

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH
INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

6

ČÍSLO 39 (LXVII)
ROK 1994
ISSN 0375-8427

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD
SLOVENSKÁ AKADÉMIA PÔDOHOSPODÁRSKYCH VIED

The journal publishes experimental papers and reviews from all spheres of veterinary medicine

The contents of all editions and paper summaries are covered by Current Contents - Agriculture, Biology and Environmental Sciences

Editorial Board - Redakční rada

Prof. MVDr. Jan Bouda, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

MVDr. Ivan Herzog, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Bohumír Hofírek, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Karel Hruška, CSc., (Chairman), Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. Gabriel Kováč, DrSc., University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

Doc. MVDr. Imrich Marček, DrSc., Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

Doc. MVDr. Ivan Rosival, CSc., University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

Prof. MVDr. Bohumil Ševčík, DrSc., Research Institute of Feed Supplements and Veterinary Drugs, Jílové u Prahy, Czech Republic

Editor in Chief - Vedoucí redaktorka

Ing. Zdenka Radošová

NOVÉ POZNATKY O IZOENZÝMOCH LAKTÁTDEHYDROGENÁZY V KRVNÝCH SÉRACH OŠÍPANÝCH PRI PORÁŽKE

D. Heinová, J. Blahovec, G. Kováč

Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice

V práci popisujeme nezvyčajný obraz izoenzýmov laktátdehydrogenázy-LD (EC 1.1.1.27), ktorý sme zaznamenali v krvných sérach ošípaných pri porážke. Po separácii izoenzýmov LD v gradiente polyakrylamidu (natívna PAGE), sa v katódickej oblasti LD₄ sér porázaných zvierat objavila zvláštna - zdanlivá LD₅ frakcia. Táto frakcia bola neobvyklá svojou neochotou deliť sa v podmienkach natívnej PAGE a vytvárala obraz difúznej zóny. Jej prítomnosť mala za následok proporcionálny pokles kvantitatívneho zastúpenia ostatných foriem enzýmu, predovšetkým LD₁ až LD₃. Pri vyšetrení homogenity difúznej LD-zóny pomocou gélovej izoelektrickej fokusácie (IEF) sa v oblasti s relatívne vysokou hodnotou pH (asi 9) objavili dve, a v niektorých prípadoch až tri extra frakcie. Ich lokalizácia v gradiente pH bola zjavne odlišná od lokalizácie pravých molekúl LD. Toto zistenie vylúčilo pôvodnú domnienku, že prítomnosť difúznej LD-zóny, zaznamenananej po natívnej PAGE, odráža zvýšenú aktivitu LD₅ v sérach postihnutých zvierat. Nao-pak, IEF ukázala, že v skutočnosti sa jedná o zmes dvoch až troch elektroforeticky odlišných bielkovín s relatívne vysokými pI hodnotami. Keďže tieto nové bielkoviny sa svojimi elektroforetickými vlastnosťami výrazne odlišovali od pravých izoenzýmov LD, nazvali sme ich bielkoviny podobné laktátdehydrogenáze (LD-like proteíny). Pôvod týchto nezvyčajných látok nám zatiaľ nie je známy.

séra ošípaných pri porážke; izoenzýmy laktátdehydrogenázy; LD-like proteíny

V normálnych sérach živočíchov a človeka sa nachádza spravidla päť izoenzýmov laktátdehydrogenázy-LD (EC 1.1.1.27), ktorých vzájomné kvantitatívne zastúpenie je odlišné a pre daný biologický druh pomerne charakteristické (Michálek a Marcaník, 1975; Preus et al., 1989; Heinová a Blahovec, 1994a). Pri poškodení orgánu bohatého na izoenzýmy LD (srdce, pečeň, sval) častokrát dochádza k zmene tejto charakteristiky v prospech zmnoženia sérovej aktivity tých foriem enzýmu, ktoré sú v príslušnom tkanive majoritné (Bartík a Marcaník, 1967; Maekawa Masato, 1988).

