výsledky s využitím přímé metody při detekci chlamydií přirozeně infikovaných telat, zmetků krav a ovcí podporuje svými experimentálními pracemi Baumanová (1974). Po intraorální a intratracheální infekci telat prokazovala specifickou fluorescenci v 21 orgánu, nejvíce v plicích, lymfatických uzlinách gastrointestinálního a respiračního traktu, v thymu a v leptomeningu. V našich pokusech a v pokusech Baumanové (1974) odpovídala velikost, tvar a celková morfologie

imunofluorescenčně znázorněného antigenu výsledkům získaným v modelových pokusech na myších a morčatech i vývojovým částicím zjišťovaným ve světelném mikroskopu.

Literatura

- BATES, H. A. — POMEROY, B. S. — SEAL, V. S. — JAY, A. R.: Ornithosis experimental immunofluorescent studies. *Avian Dis.*, 9, 1965, s. 24-30.
- BAUMANN, G.: Zum fluoreszenzhistologischen Nachweis experimenteller Bedsonieninfektionen beim Kalb. *Arch. exp. VetMed.*, 28, 1974, s. 847-867.
- BAUMANN, G. — ILCHMANN, G.: Experimentelle Infektion von Meerschweinchen mit Chlamydien 2. Mitt. Fluoreszenzimmunologische Untersuchungen. *Arch. exp. MedVet.*, 29, 1975, s. 879-896.
- PUCKLEY, S. M. — WHITNEY, E. — RAPP, F.: Identification by fluorescent antibody of developmental forms of psittacosis virus in tissue culture. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 90, 1955, s. 225-230.
- FRANĚK, J.: Použití fluoreskujících sér k detekci patogenních mikroorganismů v zevním prostředí. In: Sb. věd. prací VLVDÚ, 4, 1963, s. 184-190.
- FRASER, C. E. O. — BERMAN, D. T.: Type specific antigens in the psittacosis-lymphogranuloma venereum group of organisms. *J. Bact.*, 89, 1965, s. 943-948.
- GOLDIN, R. B. — KRASNIK, F. I.: Specific staining of ornithosis virus by fluorescein labelled incomplete antibodies. *Acta virol.*, Praha, 7, 1963, s. 561.
- REHN, F. — ČERVA, L.: Využití imunofluorescence u rickettsií a mikroorganismů skupiny *Bedsonia*. *Voj. zdravot. Listy*, Sb., 2, 1966, s. 35-37.
- ROSS, M. R. — BORMAN, E. K.: Direct and indirect fluorescent antibody techniques for psittacosis-lymphogranuloma venereum — trachoma group of agents. *J. Bact.*, 85, 1963, s. 851-858.
- SERBEZOV, V. — OGNANOV, D. — MATOVA, E. — ALEXANDROV, E. — MAKAVEJEVA, E. — NEDELCEVA, N.: Detection of ornithosis virus by the fluorescent antibody method, using convalescent antiviral abortion sheep sera. *J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immun.*, 9, 1965, s. 253-255.
- SCHABINSKI, G. — SCHADE, W. — URBACH, U.: Die fluoreszenzserologische Darstellung von Ornithose-Viren. *Wiss. Z. Karl Marx Univ. Lpzg, Math.-naturwiss.*, R. 16, 1966, č. 3, s. 643-647.
- STORZ, J.: *Psittacosis lymphogranuloma* infection of sheep. Antigenic structures and interrelations of PL agents associated with polyarthritides, enzootic abortion. Intrauterine and latent intestinal infections. *J. comp. Path.*, 76, 1966, s. 351-362.
- ZELENKOVÁ, L. — STRAUSS, J.: Test fluorescenčních protilátek v diagnostice ornithózy. *ČSEMI*, 3, 1963, s. 140-144.

Došlo dne 13. 3. 1979

ДВОРЖАКОВА, Д. (Государственный ветеринарный институт, Брно): Детекция хламидий по методу иммунофлуоресценции. *Vet. Med.*, Praha, 24, 1979 (10): 603-614.

Испытывали возможность детекции хламидий по методу непосредственной иммунофлуоресценции в отпечатывающих препаратах органов и тканей у зараженных в экспериментальном порядке мышей, куриных эмбрионов естественно зараженных домашних млекопитающих. Доказаны чувствительность и быстрота метода по сравнению с работами со световым микроскопом. Наибольшее количество антигена можно обнаружить в легких мышей после внутриносового заражения уже спустя 6—12 час. В остальных органах это количество меньше; в зрительном порядке антиген обладает достаточным блеском флуоресценции, если $\log_{10} \text{KEID}_{50}$ равен более 3,0. В тканях куриных зародышей антиген можно было постепенно обнаружить в отпечатывающих препаратах алантоамниотической жидкости, мышечной ткани, желточного мешка и хориоалантоидной оболочки на 5-й день после заражения. После интратрахеального заражения утят в масштабе 1 000 000 доз антигена в препаратах органов утят, забитых спустя 22—57 дней после заражения, были обнаружены лишь единичные специфически светящиеся клетки с низким флуоресцентным блеском. Метод хорошо

себя оправдывает в детектировании хламидий в органах зараженных естественным путем домашних млекопитающих, где установлено значительное количество специфически флюоресцирующих клеток с высоким блеском.

детектирование хламидий пернатых и млекопитающих; непосредственная иммунифлюоресцентная реакция; экспериментальное и естественное заражение

DVOŘÁKOVÁ, D. (State Veterinary Institute, Brno): *Detection of Chlamydia by the Immunofluorescence Method*. Vet. Med., Praha, 24, 1979 (10) : 603-614.

The possibility of detecting chlamydia by the direct immunofluorescence method was tested in the impression preparations of experimentally infected mice, chick embryos and naturally infected domestic mammals. In comparison with light-microscope detection, this method was found to be sensitive and expedient. The greatest amount of antigen could be detected in the lungs of mice after intranasal infection already within 6 to 12 hours. In the other organs the findings were less ample; the visualization of the antigen had a good fluorescence brilliance if log 10 KEID₅₀ was more than 3.0. In the tissues of chick embryos, the antigen could be detected in the impression preparations of the allanto-amnionic fluid, embryonal muscle, yolk sac, and chorio-allantoid membrane the fifth day after infection. After the intratracheal infection of ducklings with 1 000 000 infection doses, only individual specifically radiating cells with a low brilliance of fluorescence were detected in the organ preparations of ducklings killed 22 to 57 days after infection. The method proved to be suitable for the detection of chlamydia in the organs of naturally infected domestic mammals in which a great amount of specifically fluorescing high-brilliance cells were found.

detection of avian and mammalian chlamydia; direct immunofluorescence reaction; experimental and natural infection

DVOŘÁKOVÁ, D. (Staatliche Veterinäranstalt, Brno): *Detektion der Chlamydien mit Hilfe der Immunfluoreszenzmethode*. Vet. Med., Praha, 24, 1979 (10) : 603-614.

Wir überprüften die Möglichkeit der Detektion von Chlamydien mit der direkten Immunfluoreszenzmethode in Abdruckpräparaten der Organe und Gewebe experimentell infizierter Mäuse, Kükenembryonen und natürlich infizierter Haussäugetiere. Es wurde die Sensibilität und Zeitigkeit der geprüften Methode im Vergleich zum Nachweis im Lichtmikroskop nachgewiesen. Die größte Menge des Antigens konnte in der Lunge von Mäusen nach intranasaler Infektion, und zwar bereits in 6 bis 12 Stunden, festgestellt werden. In den übrigen Organen waren die Befunde weniger zahlreich. Die Visualisierung des Antigens wies eine genügende Fluoreszenzbrillanz auf, wenn log 10 KEID₅₀ mehr als 3 erreichte. In den Geweben der Kükenembryonen konnte das Antigen fortschreitend in den Abdruckpräparaten in der Allantois-Amnio-Flüssigkeit, der Embryomuskulatur, dem Dottersack und in der Chorioallantoishaut am fünften Tag nach der Infektion festgestellt werden. Nach intratrachealer Infektion der Entenküken mit 1 000 000 Infektionsdosen wurden in den Organpräparaten von in 22 bis 57 Tagen nach der Infektion getöteten Jungenten nur vereinzelt spezifisch strahlende Zellen mit geringer Fluoreszenzbrillanz nachgewiesen. Die geprüfte Methode bewährte sich bei der Detektion von Chlamydien in Organen natürlich infizierter Haussäugetiere, wo eine größere Menge spezifisch fluoreszierender Zellen mit hoher Brillanz festgestellt wurde.

Detektion von Vogel- und Säugetierchlamydien; direkte Immunfluoreszenzreaktion; experimentelle und natürliche Infektion

Adresa autorky:

MVDr. Dagmar Dvořáková, Státní veterinární ústav, Mercova 54, 612 38 Brno

ANALÝZA REZISTENCE A JEJÍ TRANSFERABILITY U MIKROFLÓRY Z PRVOVÝROBY MASA

M. Malíková, Z. Matyáš

MALÍKOVÁ, M. — MATYÁŠ, Z. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Analýza rezistence a její transferability u mikroflóry z prvovýroby masa*. Vet. Med., Praha, 24, 1979 (10) : 615-622.

Sledovali jsme spektra rezistence a jejich transferabilitu u G- kmenů izolovaných z prvovýroby masa metodou podle Bohuše (1974). Ze souboru kmenů bylo 93 % rezistentních, z toho 65 % multirezistentních. 35 % rezistentních kmenů bylo dárce R plazmidů. Ze dvou použitých recipientů byl signifikantně lepším akceptorem laboratorní kmen *E. coli* IHE Nx. Z 21 zjištěného spektra rezistence byly mezi nejfrekventovanějšími: Tc, SmTcSu a TcAm. Ze dvou nejčastěji se vyskytujících komplexních typů rezistence donorových kmenů SmCmTcAmSu a SmTcAmSu byl zaznamenán transfer dvou až čtyř, resp. šesti různých typů plazmidů, většinou jednodušších. Ve spektrech transferujících R plazmidů převládaly determinanty Tc a Am, z toho ve většině případů jako samostatné markery a jen v 21 až 36 % případů v komplexnějších typech.

R plazmidy; přenosná rezistence; kolicinogenita; antibiotika; sulfonamidy; G-mikroorganismy

Negativní vliv R plazmidů na léčbu nejrůznějších bakteriálních onemocnění lidí i zvířat podtrhuje skutečnost, že determinují rezistenci na mnohá běžná i nová antibiotika či antimikrobiální látky zároveň. V současné době je již většinou známa genetická podstata R plazmidů, jejich fyzikálně chemické složení, mechanismy rezistence, kterou determinují, a zároveň jsou k dispozici údaje o jejich ekologickém, epidemiologickém i epizootologickém významu.

Za závažný zdroj a dodavatel plazmidových kmenů do lidské populace jsou považovány především velkochovy hospodářských zvířat, ve kterých byla zvířata přikrmována antibiotiky, popřípadě dlouhodobě léčena medikovanými krmnými přípravky (Krčméry aj., 1973a, 1974; Linton, 1977 a jiní). Surovinami a potravinami živočišného původu se pak tyto R⁺ kmeny rozšiřují do lidské populace (Moorhousová aj., 1969; Cooke aj., 1970; Krčméry aj., 1973 a jiní), což podtrhuje význam a nutnost soustavně sledovat R⁺ kmeny v různých podmínkách prvovýroby masa a potravin živočišného původu i ve zpracovatelském úseku živočišné produkce.

MATERIÁL A METODY

Bakteriální kmeny — původ, identifikace. Jde o soubor 296 G- mikroorganismů izolovaných v letech 1976 až 1977 z jatečných telat (mléčný

výkrm) a z prostředí jejich chovů. Podle původu materiálu byly kmeny rozděleny do čtyř skupin (střevo, maso, stěry—maso, stěry—stáj). Vzorky k testaci pro první tři skupiny byly odebírány přímo v provozu na hovězí porážce, pro čtvrtou skupinu ze stájí zemědělských závodů (8), odkud byla zvířata odesílána na jatky. Většinou se jedná o odběry materiálu z podlahy, stěn, koryt, výjimečně o vzorky vzduchu odebíraného aeroskopem.

Soubor zahrnuje 276 kmenů potenciálních donorů vykazujících rezistenci na jedno nebo více testovaných antibiotik a chemoterapeutik (Sm Cm Tc Kn Am Su), ale citlivých na nalidixin. Test citlivosti pro výběr rezistentních kmenů byl dělán standardní diskovou metodou (Krčméry aj., 1974).

Izolované kmeny jsme většinou identifikovali sami (Cowan a Steel, 1965), pouze v komplikovanějších případech jsme se obrátili na Čs. sbírku mikroorganismů v Brně. Z 276 rezistentních kmenů bylo zařazeno 190, tj. 69 %, jako *E. coli*; ostatní kmeny byly začleněny do species: *Citrobacter* (39), *Enterobacter* (17), *Klebsiella* (10), *Hafnia* (7), *Proteus* (5), *Serratia*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* (po 2), *Alcaligenes* a *Acinetobacter* (po jednom kmeni).

Jako recipienty jsme použili dva standardní laboratorní nalidixin rezistentní (< 100 µg Nx ml⁻¹ média), na sledovaná antibiotika a chemoterapeutika však citlivé kmeny: *E. coli* K12 185 Nx a *E. coli* K12 IHE Nx.

Antibiotika a chemoterapeutika — provenience, koncentrace, označení. Streptomycin (Sm) — Pharmachin, Bulharsko; tetracyklin (Tc), chloramfenikol (Cm), kyselina nalidixová (Nx) — Spofa, ČSSR; kanamycin (Kanamytex, Kn) — Bristol, USA; ampicilin (Penbritin, Am) — Beecham, Anglie.

Koncentrace preparátů v selekčních půdách v µg ml⁻¹ média: Sm — 20, Cm — 20, Tc — 20, Kn — 30, Am — 200, Nx — 100. Selektce na sulfonamidy (Su) nebyla dělána; tento determinant však byl sledován a hodnocen při analýzách přenesených R plazmidů.

Metoda detekce transferu R plazmidů. Použili jsme citlivou, ekonomickou a dobře reprodukovatelnou mikrometodu podle Bohuše (1974), umožňující testovat najednou větší počet kmenů na přítomnost R plazmidů. Tato metoda detekuje přenos R plazmidů až do minimální frekvence 10⁻⁶ recipientních buněk na jednu konjugující donorovou buňku. Do výsledků byly proto zahrnuty všechny pozitivní transfery bez ohledu na jejich frekvenci. Pro podrobnosti metodického postupu odkazujeme na autorovu publikaci (Bohuš, 1974).

Kolicíny byly sledovány u R⁺ kmenů Fredericqovou metodou, podrobně rozvedenou v monografii Krčmého aj. (1974), na kterou odkazujeme. Jako indikátorové kmeny byly použity: *E. coli* K12 185 Nx, ROW a φ.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Z celkového počtu 296 vyšetřených kmenů bylo 93 % rezistentních, z toho 28 % mono- a 65 % multirezistentních (2—5násobně). Ve všech skupinách (tab. I) byly největší počty kmenů rezistentní na tetracyklin

I. Přehled rezistence (‰) na zkoušená antibiotika a sulfonamidy u G- kmenů (disková metoda) — A survey of resistance (‰) to the tested antibiotics and sulphonamides in G- strains (disc method)

Druh a původ vzorků	% rezistentních kmenů					
	Tc	Am	Sm	Su	Cm	Kn
Střevo	95	39	53	48	22	2
Maso	85	55	46	44	18	3
Stěry-maso	84	51	47	45	14	1
Stěry-stáj	82	36	59	45	32	9
Celkem	87	48	49	46	19	2

(82—95 %), což se dalo předpokládat, protože tetracykliny patří ve veterinární medicíně mezi nejužívanější širokospektrá antibiotika jak k účelům preventivním, terapeutickým, tak i do nedávné doby krmným. V současné době po zákazu nutričního použití antibiotik (Instrukce MZVŽ ČSR, 1974) se užívají tetracykliny ve veterinární praxi vedle individuální léčby injekcemi, perorálními a lokálními přípravky také ve formě medikovaných premixů, určených k hromadné léčebné a léčebně ochranné aplikaci prostřednictvím krmiva (např. Aureovit compos., Aureovit 12 C 40), které jsou vydávány zemědělským závodům pouze na doporučení a předpis veterinárního lékaře. Dále v pořadí rozsahu rezistence u sledované bakteriální populace následoval: streptomycin (46—59 %), ampicilin (36—55 %), sulfonamidy (44—48 %), chloramfenikol (14—32 %) a kanamycin (1—9 %).

Nárůst mikrobiální rezistence na streptomycin a sulfonamidy odpovídá jejich dlouholetému léčebnému i nutričnímu používání ve veterinární praxi. Pro všechny sulfonamidy platí jev úplné zkřížené bakteriální rezistence. Jednotlivé bakteriální druhy mohou však být v různém stupni citlivé či rezistentní k jednotlivým sulfonamidům (Krčméry aj., 1974). Výskyt Sm a Su determinantů téměř u poloviny námi izolovaných kmenů (bez rozdílu species) v procesu prvovýroby masa odpovídá i výskytu těchto determinantů u G- bakteriální populace stejného původu v pokusech Ülgena (1976) a Sasse-Patzerové (1977).

Vysoké procento rezistentních kmenů na ampicilin (36—55 %), pozorované např. také Babcockem aj. (1973), Stankovským (1976), Ülgenem (1976) a dalšími pracovníky u *Enterobacteriaceae* izolovaných z potravin živočišného původu na zpracovatelském úseku produkce poněkud překvapuje, protože ampicilin je antibiotikum vyhrazené jen pro humánní medicínu a ve veterinární terapii se používá jen zcela výjimečně. Vysvětlení lze hledat mimo jiné i v inaktivaci ampicilinu různými typy beta-laktamázy G- mikroorganismů, které se mohou kódovat a přenášet na bakteriálních plazmidech (Krčméry aj., 1978).

Vývoj bakteriální rezistence na chloramfenikol (14—32 %), jehož použití se v poslední době značně rozšířilo i u zvířat zásluhou celé palety chronických preparátů (Seznam veterinárních přípravků Spofa, 1977), má podle našich výsledků poněkud nežádoucí vzestup např. ve srovnání s výsledky Stankovského (1976), který zaznamenal na Slovensku u species *Citrobacter*, *Hafnia* a *Providencia* izolovaných z masa a potravin živočišného původu jen 3,6 % rezistentních kmenů na chloramfenikol. Ve srovnání s humánními kmeny z různých klinických a patologických materiálů, které vykazovaly vysoké procento rezistence na chloramfenikol (Krčméry aj., 1974, 1975; Bohuš a Kultán, 1975), jsou však naše nálezy poměrně nízké. Naše kmeny byly však izolovány ze zdravé zvířecí populace.

Rezistence na kanamycin se vyskytla pouze u 1 až 9 % kmenů z našeho sledovaného souboru, a to jen u species *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Alcaligenes*, *E. coli*, přičemž žádný kmen neobsahoval R plazmid. Tato vysoká citlivost kmenů na kanamycin je v souladu s jeho vzácným a zcela výjimečným použitím ve veterinární medicíně. Jistý podíl na výskytu této rezistence mají pravděpodobně i veterinární přípravky s obsahem neomycinu, protože u koliformních mikroorganismů existuje jev úplné

zkřížené rezistence na kanamycin a neomycin [Krčméry aj., 1974; Bohuš a Kultán, 1975].

V pořadí rezistence na sledovaná antibiotika a sulfonamidy podle rodové příslušnosti stojí na prvním místě species *Hafnia* (100 %), následují *E. coli* (97 %), *Citrobacter* (91 %), *Klebsiella* (83 %), *Enterobacter* (74 %).

Pro podrobnosti o mechanismech účinku jednotlivých antibiotik a vývoji rezistence odkazujeme na monografii Krčméryho aj. [1978].

Vysoké osídlení střevní mikroflóry, masa i životního prostředí jatečných zvířat multirezistentními kmeny vytváří akutní nebezpečí přenosu rezistence na patogenní kmeny.

II. Celkový přehled rezistence a její transferability u kmenů izolovaných z jatečných telat a z prostředí jejich chovů — An over-all survey of resistance and its transferability in strains isolated from slaughter calves and from the environment in which they were kept

Skupina	Druh materiálu	Počet kmenů					
		vyšetřených	rezistentních (%) ^{*)}	transferujících (%) ^{*)}			
				celkem	<i>E. coli</i> K ₁₂ 185 Nx	<i>E. coli</i> K ₁₂ IHE Nx	
1	střevo	62	62 (100)	27 (43)	17 (27)	25 (40)	
2	maso	104	95 (91)	39 (41)	16 (17)	39 (41)	
3	stěry-maso	107	97 (91)	26 (27)	13 (13)	25 (26)	
4	stěry-stáj	23	22 (96)	4 (18)	4 (18)	4 (18)	
Celkem		296	276 (93)	96 (35)	50 (18)	93 (34)	

^{*)} = procento vypočteno z počtu vyšetřených kmenů v každé skupině

⁺⁾ = procento vypočteno z počtu rezistentních kmenů v každé skupině

35 % všech rezistentních kmenů bylo dárce R plazmidů. V jednotlivých skupinách (tab. II) se dárcovská schopnost testovaných kmenů bez ohledu na druh recipienta pohybovala od 18 % (stěry-stáj) do 43 % (střevní kmeny). Podrobnější analýza ukázala, že ze dvou použitých recipientů byl zřetelně lepším akceptorem laboratorní kmen *E. coli* K₁₂ IHE Nx, který přijal plazmidy od 34 % donorových kmenů. Recipientní schopnost kmene *E. coli* K₁₂ 185 Nx byla signifikantně nižší (při $P = 0,01$) s příjmem plazmidů 18 %.

Nejvyšší procento transferability bylo zjištěno u kmenů *E. coli* (43 %), dále následovaly species *Klebsiella* (30 %), *Hafnia* (28 %), *Enterobacter* (18 %) a *Citrobacter* (15 %). U ostatních species nebyl zaznamenán přenos R plazmidů. Mezi jednotlivými skupinami jsou menší nevýznamné odchylky.

Z 21 zjištěného typu (vzoru) rezistence byly mezi prvními třemi nejfrekvencovanějšími: monorezistentní typ Tc, dále komplexnější typy

III. Analýza spekter rezistence a jejich transferability u sledovaného souboru gramnegativních kmenů bez ohledu na jejich původ a rodovou příslušnost — An analysis of resistance spectra and their transferability in the examined set of gram-negative strains, irrespective of their origin and genus to which they belonged

Spektrum donorů	Kmeny			Spektrum transferujících R plazmidů							
	rezi- stentní	trans- ferabilní	(%)	<i>E. coli</i> K ₁₂ 185 Nx		kmenů (%)		<i>E. coli</i> K ₁₂ IHE Nx		kmenů (%)	
1. Tc	60	28	(47)	Tc	(11×)	11	(18)	Tc	(28×)	28	(47)
2. Sm Tc Su	36	14	(39)	Tc	(8×)	10	(28)	Tc	(10×)	14	(39)
3. Tc Am	34	12	(35)	SmTcSu	(2×)			SmTcSu	(4×)		
				Am	(8×)	9	(26)	Am	(5×)	11	(32)
				Tc	(1×)			TcAm	(4×)		
4. SmCmTc Su	28	3	(11)					Tc	(2×)		
				CmTcSu	(2×)	3	(11)	SmCmSu	(1×)	2	(7)
				CmSu	(1×)			CmTcSu	(1×)		
5. Sm Tc AmSu	26	12	(46)	Am	(3×)	4	(15)	Am	(4×)	11	(42)
				Tc	(1×)			SmTcSu	(2×)		
								SmSu	(2×)		
								SmTcAmSu	(1×)		
								TcAm	(1×)		
								Tc	(1×)		
6. Am	22	2	(9)	Am	(1×)	1	(4)	Am	(2×)	2	(9)
7. SmCmTc AmSu	16	13	(81)	Am	(2×)	6	(37)	CmTcAmSu	(4×)	13	(81)
				CmTcAm	(2×)			SmCmTcAmSu	(3×)		
				CmTcSu	(1×)			CmTcSu	(2×)		
				TcAm	(1×)			CmTcAm	(1×)		
								TcAm	(2×)		
								Am	(1×)		
8. Sm Tc	14	4	(29)	Tc	(2×)	2	(14)	Tc	(4×)	4	(29)
9. Sm Tc Am	9	3	(33)	SmTcAm	(1×)	2	(22)	SmTcAm	(2+)	3	(33)
				Am	(1×)			Tc	(1×)		
10. AmSu	7	0									
11. Tc AmSu	6	1		Tc	(1×)	1		TcAm	(1×)	1	
12. CmTc AmSu	3	3		Tc	(1×)	1		CmTcAmSu	(1×)	3	
								Am	(1×)		
								Tc	(1×)		
								Am	(1×)		
13. SmCmTc Am	3	1				0				1	
14. Tc Su	3	0									
15. Sm Am	2	0									
16. KnAm	2	0									
17. Sm TcKnAmSu	1	0									
18. Sm TcKnAm	1	0									
19. TcKnAm	1	0									
20. Sm KnAm	1	0									
21. Sm Kn Su	1	0									
21 typ (spektrum)	276	96	(35)			50	(18)			93	(34)

SmTcSu a TcAm (tab. III). Tyto typy vykazovaly transferabilitu 35 až 47 %. Další monorezistentní typ Am se co do frekvence umístil až na šestém místě a vykazoval nízký stupeň transferability (9 %), což bylo způsobeno tím, že u převážné většiny kmenů se jednalo o rezistenci chromozomovou, která má nižší fenotypové vyjádření než plazmidová. Am determinant byl však přenášen také jako součást komplexnějších typů.