Obraz sérových izoenzýmov laktátdehydrogenázy je jedným z významných indikátorov, napr. pri posúdení poškodenia svalových buniek. Je totiž dobre známe, že tieto bunky sa vyznačujú vysokým obsahom M₄ formy enzýmu (LD₅) pri takmer zanedbateľnom množstve jeho ostatných tetramérnych variant (P l a g e - m a n n et al., 1960; W i l s o n et al., 1963; T h o r n t o n a L o h n i , 1979; B e a t t y a D o x e y , 1983; Y a s u d a et al., 1990). Preto poškodenie svalového tkaniva má za následok zvýšenie aktivity LD₅ v sére postihnutého živočícha, čo je možné spoľahlivo zaznamenať pomocou rôznych elektroforetických techník.

Z literárnych údajov je známe, že k poškodeniu svalových buniek s následným zvýšením aktivity LD₅ v krvnom sére zvierat dochádza častokrát u ošipáných pri porážke (M o r i et al., 1990; W e e d i n g et al., 1993). Výsledky našich pozorovaní v oblasti izoenzýmov LD v porážkových sérach hovädzieho dobytku (H e i n o v á a B l a h o v e c , 1994b) však ukázali, že zdanlivá LD₅ frakcia je v skutočnosti tvorená zmesou bázičných LD-like bielkovín neznámeho pôvodu. Zaujímalo nás preto, či v prípade krvných sér u odporázaných ošipáných sa skutočne jedná o homogénnu LD₅ frakciu alebo či aj v tomto prípade je možné identifikovať neznáme proteíny s LD-katalytickou aktivitou.

MATERIÁL A METÓDA

ZVIERATÁ A KRVNÉ SÉRA

Vyšetrené boli krvné séra ošipáných pri porážke ($n = 20$). Zvieratá, krížence mäsového typu, boli klinicky zdravé, jatočnej hmotnosti. Ako kontrola slúžili krvné séra ošipáných s normálnou elektroforetickou mobilitou izoenzýmov laktátdehydrogenázy, t. j. s obrazom izoenzýmov LD, ktorý je typický pre zvieratá v podmienkach ustajňovacích priestorov. Získané boli od dospelých a klinicky zdravých jedincov ($n = 8$), primeraného výživného stavu, ktoré boli ustajnené v ustajňovacích priestoroch našej Univerzity.

Krv ošipáných pri porážke sme odobrali pri exsangvinácii, u kontrolných zvierat z *vena cava cranialis*. Z vyšetrenia sme vylúčili hemolyzované séra.

Stanovenie celkovej LD aktivity ako aj elektroforetické separácie jej izoenzýmov sme robili v deň odberu krvi. Katalytickú aktivitu LD (IU) sme vyšetřili kolorimetrickou metódou podľa autorov Š e v e l a a T o v á r e k (1959) pri teplote 37 °C. Celkové proteíny sme stanovili metódou podľa B r a d f o r d o v e j (1976).

ELEKTROFORÉZY

Separáciu sérových bielkovín a izoenzýmov laktátdehydrogenázy sme robili pomocou elektroforetického systému PhastSystem (Pharmacia LKB, Švédsko). Použili sme tieto separačné techniky:

1. Gradientová polyakrylamidová elektroforéza s kontinuálnou 8 - 25% gradientovou separačnou zónou a 2% zosieťovaním (PAGE 8 - 25). Separčné podmienky: 400 V, 10,0 mA, 45 min. Separácia prebiehala za chladu pri 4 °C a za použitia pufrovacieho systému 0,88 M L-alanín/0,25 M Tris pH 8,8. Krvné séra boli pred aplikáciou na gél riedené vo vhodnom pomere v 50 mM Tris/HCl pufri pH 7,5.
2. Gélová izoelektrická fokusácia (IEF) s rozsahom pH 3-9 v homogénnom 5% polyakrylamidovom géli a s obsahom Pharmalyte^R ako nosiča amfolytov. Podmienky separácie: 2 000 V, 2,5 mA, 15 °C, 20 min.