Ze dvou nejčastěji se vyskytujících komplexních typů rezistence donorových kmenů, a to SmCmTcAmSu (16) a SmTcAmSu (26 kmenů), byl zaznamenán transfer dvou až čtyř, resp. šesti různých typů plazmidů, většinou jednodušších (tab. III). Transfer homologního typu se u těchto kmenů vyskytl ojediněle, a to pouze u recipienta *E. coli* IHE Nx. Tyto výsledky ukazují, že na úseku prvovýroby masa je z komplexních

IV. Donorové typy rezistence pro jednoduché transferované R plazmidy – The donor types of resistance for simple transferred R plasmids

Transferovaný R plazmid	Recipient <i>E. coli</i> K ₁₂	Počet	Donorový typ	Počet
Tc	185 Nx	25	Tc	11
			Sm Su	8
			Sm Tc	2
			Tc Am	1
			Sm Tc AmSu	1
			Tc AmSu	1
			CmTc AmSu	1
	IHE Nx	47	Tc	28
			Sm Tc Su	10
			Sm Tc	4
			Tc Am	2
			Sm Tc AmSu	1
			Sm Tc Am	1
			CmTc AmSu	1
Am	185 Nx	15	Tc Am	8
			Sm Tc AmSu	3
			SmCmTc AmSu	2
			Am	1
			Sm Tc Am	1
	IHE Nx	14	Tc Am	5
			Sm Tc AmSu	4
			Am	2
			SmCmTc AmSu	1
			SmCmTc Am	1
			CmTc AmSu	1

donorových kmenů transferováno většinou více typů jednodušších, na rozdíl od kmenů humánních, izolovaných z klinického materiálu, kde převládá transfer homologního typu (Bohuš a Kultán, 1975).

Ve spektrech transferujících R plazmidů převládaly u obou recipientů determinanty Tc a Am, z toho ve většině případů jako samostatné markery a jen v 21 až 36 % případů ve více či méně komplexnějších typech. Pouze u recipienta *E. coli* IHE Nx se situace ve výskytu determinantu Am vyvinula ve prospěch komplexnějších typů (58 % proti 42 %).

Dále jsme sledovali donorové typy rezistence pro dva jednoduché R plazmidy (tab. IV). Plazmidy Tc a Am byly transferované ve 40 až 93 % případů ze šesti, resp. čtyř až pěti komplexnějších typů. Tato segregace přispěla k široké paletě spekter rezistence, zjištěné ve všech čtyřech skupinách kmenů.

Pozitivní produkci kolicinů vykázalo plných 20 % R⁺ kmenů *E. coli*. Nejlépe se nám jevil indikátorový kmen ϕ , kmeny ROW a *E. coli* K12 185 byly prokazatelně méně citlivé.

Výsledky naší práce dokazují vysoký podíl plazmidové rezistence na celkové rezistenci kmenů izolovaných v prvovýrobě masa a potravin živočišného původu a dokumentují tak význam velkochovů zvířat jako zdrojů výživy pro lidskou populaci na vzniku a šíření R⁺ kmenů, i když ani podíl zdravotnictví v tomto ohledu, jak dokazují humánní prameny, není zanedbatelný.

Za poskytnutí recipientních kmenů děkujeme RNDr. J. Bohušovi, CSc., z OHES Liptovský Mikuláš a MUDr. F. Výmolovi z IHE Praha, za detekční kmeny ϕ a ROW pro určování kolicinogenity doc. MUDr. J. Šmardovi, CSc., z LF UJEP Brno a za technickou spolupráci s. J. Vyhnálkové a E. Urbanové.

Literatura

- BABCOCK, G. F. — BERRYHILL, D. L. — MARSCH, D. H.: R-factors of *Escherichia coli* from dressed beef and humans. *Appl. Bact.*, 25, 1973, s. 21-23.
- BOHUŠ, J.: A new screening method for proof of R factors transfer. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immun.*, 19, 1974, s. 202-211.
- BOHUŠ, J. — KULTÁN, V.: Sledovanie kmeňov s R plazmidmi v klinických materiáloch, u detí a v prostredí vybraných detských oddelení nemocníc. [Výskumná správa.] Liptovský Mikuláš, OHES 1975.
- COOKE, E. N. — SHOOTER, R. A. — KUMAR, P. J. — ROUSSEAU, S. A.: Hospital food as a possible source of *E. coli* in patients. *Lancet*, II, 1970, s. 436-437.
- COWAN, S. T. — STEEL, K. J.: Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge 1965.
- Instrukce MZVŽ ČSR, č. j. 866/74 ze dne 16. 11. 1974 o používání, distribuci a veterinární kontrole medikovaných krmných přípravků.
- KRČMĚRY, V. — GRUNT, J. — ROSIVAL, L. — VÝMOLA, F.: Nation-wide survey of antibiotic resistance by means of a computer. Analysis of 200 000 strains of problem bacteria isolated in 1973. *Zentbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.*, A, 231, 1975, s. 250-258.
- KRČMĚRY, V. — JANOUSKOVÁ, J. — SEČKÁROVÁ, A.: Prenosná rezistencia na antibiotiká — niektoré aspekty hygieny a prevencie. II. Hygienická problematika R-faktorov. *Čs. Hyg.*, 18, 1973, s. 159-164.
- KRČMĚRY, V. — JANOUSKOVÁ, J. — SEČKÁROVÁ, A.: Prenosná rezistencia na antibiotiká — niektoré aspekty hygieny a prevencie. III. Hygienické problémy mimo-zdravotníckeho používania antibiotík. *Čs. Hyg.*, 18, 1973a, s. 250-256.
- KRČMĚRY, V. — PAČES, V. — RYCHLÍK, I. — EBRINGER, L. — AUGUSTÍN, J.: Antibiotiká. Mechanizmy účinku a rezistencia. Bratislava, ALFA, 1978, 371 s.
- KRČMĚRY, V. — VÝMOLA, F. — VACEK, V.: Rezistencia na antibiotiká v teórii a klinickej praxi. Martin, Osveta 1974, 408 s.

LINTON, A. H.: Antibiotic resistance: The present situation reviewed. *Vet. Rec.*, 100, 1977, s. 354-360.

MOORHOUSE, E. C. — O'GRADY, M. F. — O'CONNOR, H.: Isolation from sausages of antibiotic resistant *E. coli* with R-factors. *Lancet*, II, 1969, s. 50-56.

SASSE-PATZER, B.: Resistenz- und Col-Plasmide bei Enterobacteriaceae aus Fleisch mit Untersuchungen über die Temperaturabhängigkeit von Übertragung und Frequenz der R-Plasmide im Modellversuch. [Inaugural-Dissertation.] Berlin. 1977, 155 s. — FU Berlin.

STANKOVSKÝ, I.: Výskum multirezistentných kmeňov salmonel a podmienené patogénny *Enterobacteriaceae* s R plasmidmi v potravinách živočíšneho pôvodu. [Výskumná správa.] Bratislava, 1976, 65 s. — ÚSVÚ Bratislava.

ÜLGEN, M. T.: Untersuchungen über das Vorkommen antibiotika- und sulfonamid-resistenter Enterobacteriaceae auf Schlachtierkörpern und Fleisch von Schweinen in verschiedenen Be- und Verarbeitungsstufen. [Inaugural-Dissertation.] Berlin. 1976, 173 s. — FU Berlin.

Došlo dne 12. 6. 1979

МАЛИКОВА, М. — МАТИАШ, З. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): Анализ устойчивости и ее трансферабельности в микрофлоре в первичном мясном производстве. *Vet. Med., Praha*, 24, 1979 (10) : 615-622.

У G- штаммов, изолированных в первичном мясном производстве по методу БОГУША (1974), определяли спектры устойчивости и их трансферабельность. Из штаммов 93 % оказались устойчивыми, в том числе 65 % мультирезистентных. Среди устойчивых штаммов 35 % было доноров R плазмидов. Из двух использованных реципиентов значимо лучшим акцептором был лабораторный штамм *E. coli* IHE Nx. Из 21 спектра устойчивости самые частые: Tc, SmTcSu и TcAm. Из 2 самых частых комплексных типов устойчивости доноровых штаммов SmCmTcAmSu и SmTcAmSu отмечен трансфер 2 — 4-х или 6-ти разных типов плазмидов, как правило, упрощенных. В спектрах трансформирующих R плазмидов преобладали детерминанты Tc и Am, в том числе и как самостоятельные маркеры в большинстве случаев, лишь в 21—36 % случаев — в более комплексных типах.

R плазмиды; переносная устойчивость; колициногенность; антибиотики; сульфонамиды; G- микроорганизмы

MALÍKOVÁ, M. — MATYÁŠ, Z. (Veterinary Research Institute, Brno): *Analysis of Resistance and its Transferability in Microflora from Primary Meat Production*. *Vet. Med., Praha*, 24, 1979 (10) : 615-622.

Resistance spectra and their transferability were studied in G- strains isolated from the primary production of meat by the method after Bohuš (1974). Out of the set of strains, 93 % were resistant, and out of these, 65 % were multiresistant. Thirty-five per cent of the resistant strains were R plasmid donors. Of the two recipients, the laboratory strain of *E. coli* IHE Nx was significantly better. Among the 21 determined resistance spectra, the following were the most frequent: Tc, SmTcSu, and TcAm. Transfer of two to four, or even six, different plasmid types, mostly simple, was recorded from the two most frequent complex types of donor strain resistance: SmCmTcAmSu and SmTcAmSu. The determinants Tc and Am prevailed in the spectra of the transferring R plasmids, mostly as separate markers and only in 21 to 36 % of cases in more complex types.

R plasmids; transferable resistance; colicinogenicity; antibiotics; sulphonamides; G-micro-organisms

Adresa autorů:

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

J. Beneš, J. Hrušovský, M. Prokšová

BENEŠ, J. — HRUŠOVSKÝ, J. — PROKŠOVÁ, M. (Vojenský výzkumný veterinární ústav, Praha): *Léčba hospodářských zvířat zasažených alkylfosfáty*. Vet. Med., Praha, 24, 1979 (10) : 623-632.

Sledovali jsme u ovcí možnost terapeutického zásahu po parenterální (intramuskulární) intoxikaci EDMM (0-etyl-S-2-dimetylaminoethylster kyseliny metyltiofosforité) a EDIM (0-etyl-S-2-diisopropylaminoethylster kyseliny metyltiofosforité). Terapie byla v obou případech intoxikace systémem anticholinergikum a reaktivátor cholinesterázy, a to jednorázově, v čase maximálního rozvoje manifestních klinických příznaků otravy a maximální inhibice jak erytrocytární (AChE, E.C.3.1.1.7.), tak plazmatické (BChE, E.C.3.1.1.8.) cholinesterázy. Optimální terapeutický systém vyžaduje aplikaci 20,0 mg atropinu s.c. pro toto a 10,0 mg trimedoximu na kg ž. h. i. v. Uvedený systém byl v obou případech otrav dávkami = LD₅₀ při i. m. bráně vstupu noxy jednoznačně efektivní. Při jednorázovém použití bez ohledu na výši dávek použitých farmak nezaručuje systém přežití po příjmu dávek anticholinesterazik vyšších LD₅₀.

alkylfosfáty; cholinesteráza; ovce

Mezi nejtoxičtější sloučeniny pro savce (včetně člověka) patří nízkomolekulární syntetické sloučeniny, zahrnující alkylfosfáty, karbamáty, bicyklické fosfáty a polyhalogendibenzodioxiny.

V práci srovnáváme možnosti terapeutického zásahu na modelu hospodářského zvířete — ovci — pokusně intramuskulárně intoxikovaného 0-etyl-S-2-dimetylaminoethylsterem kyseliny metyltiofosforité (EDMM) a 0-etyl-S-2-diisopropylaminoethylsterem kyseliny metyltiofosforité (EDIM).

Pro terapeutické zásahy u objektů zasažených EDIM vyplynulo na základě prací Sidella a Groffa (1974), že komplex EDIM-enzym cholinesteráza je reaktivovatelný, poločas ageingu poskytuje dostatečný prostor i pro veterinární terapeutická opatření. Nutnost kombinace anticholinergika a reaktivátoru cholinesterázy je obecně platná i pro případ EDIM.

MATERIÁL A METODY

STANOVENÍ i. m. TOXICITY EDMM, RESP. EDIM

Jak v případě EDMM, tak EDIM jsme postupovali metodou podle Weilové (1952). Použili jsme ovce merino nebo kříženého typu, vesměs samičího pohlaví,

živá hmotnost se pohybovala mezi 30 až 50 kg. LD₅₀ (2 h) pro EDMM, stanovená celkem na 24 ovcích (čtyři skupiny po šesti jedincích), měla hodnotu 8,35 (7,03–9,95) $\mu\text{g kg}^{-1}$ ž. h., pro EDIM na stejném počtu experimentálních zvířat má i. m. LD₅₀ (2 h) hodnotu 8,66 (7,68–9,75) $\mu\text{g kg}^{-1}$ ž. h. (Beneš aj., 1978). Zjištěné LD₅₀ pro obě noxy byly aplikovány pokusným zvířatům pro vlastní terapeutické pokusy.

TERAPEUTICKÝ SYSTÉM

Zásadou praktikovanou při terapeutickém zásahu u ovcí intoxikovaných jak EDMM (Beneš aj., 1976), tak EDIM, byla aplikace antidot v maximálním stadiu rozvoje klinických příznaků intoxikace (vystupňované jak muskarinové, tak nikotinové příznaky). Jako antidot bylo použito z anticholinergik atropinu, a to jednak ve směsi TMB-4 compos. Spofa (odpovídající dávka 0,08 mg kg^{-1} ž. h. i. v.), dále 1,10% atropin Spofa *ad usum veter.* (vesměs 20,0 mg *pro toto s. c.*). Z reaktivátorů cholinesterázy byl v našich technických uspořádáních pokusů používán trimedoxim, a to v dávce 10,0 mg kg^{-1} ž. h. i. v. (TMB-4 compos. Spofa).

STANOVENÍ AKTIVITY CHOLINESTERÁZY

Krev pro stanovení erytrocytární acetylcholinesterázy (AChE, E.C.3.1.1.7.) a plazmatické butyrylcholinesterázy (BChE, E.C.3.1.1.8.) jsme odebírali z v. *jugularis* v intervalech těsně před aplikací noxy (C) a dále za 15 minut, těsně před terapií (60. minuta při intoxikaci EDMM, 30. minuta při intoxikaci EDIM), potom za 15 minut po léčbě (tzn. v 75. minutě u EDMM, ve 45. minutě u EDIM); další časové intervaly, ve kterých jsme sledovali aktivity AChE a BChE, byly 90, 120 minut, 4, 6, 24, 48, 72 hodiny, 7., 14., 21., 28., event. 35. den po otravě a léčbě.

Aktivita erytrocytární acetylcholinesterázy (AChE) i plazmatické butyrylcholinesterázy (BChE) byla stanovována, zejména pro srovnatelnost s našimi dřívějšími výsledky (Beneš aj., 1976), z nichž jsme bezprostředně vycházeli, metodou podle Tulacha (1958) s tím rozdílem, že jsme plazmu ředili v poměru 1 : 2 0,8% chlořidem sodným, erytrocytární suspenzi v poměru 1 : 5 0,01% čerstvým roztokem saponinu. Inkubační doba trvala 30 minut při teplotě 37 °C v Dubnoffově shakeru (60 kyvů za min.). Aktivitu enzymů jsme vyjadřovali v μMol hydrolyzovaného substrátu za 30 minut při teplotě 37 °C na ml plazmy, resp. erytrocytů.

U všech experimentálních ovcí jsme sledovali klinický průběh otravy a léčby.

Výsledky jsme statisticky vyhodnocovali Studentovým *t*-testem.

VÝSLEDKY

Doba latence po intoxikaci i. m. LD₅₀ EDMM (8,35 μg noxy na kg ž. h.) se pohybovala mezi 30 až 40 minutami. Klinické příznaky se po uplynutí doby latence projevovaly mezi 40. až 60. minutou po aplikaci noxy serózní salivací, tremorem svalových partií v kaudálních oblastech s postupným přechodem na veškeré svalové partie, zvýšenou tepovou i dechovou frekvencí; za 60 minut po aplikaci se ovce vesměs neudržely na vlastních nohou, zachvacovaly je tonicko-klonické křeče; ihned po odběru krve pro stanovení aktivity AChE a BChE jsme intravenózně aplikovali antinodum; téměř ihned po dostříknutí TMB-4 compos. Spofa došlo k relaxaci spasmů, k úpravě tepové i dechové frekvence, za 75 až 90 minut stála pokusná zvířata opět na vlastních nohou. Do šesti hodin již nebyly klinické příznaky otravy zřejmé, u ovcí se projevovala běžná chuť k žrádlu.

U skupiny tří paralelně intoxikovaných, ale neléčených ovcí došlo k maximálnímu rozvoji nikotinových příznaků mezi 90. až 120. minutou po otravě, příznaky doznívaly mezi 6. až 12. hodinou. Jedna ovce exitovala za sedm hodin po aplikaci noxy, patologicko-anatomický obraz byl

I. Vliv *i. v.* podaného TMB-4 compos. SPOFA na aktivitu erytrocytární AChE (E.C. 3.1.1.7.) u ovcí intoxikovaných *i. m.* LD₅₀ EDMM — The effect of intravenously administered TMB-4 compos. SPOFA on the activity of erythrocytic AChE (E.C.3.1.1.7.) on sheep intoxicated intramuscularly with LD₅₀ of EDMM

Interval	AChE ($\bar{x}$)	$\pm$ S. D.	<i>p</i>	<i>n</i>
C	29,13	0,41	—	6
15 min.	6,97	1,70	<0,001	6
30	3,48	0,60	0,001	6
60	3,13	0,52	0,001	6
75 min. (léc.)	26,27	2,10	0,001	6
75 (neléc.)	2,09	1,01	—	3
90 (léc.)	26,24	2,20	0,001	6
90 (neléc.)	4,22	0,95	—	3
120 (léc.)	27,17	1,65	0,001	6
120 (neléc.)	5,69	1,60	—	3
6 hod. (léc.)	27,35	1,72	0,001	6
6 (neléc.)	6,21	1,65	—	3
24 (léc.)	28,70	0,52	0,05	6
24 (neléc.)	24,00	—	—	2
48 (léc.)	28,36	0,10	—	6
48 (neléc.)	27,30	—	—	2
72 (léc.)	29,25	0,10	—	6
72 (neléc.)	28,53	—	—	2

Poznámka: aktivita AChE vesměs uvedena v π Mol za 30 min. při teplotě 37 °C ml⁻¹

$\pm$ S. D. — standardní odchylka

n — počet použitých zvířat

vysloveně bionegativní. Za 24 hodiny po intoxikaci byly klinické parametry u zbývajících neléčených ovcí na fyziologické hladině.

Statistické vyhodnocení aktivit sledovaných enzymů po LD₅₀ EDMM *i. m.* je zachyceno v tab. I a II, grafické vyjádření anticholinergní a reaktivací schopnosti TMB-4 compos. Spofa uvádí obr. 1.

Inhibice obou enzymů do aplikace antidotní směsi se projevuje již za 15 minut po aplikaci anticholinesterasika ($p < 0,001$, 76% inhibice). V době intravenózního podání TMB-4 compos. jsou jak AChE, tak BChE inhibovány asi z 89 % (vesměs $p < 0,001$). Za 75 minut po intoxikaci (15 minut po podání antidota) je u léčených ovcí pouze 9,5% inhibice AChE, BChE je ještě z cca 31 % inhibována.

Ve srovnání s neléčenými ovcemi jsou tyto hodnoty vysoce signifikantní ($p < 0,001$). Signifikantní difference mezi léčenými a neléčenými ovcemi přetrvává 24. hodinu ($p < 0,05$ —0,001). Za 48 hodin lze hovořit o vyrovnání aktivit u obou skupin sledovaných ovcí, i když BChE je ještě z cca 30 % inhibována v obou případech, AChE pouze z cca 2,5 % rovněž v obou případech.

Aktivita plazmatického enzymu se u léčených i neléčených ovcí neupravuje ani po 72 hodinách, zatímco jak přirozená, tak terapeuticky ovlivněná reaktivace acetylcholinesterázy je téměř úplná.

Latence po intoxikaci *i. m.* LD₅₀ EDIM trvala průměrně 25 minut, potom prudce nastupovaly muskarinové a v těsné návaznosti nikotinové

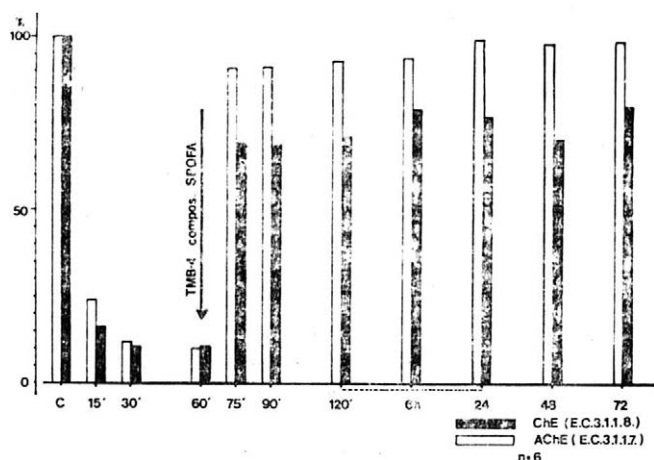
II. Vliv *i. v.* podaného TMB-4 compos. SPOFA na aktivitu plazmatické BChE (E.C. 3.1.1.8.) u ovcí intoxikovaných *i. m.* LD₅₀ EDMM — The effect of intravenously administered TMB-4 compos. SPOFA on the activity of plasma BChE (E.C.3.1.1.8.) in sheep intoxicated intramuscularly with LD₅₀ of EDMM

Interval	BChE ($\bar{x}$)	$\pm$ S. D.	<i>p</i>	<i>n</i>
C	6,796	0,36	—	6
15 min.	1,108	0,24	<0,001	6
30	0,713	0,26	0,001	6
60	0,792	0,17	0,001	6
75 min. (lěč.)	4,683	0,47	0,001	6
75 (nelěč.)	0,170	0,09	—	3
90 (lěč.)	4,610	0,41	0,001	6
90 (nelěč.)	0,583	0,34	—	3
120 (lěč.)	4,816	0,37	0,001	6
120 (nelěč.)	0,486	0,36	—	3
6 hod. (lěč.)	5,325	0,37	0,001	6
6 (nelěč.)	0,486	0,36	—	3
24 (lěč.)	5,156	0,14	0,05	6
24 (nelěč.)	2,765	—	—	2
48 (lěč.)	4,740	0,17	—	6
48 (nelěč.)	4,000	—	—	2
72 (lěč.)	5,340	0,36	—	6
72 (nelěč.)	5,675	—	—	2

Poznámka: aktivita BChE vesměs uvedena v μ Mol za 30 min. při teplotě 37 °C ml⁻¹

$\pm$ S. D. — standardní odchylka

n — počet použitých zvířat



1. Reaktivací účinek *i. v.* podaného TMB-4 compos. SPOFA (10,0 mg kg⁻¹ *ž. v.*) u ovcí intoxikovaných *i. m.* EDMM (LD₅₀ na kg *ž. h.*) — The reactivating action of intravenously administered TMB-4 compos. SPOFA (10,0 mg per kg l. w.) in sheep intoxicated intramuscularly with EDMM (LD₅₀ per kg l. w.)

príznaky. Léčbu jsme zásadně zaváděli v době maximálního rozvoje klinických příznaků, tzn. ve 30. minutě, kdy byl průběh otravy z prognostického hlediska vysloveně nepříznivý. Ovce vesměs ležely, měly těžké tonicko-klonické křeče, zcela povrchní dech, maximálně vystupňované všechny charakteristické muskarinové příznaky. Po terapii se za tři až pět minut jednoznačně prohluboval dech, po deseti až patnácti minutách do

cházel k výrazným projevům atropinizace (mydriasis, paralýza salivace), po 15 minutách ovce reagovaly na zevní podněty, nejpozději za 30 minut byly s to udržet se na vlastních nohách. Mezi 120. minutou až čtvrtou hodinou po otravě a léčbě byla značně alternována dechová i tepová frekvence (hyperpnoe, tachykardie), persistovaly třesy, po šesti hodinách u šesti kusů i tyto příznaky postupně mizely, za 24 hodiny byla u dvou z osmi pokusných zvířat pozorována inapetence a zvýšená reaktivita, ostatních šest pokusných kusů nevykazovalo v tomto časovém intervalu po otravě a léčbě zjevné klinické změny.

III. Aktivita erytrocytární acetylcholinesterázy (AChE, E.C.3.1.1.7.) u ovcí *i. m.* intoxikovaných EDIM v dávce = LD₅₀ a paralelně léčených směsí trimedoximu a atropinu (TMB-4 v dávce 10,0 mg kg⁻¹ ž. h. *i. v.*, atropin 0,08 mg kg⁻¹ ž. h. *i. v.* + 20,0 mg s. c. *pro toto*) v intervalu 30 minut po otravě — The activity of erythrocytic acetyl cholinesterase (AChE, E.C.3.1.1.7.) in sheep intoxicated intramuscularly with EDIM at a dose = LD₅₀ and parallelly treated with a mixture of trimedoxim and atropine (TMB-4 at a dose of 10.0 mg per kg l. w. *i. v.*, atropine 0.08 mg per kg l. w. *i. v.* + 20.0 s. c. *pro toto*) within a 30-minute interval after poisoning

Interval	AChE ($\bar{x}$)	$\pm$ S. D.	<i>p</i>	<i>n</i>
C	28,251	0,439	—	8
15 min.	5,255	1,005	<0,001	8
30	3,248	0,198	0,001	8
Terapie				
45 min.	22,708	1,258	0,001	8
60	20,358	0,950	0,001	8
90	14,663	1,510	0,001	8
120	12,697	1,430	0,001	8
4 hod.	11,444	1,285	0,001	8
6	10,240	1,796	0,001	8
24	10,122	1,730	0,001	8
48	7,348	2,356	0,001	8
72	9,001	2,292	0,001	8
7. den	14,048	1,787	0,001	8
14.	16,950	1,082	0,001	8
21.	22,653	1,609	0,010	8
28.	26,631	1,321	—	8
35.	28,245	1,162	—	4

Poznámka: aktivita AChE vesměs uvedena v μ Mol za 30 min při teplotě 37 °C ml⁻¹

$\pm$ S. D. — standardní odchylka

n — počet použitých zvířat

Statistické vyhodnocení aktivit obou enzymů po LD₅₀ EDIM *i. m.* je uvedeno v tab. III a IV, procento inhibice AChE a BChE demonstruje obr. 2.

Již za 15 minut, tedy ještě ve stadiu latence, reprezentuje inhibice AChE 81 % ($p < 0,01$), BChE 86 % ($p < 0,001$), v době maximálního rozvoje příznaků otravy pak tyto hodnoty se ještě zvyšují, a to u AChE na 88 %, u plazmatického enzymu rovněž ($p < 0,0001$).

Po terapii námi uvedeným systémem se již za 15 minut snížila inhibice erytrocytárního enzymu na 19,6 %, u BChE se reaktivační efekt podaného oximu projevil snížením inhibice na 53 %, což znamená 68%,

IV. Aktivita plazmatické butyrylcholinesterázy (BChE, E.C.3.1.1.8.) u ovcí i. m. intoxikovaných EDIM v dávce = LD₅₀ a paralelně léčených směsí trimedoximu a atropinu (TMB-4 v dávce 10,0 mg kg⁻¹ ž. h. i. v., atropin 0,08 mg kg⁻¹ ž. h. i. v. + 20,0 mg 1,1% atropinu s. c. pro toto) v intervalu 30 minut po otravě — The activity of plasma butyryl cholinesterase (BChE, E.C.3.1.1.8.) in sheep intoxicated intramuscularly with EDIM at a dose = LD₅₀ and parallelly treated with a mixture of trimedoxim and atropine (TMB-4 at a dose of 10.0 mg per kg l. w. i. v., atropine 0.08 mg per kg l. w. i. v. + 20.0 mg 1.1% atropine s. c. pro toto) in an interval of 30 minutes after intoxication

Interval	BChE ($\bar{x}$)	$\pm$ S. D.	<i>p</i>	<i>n</i>
C	5,533	0,354	—	8
15 min.	0,886	0,183	<0,001	8
30	0,676	0,184	0,001	8
Terapie				
45 min.	2,613	0,583	0,001	8
60	2,247	0,553	0,001	8
90	1,503	0,249	0,001	8
120	1,067	0,190	0,001	8
4 hod.	1,076	0,161	0,001	8
6	1,238	0,230	0,001	8
24	1,819	0,239	0,001	8
48	1,605	0,272	0,001	8
72	1,860	0,335	0,001	8
7. den	3,106	0,345	0,001	8
14.	3,817	0,205	0,001	8
21.	4,196	0,301	0,01	8
28.	5,298	0,237	—	8
35.	5,757	0,547	—	4

Poznámka: aktivita BChE vesměs uvedena v μ Mol za 30 min. při teplotě 37 °C m⁻¹

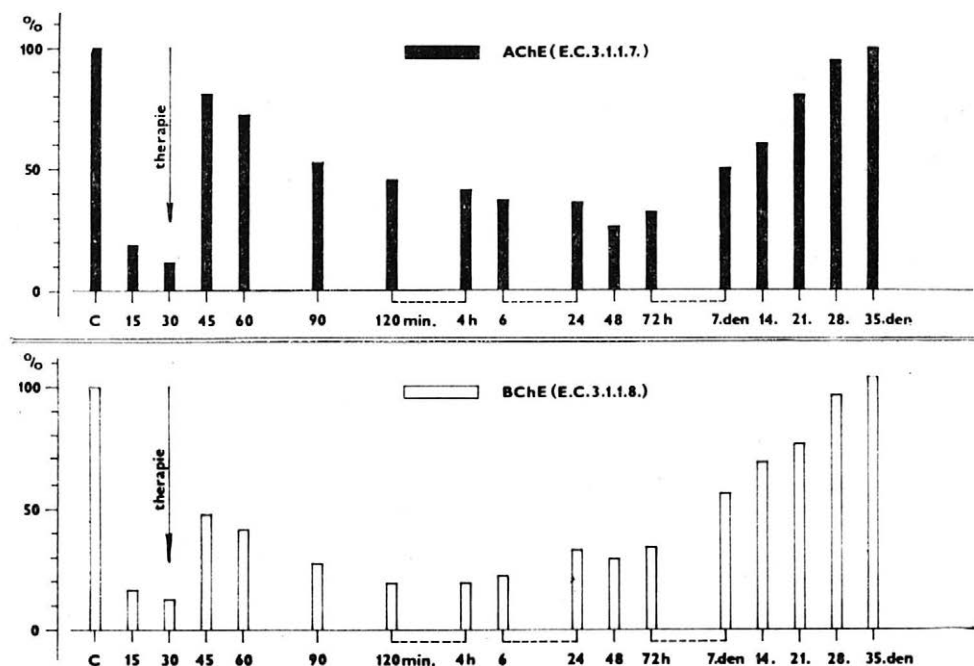
$\pm$ S. D. — standardní odchylka

n — počet použitých zvířat

resp. 35% efekt. Vzápětí ovšem, díky relativně nízké účinné hladině antidota, resp. jeho rychlé eliminaci při současně vysoké účinné hladině anticholinesterázové noxy, dochází k reinhibici obou enzymů, když za 60 minut po otravě (tedy 30 minut po léčbě) je inhibice AChE = 22 %, BChE = 59,4 % (vesměs $p < 0,001$). Tato reinhibiční maxima ani v jednom případě nekorespondovala s klinickými příznaky intoxikace. Od 72. hodiny je u obou cholinesteráz zcela evidentní trend k přirozené obnově aktivity, ovšem ještě 21. den po otravě a léčbě je v obou případech statisticky významná inhibice (AChE 19,2 %, $p < 0,01$, BChE 24,2 %, $p < 0,01$). K úplnému obnovení normálního zdravotního stavu dochází jak u AChE, tak BChE až 26. den po intoxikaci a terapii.

DISKUSE

Doba latence při parenterální intoxikaci EDIM v našem technickém uspořádání pokusů se pohybovala v závislosti od výše použité dávky mezi 20 až 80 minutami. Při stejné bráně vstupu u EDIM činil tento interval na stejném experimentálním modelu — ovci — 15 až 50 minut.



2. Reaktivací účinek *i. v.* podaného TMB-4 compos. SPOFA (10,0 mg kg⁻¹ ž. h.) u ovčí intoxikovaných *i. m.* EDIM (LD₅₀ na kg ž. h.) — The reactivating action of intravenously administered TMB-4 compos. SPOFA (10,0 mg per kg l. w.) in sheep intoxicated intramuscularly with EDIM (LD₅₀ per kg l. w.)

Klinické projevy intoxikace EDIM u neléčených ovčí se stoupající dávkovou intenzitou noxy nabývaly na výraznosti, a to zejména muskarinové příznaky, méně již příznaky nikotinové. Na rozdíl od intoxikace EDIM nebyla z muskarinových příznaků tak markantní seromucinózní salivace, na druhé straně byly ve fázi muskarin-like příznaků dominantní u EDIM dechové obtíže, především těžký, úporný bronchospasmus. Rovněž miose byla u menších dávek EDIM patrná — na rozdíl od intoxikace EDMM. K a m p e n aj. (1969) tuto skutečnost sice u EDIM neuvádějí; my jsme však stejně jako tyto autoři u otrávených ovčí vyššími dávkami EDIM registrovali neobvyklou flexi krční svaloviny. Přechod z muskarinových do nikotinových příznaků byl u vyšších dávek EDIM velmi prudký, výraznost tonicko-klonických křečí zdaleka nebyla tak typická jako v případě otravy EDMM. Stejně jako byl prudký nástup manifestních příznaků intoxikace EDIM, tak rychlé bylo i jejich odeznívání. Zejména prudký nástup příznaků otravy pak značně komplikoval terapeutický zákrok, vždyť ve dvou případech intoxikace EDIM byly pokusné objekty již v apnoické fázi.

Na základě srovnání hodnot *i. m.* LD₅₀ jak pro EDMM, tak EDIM na modelu ovce lze konstatovat, že není tedy diametrální rozdíl při intramuskulární bráně vstupu obou anticholinesterazik v toxicitě (EDMM 8,35, EDIM 8,66 μg kg⁻¹ ž. h.).

Příčiny exitu u ovčí otrávených jak EDMM, tak EDIM v souvislosti se stanovováním LD₅₀ (2h, *i. m.*) byly dány těmito faktory: bronchospasmus, zvýšená bronchiální sekrece, obrna bránice a ostatní svaloviny partici-

pující v procesu expiraria, resp. inspiraria, jakož i ochrnutí dechového centra v *medulla oblongata*. Podle očekávání byl u obou látek patologicko-anatomický obraz vysloveně bionegativní.

Z klinicko-diagnostických testů při intoxikacích anticholinesterázovými látkami má prioritní význam stanovení aktivit erytrocytární (AChE, E.C.3.1.1.7.) a plazmatické (BChE, E.C.3.1.1.8.) cholinesterázy. Stanovení aktivity AChE je jistě specifitější testem při těchto otravách než depistáž BChE, jejíž aktivita může být ovlivňována m. j. hepatitidami nej-různější etiologie (např. u ovcí i na parazitární bázi), cirrhotickými stavy, mnoha účinnými chemikáliemi ap. Nepotvrdili jsme však názor Sidella a Groffa (1974), že EDIM inhibuje především AChE a pouze z 20 % BChE. Pokusy na více než 80 ovcích jednoznačně potvrdily, jak významné je z klinicko-diagnostického hlediska stanovení aktivit obou cholinesteráz. Test hraje významnou roli: je možné podle něj zaujmout veterinárně hygienické stanovisko (Beneš aj., 1973) a určuje aktuálnost veterinárně terapeutického opatření (Beneš aj., 1975, 1976, 1978). Svůj význam má nesporně i pro veterinárně asanační opatření, zejména pro technologii zpracování kadaverů uhynulých zvířat při intoxikacích anticholinesterázovými látkami obecně a EDMM, resp. EDIM zvláště, stejně jako pro eventuální zpracování konfiskátů potravin a krmiv jak vegetabilního, tak živočišného původu vesměs kontaminovaných uvedenými noxami.

Jako anticholinergikum jsme v našich pokusech použili pouze atropin, a to jednak ve směsi TMB-4 compos. Spofa, dávka 0,08 mg kg⁻¹ ž. h. i. v., jednak jako 1,1% atropin *ad usum veter.* Spofa v dávce 20,0 mg *pro toto s. c.* Z reaktivátorů jsme použili pouze trimedoxim (ve směsi TMB-4 compos. Spofa), v dávkách 10,0 mg kg⁻¹ ž. h. i. v.

Problém, kdy aplikovat antidota, neoddělitelně souvisí s poločasem dealkylace (ageingu), závislým jednak na chemické struktuře anticholinesterázové noxy, jednak na době jejího kontaktu s acetylcholinesterázou. Zatímco poločas dealkylace u EDMM byl téměř neomezený, resp. látka nedealkylovala nebo dealkylovala zcela pomínutelně, u EDIM jej lze podle Sidella a Groffa (1974) vymezit intervalem 24 až 48 hodin. V tomto období je dostatečný prostor i pro veterinární zákrok, komplex enzym-noxa, i když možná jenom částečně (20% nikoliv?) je reaktivovatelný. Tuto možnost naše pokusy s použitím LD₅₀ EDIM na kg ž. h. i. m. částečně naznačují. Náš terapeutický zákrok v tomto stadiu pokusů byl jednoznačně motivován snahou uskutečnit jej tehdy, kdy lze podle třídících kritérií formu otravy označit jako těžkou s infaustní prognózou. Klinický efekt terapie atropinem a trimedoximem byl vcelku jednoznačně úspěšný, efektivnost léčby je sice okamžitá, ovšem krátkodobé působení, byť zaručující přežití (výraznější rozhodně u EDIM než u EDMM), nasvědčuje, že použité dávky reaktivátoru zajišťují nízkou a krátkodobou účinnou hladinu. Na této skutečnosti se nejspíše rovným dílem podílí jednak vysoce účinná a persistující hladina noxy (zejména EDIM), jednak rychlá eliminace trimedoximu. Je evidentní, že prověření těchto skutečností musí být předmětem dalších výzkumů.

V souvislosti s frekvencí podávání antidot lze polemizovat s názorem Sidella a Groffa (1974) o postačujícím jednorázovém zákroku při intoxikacích EDIM. Naše pokusy na úrovni LD₅₀ naznačily, že pokud nebude k dispozici protijed depotního charakteru, bude rozhodně

výhodnější opakovaná terapie, zvyšující procento přežití a přitom neohrožující a nekomplikující vlastní restituční proces. U dávek noxy (jak EDMM, tak EDIM) vyšších LD₅₀ je opakovaná terapie bezpodmínečnou nutností.

Otázka výše dávky použitého antidota, zejména reaktivátoru, se podle našich zkušeností ukazuje být komplikujícím faktorem pouze u jiných reaktivátorů než je trimedoxim (Beneš aj., 1978).

Literatura

- BENEŠ, J. — PROKŠOVÁ, M. — HRUŠOVSKÝ, J.: [Závěrečná zpráva.] Praha, Vojenský výzkumný veterinární ústav 1973.
BENEŠ, J. — PROKŠOVÁ, M. — HRUŠOVSKÝ, J.: [Závěrečná zpráva.] Praha, Vojenský výzkumný veterinární ústav 1975.
BENEŠ, J. — PROKŠOVÁ, M. — HRUŠOVSKÝ, J.: Antidotní efekt TMB-4 compos. SPOFA u ovcí intoxikovaných 0-etyl-S-2 (dimethylaminoetyl) methylfosfonothioátem. Vet. Med., Praha, 21, 1976, s. 237-250.
BENEŠ, J. — PROKŠOVÁ, M. — HRUŠOVSKÝ, J.: [Závěrečná zpráva.] Praha, Vojenský výzkumný veterinární ústav 1978.
SIDELL, F. R. — GROFF, W. A.: The reactivability of cholinesterase inhibited by VX and sarin in man. Toxic. appl. Pharmac., 27, 1974, s. 241-253.
TULACH, J.: Kolorimetrické stanovení cholinesterasy v lidské krvi. Voj. Zdrav. listy, XXVII, 1958, s. 513-515.
VAN KAMPEN, K. R. — JAMES, L. F. — RASMUSSEN, J. — HUFFAKER, R. — FAWCETT, M. O.: Organic phosphate poisoning of sheep in Skull Valley, Utah. J. Am. vet. med. Ass., 154, 1969, s. 623-630.
WEIL, C. S.: Tables convenient for calculation of median effective dose (LD₅₀ or ED₅₀) and instructions in their use. Biometrics, 8, 1952, s. 249-263.

Došlo dne 28. 6. 1978

БЕНЕШ, Й. — ГРУШОВСКИ, Й. — ПРОКШОВА, М. (Военный ветеринарный научно-исследовательский институт, Прага): Лечение сельскохозяйственных животных, пораженных алкилфосфатами. Vet. Med., Praha, 24, 1979 (10) : 623-632.

У овец изучали возможность терапевтического вмешательства после парентеральной (внутримышечной) интоксикации (О-этил-S-2-диметиламиноэфир метилтиофосфористой кислоты) и EDIM (О-этил-S-2-диизопропиламиноэфир метилфосфористой кислоты). Терапия в обоих случаях интоксикации была системой анхолинэргиком и реактиватор холинэстеразы, причем одноразово, в период максимального развития манифестных клинических признаков отравления и максимального торможения как эритроцитной (AChE, E.C.3.1.1.7.), так и плазматической (BChE, E.C.3.1.1.8) холинэстераз. Оптимальная терапевтическая система требует применения 20,0 мг атропина в общем подкожно и 10,0 мг тримедоксина внутривенно на 1 кг живого веса. Приведенная система в обоих случаях отравлений дозами = LD₅₀ при внутримышечном введении патогена оказалась однозначно эффективной. При одноразовом использовании без учета размера доз примененных лекарств система не гарантирует выживание после приема доз антихолинэстеразы, больше LD₅₀.

алкилфосфаты; холинэстераза; овца

BENEŠ, J. — HRUŠOVSKÝ, M. — PROKŠOVÁ, M. (Military Veterinary Research Institute, Praha): The Therapy of Farm Animals Affected by Alkylphosphates. Vet. Med., Praha, 24, 1979 (10) : 623-632.

Sheep were studied for the possibility of treatment after parenteral (intramuscular) intoxication with EDMM (methylthiophosphorous acid 0-ethyl-S-2-dimethylamino-

ethylester) and with EDIM (methylthiophosphorous acid 0-ethyl-S-2-diisopropylaminoethylester). In both cases of intoxication, the therapy was based on a system of an anticholinergic and cholinesterase reactivator administered singly at a time of the maximum development of the clinical signs of poisoning and maximum inhibition of both erythrocytic (AChE, E.C.3.1.1.7.) and plasma (BChE, E.C.3.1.1.8.) cholinesterase. The optimum therapeutic system requires the administration of 20.0 mg atropine s. c. *pro toto* and 10.0 mg trimedoxim per kg l. w. i. v. In both cases of poisoning with doses = LD₅₀ in i. m. administration, the mentioned system was actually positive. In a single administration irrespective of the doses of the used drugs, the system does not guarantee survival after ingestion of anticholinesterasic doses above LD₅₀.

alkylphosphates; cholinesterase; sheep

BENEŠ, J. — HRUŠOVSKÝ, J. — PROKŠOVÁ, M. (Veterináre Militärforschungsanstalt, Praha): *Therapie der mit Alkylphosphaten intoxicierten landwirtschaftlichen Nutztiere*. Vet. Med., Praha, 24, 1979 (10) : 623-632.

Wir untersuchten bei Schafen die Möglichkeit eines therapeutischen Eingriffs nach parenteraler (intramuskulärer) EDMM-Intoxikation (0-Äthyl-S-2-Dimethylaminoäthylester der Methylthiophosphorigen Säure), sowie EDIM-Intoxikation (0-Äthyl-S-2-Diisopropylaminoäthylester der Methylthiophosphorigen Säure). In beiden Intoxikationsfällen bestand die Therapie in einem System des Anticholinergikums und Cholinesterase-Reaktivators, und zwar einmalig in der Zeitperiode der maximalen Entwicklung der manifestierenden klinischen Vergiftungssymptome und der maximalen sowohl erythrozytären (AChE, E.C.3.1.1.7.), als auch plasmatischen (BChE, E.C.3.1.1.8.) Cholinesterase-Inhibition. Das optimale therapeutische System erfordert eine Applikation von 20,0 mg Atropin s. c. *pro toto* und 10,0 mg Trimedoxim je kg Lebendmasse i. v. Das angeführte System war in beiden Intoxikationsfällen mit Dosen von LD₅₀ bei i. m. Eindringen der Noxe eindeutig effektiv. Bei einmaliger Anwendung sichert das System ohne Rücksicht auf die Höhe der benutzten Pharmaka-Dosen das Überleben nach Aufnahme der höheren LD₅₀-Dosen der Anticholinesterasika nicht.

Alkylphosphate; Cholinesterase; Schafe

Adresa autorů:

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

O. Ditrich, M. Otčenášek, M. Veselský, P. Koubek

DITRICH, O. — OTČENÁŠEK, M. — VESELSKÝ, M. — KOUBEK, P. (Parazitologický ústav ČSAV, Praha; Státní veterinární ústav, Pardubice; Přírodovědecká fakulta UJEP, Brno): *Diseminovaná aspergilóza potáplíce*. Vet. Med., Praha, 24, 1979 (10) : 633-639.

Autoři popisují případ generalizované mykózy potáplíce druhu *Gavia arctica*, vyvolané houbou *Aspergillus fumigatus*. Rozsah postižení vedl zcela nepochybně k smrti ptáka. Podrobně uvádějí mykologickou charakteristiku invadujícího agens a popis histopatologických změn v primárně postiženém orgánu — v plících. V práci je dále uveden přehled řádů volně žijících ptáků i ptáků chovaných v zajetí, u kterých byla dosud diagnostikována aspergilóza.

potáplíce; aspergilóza; *Aspergillus fumigatus*

Aspergilóza dýchacích orgánů je poměrně častým onemocněním ptáků, rozšířeným kosmopolitně. Největší množství literárních údajů se týká aspergilózy vodních ptáků. Zinkl aj. (1977) se domnívají, že tento stav je pouze odrazem skutečnosti, že je více příležitostí k vyšetřování vodních ptáků jakožto lovné zvěře. Beer (1963) shrnuje práce různých autorů a uvádí přehled mykologického vyšetření více než 14 000 pitvaných ptáků volně žijících i chovaných v zajetí. Na základě tohoto přehledu lze usuzovat, že aspergilózou jsou přece jen postihováni převážně vodní ptáci řádů *Sphenisciformes*, *Anseriformes* a *Charadriiformes*.

Spektrum ptačích druhů, u kterých byla aspergilóza prokázána, je značně široké. Dosavadní údaje shrnujeme v přehledu, uspořádaném podle ptačích řádů: *Struthioniformes* (Olson, 1969), *Rheiformes* (Saëz, 1965), *Podicipediformes* (Saëz, 1965), *Sphenisciformes* (Campebell, 1972; Finnes, 1962; Khan aj., 1977; Saëz, 1965, 1966; Olson, 1969), *Pelecaniformes* (Saëz, 1965), *Phoenicopteriformes* (Olson, 1969; Saëz, 1965, 1966), *Anseriformes* (Beer, 1963; Eisengarten aj., 1977; Hubben, 1958; Kardeván a Palyusik, 1967; Keymer, 1958; Olson, 1969; Palyusik a Kardeván, 1967; Saëz, 1965, 1966; Traore a Gidel, 1966), *Falconiformes* (Keymer, 1958), *Galliformes* (Fragner aj., 1974, 1975; Hubben, 1958; Keymer, 1958; Knudson a Meinecke, 1972; Olson, 1969), *Gruiformes* (Saëz, 1966), *Charadriiformes* (Beer, 1963; Davis a Coclung, 1940; Poulding, 1952; Jennings a Soulsby, 1958; Mc Diarmid, 1955; Olson, 1969), *Columbiformes* (Mc Diarmid, 1955; Olson, 1969), *Psittaciformes* (Eisengarten aj., 1977; Kaplan aj., 1975), *Strigiformes* (Wobeser a Saunders, 1975), *Passeriformes* (Clark, 1960; Ei-

sengarten aj., 1977; Keymer, 1958; Mc Diarmid, 1955; Olson, 1969; Zinkl aj., 1977).

Značná část těchto údajů popisuje aspergilózu domestikovaných ptáků (kuřata, kachňata, krocani) a ptáků chovaných v zajetí (papoušci, kanáři, exotičtí ptáci v zoo). V těchto případech může dojít k decimování chovů drůbeže (Fragner aj., 1975; Kardeván a Palyusik, 1967; Palyusik a Kardeván, 1967; Traore a Gidel, 1966) nebo importovaných exotických ptáků (Campebell, 1972; Finnes, 1962; Kaplan aj., 1975; Khan aj., 1977). Je popisován i případ, kdy aspergilózou uhynuli ptáci vystavení na výstavě exotického ptactva (Eisen-garten aj., 1977). Ve volné přírodě se vyskytují pouze izolované případy onemocnění aspergilózou, výjimečně jsou však popisovány i enzoocie (Zinkl aj., 1977; *Corvus brachyrhynchos*) či epizooocie (Mc Dougle a Vaught, 1968; *Branta canadensis*).

V převážné většině případů je etiologickým agens ptačí aspergilózy *Aspergillus fumigatus*. V daleko menší míře se uplatňují i jiné druhy aspergilů: *A. flavus* (Fragner aj., 1974; Kardeván a Palyusik, 1967; Knudson a Meinecke, 1972; Saěz, 1965), *A. nidulans* (Mc Diarmid, 1955; Saěz, 1965, 1966), *A. niger* (Wobeser a Saunders, 1975), *A. oryzae* (Kaplan aj., 1975), *A. candidus* (Saěz, 1965).

Aspergillus zachvacuje buď pouze dýchací orgány, ve kterých vyvolává granulomatózní zánětlivé změny, nebo se mykotické agens diseminuje i do jiných orgánů. Touto cestou bývá často zasažen i mozek nemocného ptáka (Fragner aj., 1975; Hubben, 1958).

MATERIÁL A METODA

20. listopadu 1977 byla na břehu Vranovské přehrady nalezena juvenilní samice potáplice severní – *Gavia arctica* (L.). Pohybovala se malátně, těžce dýchala a nebyla schopna letu. Záhy po nálezu uhynula.

Materiál získaný pitvou ptáka byl zpracován následovně: Excize plic byly fixovány v 10% formolu a zpracovány běžnou parafinovou technikou. Histologické řezy byly barveny hematoxylin-eosinem a podle Grocotta. Vzorky postižené tkáně byly přímo inokulovány na Sabouraudův dextrózový agar a kultivovány při teplotě 27 °C.

VÝSLEDKY

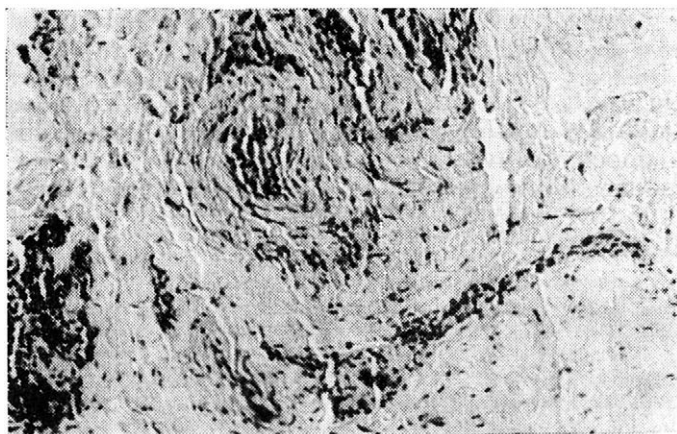
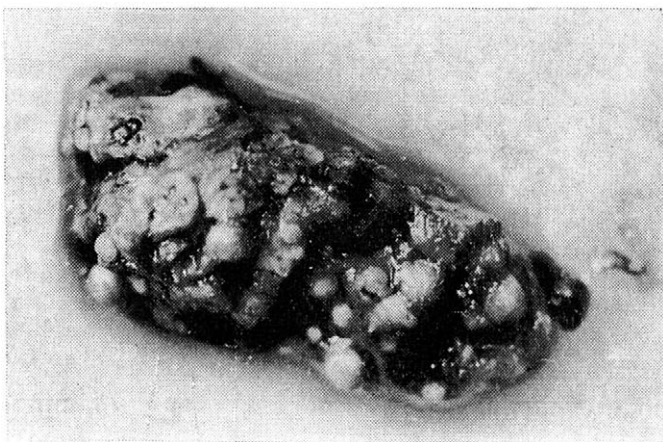
PATOMORFOLOGICKÝ NÁLEZ

Při pitvě jsme zjistili, že vnitřní orgány i stěny tělní dutiny vykazují rozsáhlé patologické změny. Nejvýrazněji byly postiženy plíce, které byly podrobeny detailnímu mykologickému i histopatologickému zpracování. Veškerý parenchym obou plicních laloků byl prostoupen velmi četnými běložlutými uzlíky, promínujícími nad pleuru a dosahujícími velikosti jáhly (obr. 1). Plicní tkáň v jejich okolí byla hyperemická a atelektatická. Na řezu měly uzlíky kaseózní charakter a byly zřetelně ohraničeny od okolní tkáně. Nálezy na serózách tělní dutiny se vyznačovaly ložiskovými změnami, makroskopicky charakterizovanými drobnými promínujícími uzlíky žlutobílé barvy.

Nodulární změny vykazovaly při mikroskopickém vyšetření typickou strukturu mykotických granulomů s nekrotickými centry a periferní granulační tkání. Kromě toho byla v parenchymu pozorována ložiska zmnožené vazivové tkáně, obklopující pouze slabě vyvinuté granulomy.

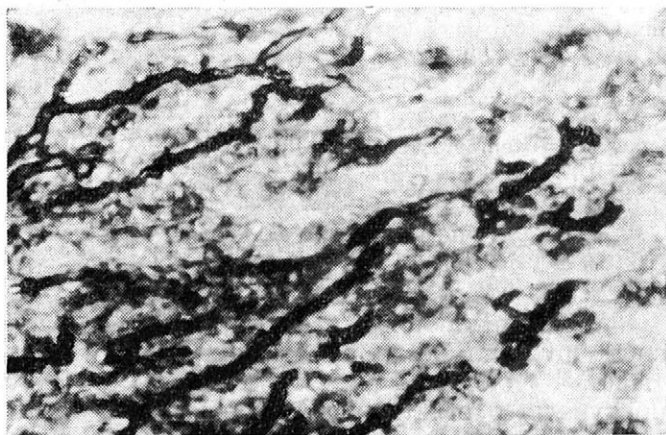
Vazivová tkáň byla zastižena i v okolí bronchiolů, změněných chronickým zánětem (obr. 2). Buněčný infiltrát granulomů byl hustě prostoupen septovanými houbovými vlákny, která se místy dichotomicky

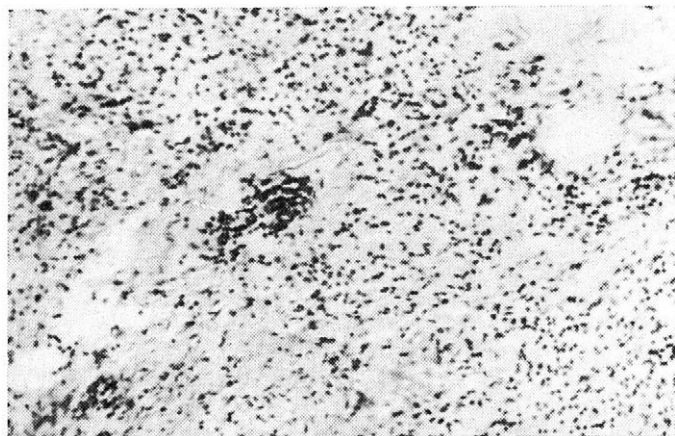
1. Aspergilóza potáplice. Makroskopický vzhled postiženého plicního laloku. Zvětš. 2X — Aspergillosis in a diver. Macroscopic appearance of an affected lung lobe. Magnified twice



2. Ložisko vazivové tkáně místy prostoupené lymphohistiocytární infiltrací. HE, zvětš. 100X — A lesion of connective tissue locally showing lymphohistiocyte infiltration. HE, magnified 100 times

3. Septovaná a dichotomicky větvená vlákna houby prostupující granulomatózní tkáň. Grocott, zvětš. 700X — Septate and dichotomic filaments of the fungus penetrating the granulomatous tissue. Grocott, magnified 700 times





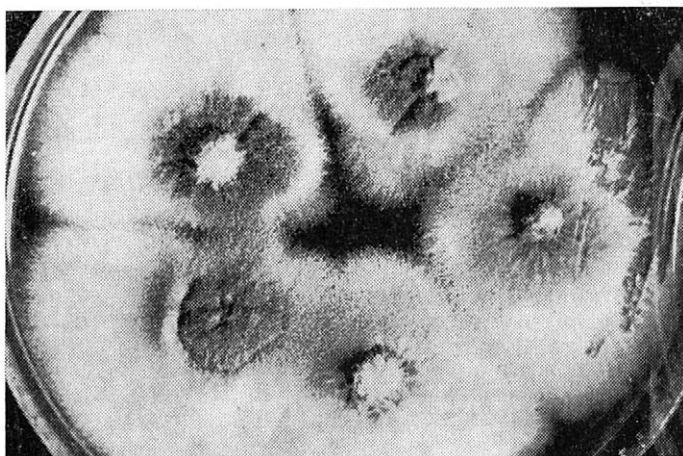
4. Zánětlivá reakce tkáně v okolí granulomů, charakterizovaná difúzní kulatobuněčnou infiltrací. HE, zvětš. 150X — An inflammatory reaction of the tissue around the granulomas, characterized by diffusive round-cell infiltration. HE, magnified 150 times

větвила (obr. 3). Zánětlivá reakce okolní plicní tkáně byla charakterizována difúzní kulatobuněčnou infiltrací s drobnými lymphohistiocytárními uzlíky (obr. 4).

KULTIVAČNÍ NÁLEZ

Ze všech inokul byla kultivována čistá kultura houby (obr. 5), kterou jsme identifikovali jako *Aspergillus fumigatus* Fresenius, 1850. Kolonie dosahovaly po pěti dnech kultivace průměru 38 mm. Byly ploché s mírně vyvýšeným středem. Zrnitý povrch kolonie byl zbarven tmavozeleně, pouze vláknitá středová vyvýšenina a okraje byly bílé. Spodina kolonií byla zbarvena žlutě.

5. Primokultura *Aspergillus fumigatus* vyrůstající z částic postižené plicní tkáně. Stav po pětidenní kultivaci na Sabouraudově dextróзовém agaru při teplotě 27 °C. Průměr Petriho misky 100 mm — A primary culture of *Aspergillus fumigatus*, growing from the particles of the affected lung tissue. The state after five-day cultivation on Sabouraud's dextrose agar at a temperature of 27 °C. Petri dish diameter 100 mm



DISKUSE

V popisovaném případě byla diseminovaná aspergilóza příčinou smrti juvenilní potáplice. Rozsah patologických změn v primárním ložisku — v plicích a plicních vacích — byl tak velký, že nebylo možné pochybovat o praktickém vyřazení těchto orgánů z funkce. Není dosud

jasné, za jakých okolností toto onemocnění vzniklo. Podle Beera (1963) jsou spory *Aspergillus fumigatus* běžně přítomny v ústní dutině vodních ptáků, aniž vyvolávají onemocnění. *Aspergillus fumigatus* je ubikviterním organismem, často izolovaným ze sena, rostlinných zbytků a z půdy. Je potenciálně patogenní i pro jiné obratlovce, včetně člověka. V patogenezi aspergilózy se uplatňují rozličné vlivy: různá poranění či oslabení organismu jinými chorobami (Beer, 1963), stressové situace po odchytu a transportu ptáků (Kaplan aj., 1975), klimatické podmínky — např. extrémní sucho (Zinkl aj., 1977).

Potáplice jsou sladkovodní rybožraví ptáci, rozšíření především v tundrových oblastech Evropy a Severní Ameriky. Na našem území bývají zastiženi při tahu na zimoviště.

Faktory vedoucí ke vzniku námi pozorované mykózy lze jen obtížně definovat: jedním z hlavních je snad skutečnost, že šlo o ptáka juvenilního, pravděpodobně ještě ne dosti schopného odolávat zátěži dlouhého letu. Je známé, že v prvním roce života hyne z nejrůznějších příčin velká většina ptáků. Podle jednoho z nás (P. K.), zabývajících se dlouhodobě výzkumem parazitóz vodních ptáků, jde o pozorování na našem území ojedinělé: např. v obsáhlém vyšetřovaném souboru 600 racků druhu *Larus ridibundus* nebyla aspergilóza zjištěna ani v jediném případě. V dostupné literatuře jsme také nenalezli ani jednu zprávu o aspergilóze příslušníka řádu *Gaviiformes*.

Literatura

- BEER, J. V.: The incidence of *Aspergillus fumigatus* in the throats of wild geese and gulls. *Sabouraudia*, 2, 1963, s. 238-247.
- CAMPEBELL, G.: Aspergillosis in captive penguins. *Vet. Serv. Bull. (Dublin)*, 2, 1972, s. 34-41.
- CLARK, G. M.: Aspergillosis in naturally infected cowbirds and grackles. *Avian Dis.*, 4, 1960, s. 94-96.
- DAVIS, W. A. — COCLUNG, L. S.: Aspergillosis in wild herring gulls. *J. Bact.*, 40, 1940, s. 321-323.
- EISENGARTEN, H. J. — ERLER, M. — GÜNTHER, H.: *Aspergillus fumigatus* — Infektion bei Psittiden und Wasservögeln nach einer Ziergeflügelausstellung. *Mh. VetMed.*, 32, 1977, s. 62-65.
- FINNES, R. N. T. W.: A penguin health problem. *New Scient.*, 16, 1962, s. 148-149.
- FRAGNER, P. — VÍTOVEC, J. — VLADÍK, P.: *Aspergillus flavus* ve viscerální mykóze kuřecí. *Čes. Mykol.*, 28, 1974, s. 233-237.
- FRAGNER, P. — VÍTOVEC, J. — VLADÍK, P.: Enzooteie diseminované viscerální aspergilózy u krůt. *Čes. Mykol.*, 29, 1975, s. 115-118.
- HUBBEN, K.: Report — *Aspergillus meningoencephalitis* in turkeys and ducks. *Avian Dis.*, 2, 1958, s. 110-116.
- JENNINGS, A. R. — SOULSBY, E. J. L.: Disease in a colony of blackheaded gulls, *Larus ridibundus*. *Ibis*, 100, 1958, s. 305-312.
- KAPLAN, W. — ARNSTEIN, P. — AJELLO, L. — CHANDLER, F. — WATTS, J. — HICKLIN, M.: Fatal aspergillosis in imported parrots. *Mycopath.*, 56, 1975, s. 25-29.
- KARDEVÁN, A. — PÁLYUSIK, M.: Untersuchungen über die pathogene Wirkung von *Aspergillus flavus* an Gänsen. *Acta vet. hung.*, 17, 1967, s. 301-310.
- KEYMER, I. F.: A survey and review of the causes of mortality in British birds and the significance of wild birds as disseminators of disease. *Vet. Rec.*, 70, 1958, s. 713-720 (I), 736-739 (II).
- KHAN, Z. U. — PAL, M. — PALIWAL, D. K. — DAMODARAN, V. N.: Aspergillosis in imported penguins. *Sabouraudia*, 15, 1977, s. 43-45.
- KNUDSON, W. U. — MEINECKE, C. F.: Pneumonic aspergillosis in poults caused by *Aspergillus flavus*. *Avian Dis.*, 16, 1972, s. 1130-1132.
- MC DIARMID, A.: Aspergillosis in free living wild birds. *J. comp. Path. Ther.*, 65, 1955, s. 246-249.

MC DOUGLE, H. E. — VAUGHT, R. W.: An epizootic of aspergillosis in Canada geese. *J. Wildlife Manage.*, 32, 1968, s. 415-417.

OLSON, L. D.: Aspergillosis in Japanese quail. *Avian Dis.*, 13, 1969, s. 225-227.

PALYUSIK, M. — KARDEVÁN, A.: Die von *Aspergillus fumigatus* hervorgerufene Pneumomykose der Entenküken. *Acta vet. hung.*, 17, 1967, s. 337-346.

POULDING, R. H.: Five cases of aspergillosis in immature herring gulls. *Ibis*, 94, 1952, s. 364-366.

SAËZ, H.: *Aspergillus fumigatus* isolé chez l'animal. Analyse portant sur quatre années de recherches. *Annls Parasit.*, 40, 1965, s. 105-118.

SAËZ, H.: *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter, une espèce thermophile commune chez animal. *Bull. mens. Soc. Linn.*, Lyon, 35, 1966, s. 467-472.

TRAORE, S. — GIDEL, R.: Observation d'une enzootie d'aspergillose chez des oisons en Haute — Volta. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 19, 1966, s. 131-136.

WOBESER, G. — SAUNDERS, J. R.: Pulmonary oxalosis in association with *Aspergillus niger* infection in Great Horned Owl (*Bubo virginianus*). *Avian Dis.*, 19, 1975, s. 388-392.

ZINKL, J. G. — HYLAND, J. M. — HURT, J. J.: Aspergillosis in common crows in Nebraska, 1974. *J. Wildlife Dis.*, 13, 1977, s. 191-193.

Došlo dne 2. 5. 1979

ДИТРИХ, О. — ОТЧЕНАШЕК, М. — ВЕСЕЛСКИ, М. — КОУБЕК, П. (Паразитологический институт АН ЧССР; Государственный ветеринарный институт, Пардубице; Природно-испытательный факультет Университета им. Я. Э. Пуркине, Брно): Диссеминированный аспергиллез гагары. *Vet. Med., Praha*, 24, 1979 (10) : 633-639.

Авторы описывают случай генерализованного микоза гагары вида *Gavia arctica*, вызванного грибом *Aspergillus fumigatus*. Масштабы поражения стали бесспорно причиной гибели птицы. Подробно приводится микологическая характеристика инвадирующего реagenta и гистопатологические изменения в первично пораженном органе — легких. Приводится также обзор ряда птиц, живущих как на воле, так и в неволе, у которых диагностирован аспергиллез.

гагара; аспергиллез; *Aspergillus fumigatus*

DITRICH, O. — OTČENÁŠEK, M. — VESELSKÝ, M. — KOUBEK, P. (Parasitological Institute of the Czechoslovak Academy of Sciences, Praha; State Veterinary Institute, Pardubice; Faculty of Sciences, J. E. Purkyně University, Brno): Disseminated Aspergillosis in the Diver. *Vet. Med., Praha*, 24, 1979 (10) : 633-639.

A case is described of generalized mycosis in a diver of the species *Gavia arctica*, caused by the fungus *Aspergillus fumigatus*. The organism of the bird was so much damaged that the bird died. There is a detailed description of the mycological characteristics of the invading agent and a description of the histopathological changes in the primarily affected organ — the lungs. Further, a survey is presented of the orders of freely living birds and birds in captivity in which aspergillosis has been detected.

diver; aspergillosis; *Aspergillus fumigatus*

DITRICH, O. — OTČENÁŠEK, M. — VESELSKÝ, M. — KOUBEK, P. (Parasitologisches Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Praha; Staatliche Veterinäranstalt, Pardubice; Naturwissenschaftliche Fakultät der JEP-Universität, Brno): Disseminierte Aspergillose bei einem Prachtttaucher. *Vet. Med., Praha*, 24, 1979 (10) : 633-639.

Die Verfasser der vorliegenden Arbeit beschreiben einen Fall von generalisierter Mykose bei einem Prachtttaucher (*Gavia arctica*), der durch den Pilz *Aspergillus fumigatus* hervorgerufen wurde. Das Ausmaß des Befalls führte eindeutig zum Tod des Vogels. Es wird eingehend die mykologische Charakteristik des invadierenden Agens geboten und die histopathologischen Veränderungen im primär befallenen

Organ, d. h. der Lunge, beschrieben. In der Arbeit wird ferner eine Übersicht der Ordnungen frei und in Gefangenschaft lebender Vögel geboten, bei denen bisher Aspergillose diagnostiziert wurde.

Prachtttaucher; Aspergillose; *Aspergillus fumigatus*

Adresa autorů:

Oleg Ditrich, RNDr. Miloš Otčenášek, DrSc., Parazitologický ústav ČSAV, Flemingovo nám. 2, 166 32 Praha

MVDr. Miroslav Veselský, Státní veterinární ústav, Štrossova 57, 530 02 Pardubice

RNDr. Petr Koubek, Univerzita J. E. Purkyně, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Výběr z přírůstků
Ústřední zemědělské a lesnické knihovny ÚVTIZ

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.

ES, A. J. H. van D 59.882/112
Der Eiweiss- und Fettansatz von Mastrindern unter dem Gesichtspunkt der Energieverwertung.

Wageningen, Inst. voor veevoedingsonderzoek „Hoorn“ 1978. S. 60-66., 2 obr. Overdruk no 112. (Bílkoviny — energetická přeměna — skot jatečný — výzkum / Tuk — energetická přeměna — skot jatečný — výzkum — Holandsko)

ROUSSEAU, F. C 24.525
Analyse de quelques aspects phénotypiques et génétiques des composantes des activités ovarienne et testiculaire chez le porc.

Rouillé, Centre expérimental de sélection porcine 1975. 52 s., tab. (Kanci — varlata — aktivita — fenotypické a genotypické vlivy — výzkum / Prasnice — vaječníky — aktivita — fenotypické a genotypické vlivy — výzkum — Francie)

E 35.130/78

Lauksaimniecības dzīvnieku slimību daignostičēšana, arstešana un profilakse.

Diagnostika, lečenije i profilaktika boleznej seľskochozjajstvennych životnyh. Jelgava, Min. seľ. choz. SSSR 1974. 131 s. (Veterinārnī diagnostika — sbornīk — SSSR — Lot. SSR / Veterinārnī profylaktika — sbornīk / Nemoci hospodāřských zvířat — lēčení — sbornīk — SSSR — Lot. SSR)

E 35.130/132

Lauksaimniecības dzīvnieku slimību profilakse. Diagnostika un arstešana. Profilaktika, diagnostika i lečenije boleznej seľskochozjajstvennych životnyh.

Jelgava, Latvijskaja ord. trudovogo krasnogo znamenī seľskochoz. akadēmija 1977. 71 s., obr., tab., grafy. Trudy LSChA. Vyp. 132. (Veterinārnī profylaktika — sbornīk — SSSR — Lit. SSR / Veterinārnī diagnostika — sbornīk / Hospodāřská zvířata — nemoci — lēčení — sbornīk — SSSR — Lit. SSR)

CARD, C. S. — DUREN, E. P. C 17.554/430
Beef herd health program.

Moscow (Idaho), College of agric. 1978. Nestr., tab. Idaho current information series no 430. (Veterinārnī profylaktika — skot — letāk)

D 39.719/31

Profilaktika zaboľevanij seľskochozjajstvennych i promyslovych životnyh.

Omsk, Sibirskij nauč.-issled. veter. inst. 1977. 129 s., obr., tab. Sbornik naučnyh robot SibNIVI 1977. (Nemoci hospodāřských zvířat — ochrana — sbornīk — SSSR)

Rob O., Rozinek J., Somol J., Adamovská H., Kopecká J., Kopecká E.: Změny v ultrastruktuře spermií býků se sníženou aktivitou a mrazitelností spermatu	577
Baran M., Marcaník J., Kočišová J., Zelenák I., Belák M.: Vztah mezi fermentací a morfológickou štruktúrou epitelu bachora oviec kúmených tvarovaným krmivom	587
Drábek J., Piskač A.: Výskyt aflatoxínu v některých komponentech a kompletních krmných směsích pro prasata	597
Dvořáková D.: Detekce chlamydií imunofluorescenční metodou	605
Malíková M., Matyáš Z.: Analýza rezistence a její transferability u mikroflóry z prvovýroby masa	617
Beneš J., Hrušovský J., Prokšová M.: Léčba hospodářských zvířat zasažených alkylfosfáty	627
Ditrich O., Otčenášek M., Veselský M., Koubek P.: Diseminovaná aspergilóza potáplice	637

СОДЕРЖАНИЕ

Роб О., Розинек Й., Сомол Й., Адамовска Г., Копецка Й., Копецка Э.: Изменения ультраструктуры спермиев у быков с пониженной активностью спермы	585
Баран М., Марцаник Й., Кочишова Й., Зеленьак И., Белак М.: Отношение между ферментацией и морфологической структурой эпителия рубца у овец, кормленных фасонными кормами	592
Драбек Й., Пискач А.: Распространение афлатоксина в некоторых компонентах и полносоставных комбикормах для свиней	602
Дворжакова Д.: Детекция хламидий по методу иммунофлюоресценции	613
Маликова М., Матиаш З.: Анализ устойчивости и ее трансферабельности в микрофлоре в первичном мясном производстве	622
Бенеш Й., Грушовски Й., Прокшова М.: Лечение сельскохозяйственных животных, пораженных алкилфосфатами	631
Дитрих О., Отченашек М., Веселски М., Коубек П.: Дисеминированный аспергиллез ггары	638

CONTENTS

Rob O., Rozinek J., Somol J., Adamovská H., Kopecká J., Kopecká E.: Changes in Spermatozoon Ultrastructure in Bulls with a Decreased Sperm Activity and Freezability	586
Baran M., Marcaník J., Kočišová J., Zelenák I., Belák M.: The Relationship between Fermentation and the Morphological Structure of Rumen Epithelium in Sheep Given Pelleted Feeds	592
Drábek J., Piskač A.: The Occurrence of Aflatoxin in Some Components and Complete Feed Mixtures for Pigs	602
Dvořáková D.: Detection of Chlamydia by the Immunofluorescence Method	614
Malíková M., Matyáš Z.: Analysis of Resistance and its Transferability in Microflora from Primary Meat Production	623
Beneš J., Hrušovský J., Prokšová M.: The Therapy of Farm Animals Affected by Alkylphosphates	632
Ditrich O., Otčenášek M., Veselský M., Koubek P.: Disseminated Aspergillosis in the Diver	638

INHALT

Rob O., Rozinek J., Somol J., Adamovská H., Kopecká J., Kopecká E.: Veränderungen in der Spermien-Ultrastruktur von Bullen mit verringerter Aktivität und Tiefkühlbarkeit des Spermias	586
Baran M., Marcaník J., Kočišová J., Zelenák I., Belák M.: Beziehungen zwischen der Fermentation und der morphologischen Struktur des Pansenepithels bei mit granuliertem Futter gefütterten Schafen	593
Drábek J., Piskač A.: Vorkommen des Aflatoxins in einigen Komponenten und kompletten Futtermischungen für Schweine	603
Dvořáková D.: Detektion der Chlamydien mit Hilfe der Immunofluoreszenzmethode	614
Malíková M., Matyáš Z.: Analyse der Resistenz und deren Transferabilität bei der Mikroflora aus der primären Fleischproduktion	623
Beneš J., Hrušovský J., Prokšová M.: Therapie der mit Alkylphosphaten intoxizierten landwirtschaftlichen Nutztiere	632
Ditrich O., Otčenášek M., Veselský M., Koubek P.: Disseminierte Aspergillose bei einem Prachtaucher	638