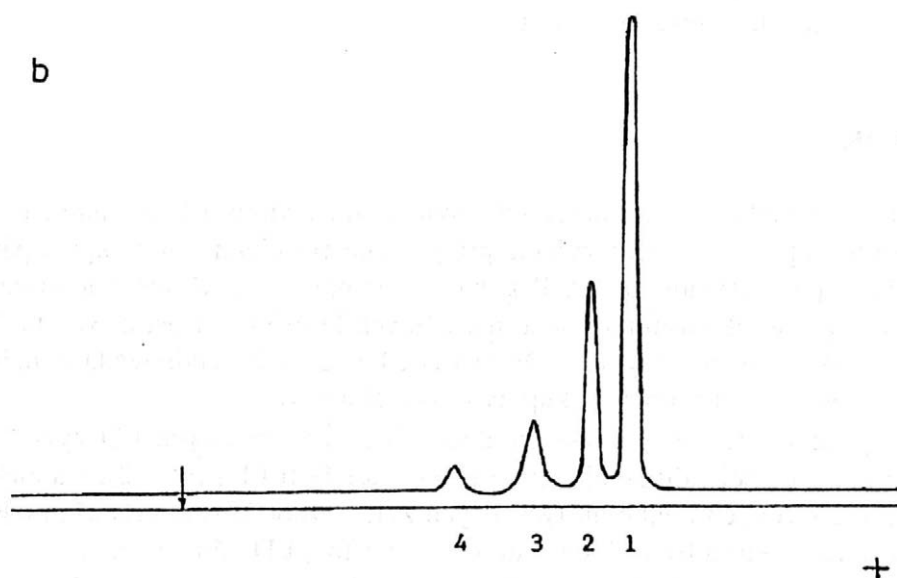
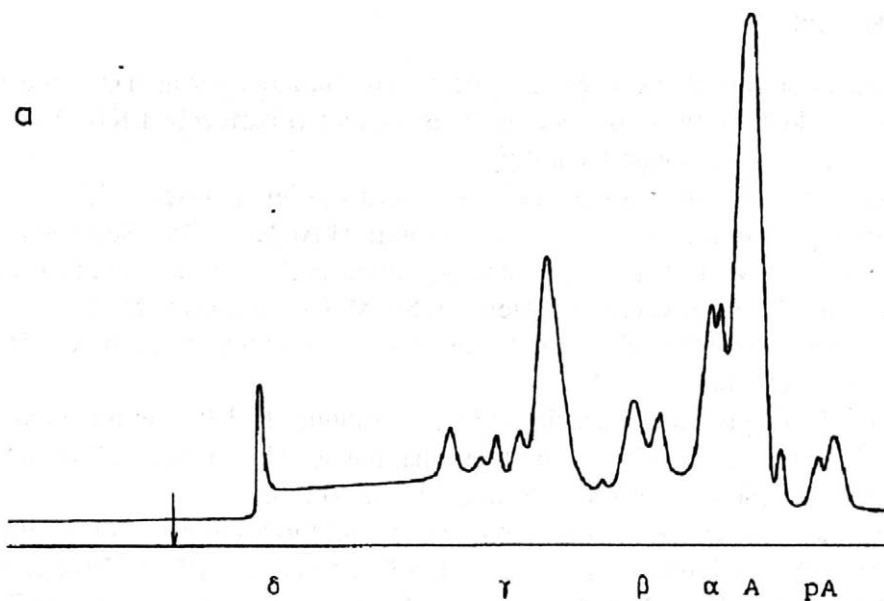
Prítomnosť izoenzýmov v géli bola detekovaná farebnou reakciou s nitroblue tetrazoliom (NBT), bielkoviny boli farbené s Coomassie Brilliant Blue R (Pharmacia LKB, Švédsko). Denzitometrické vyhodnotenie (613 nm) a kvantifikáciu elektroforetických obrazov sme robili pomocou PhastImage systému (Pharmacia LKB, Švédsko). Relatívne rozloženie LD vo frakciách jej izoenzýmov sme vyjadrili v percentách celkovej aktivity.

VÝSLEDKY

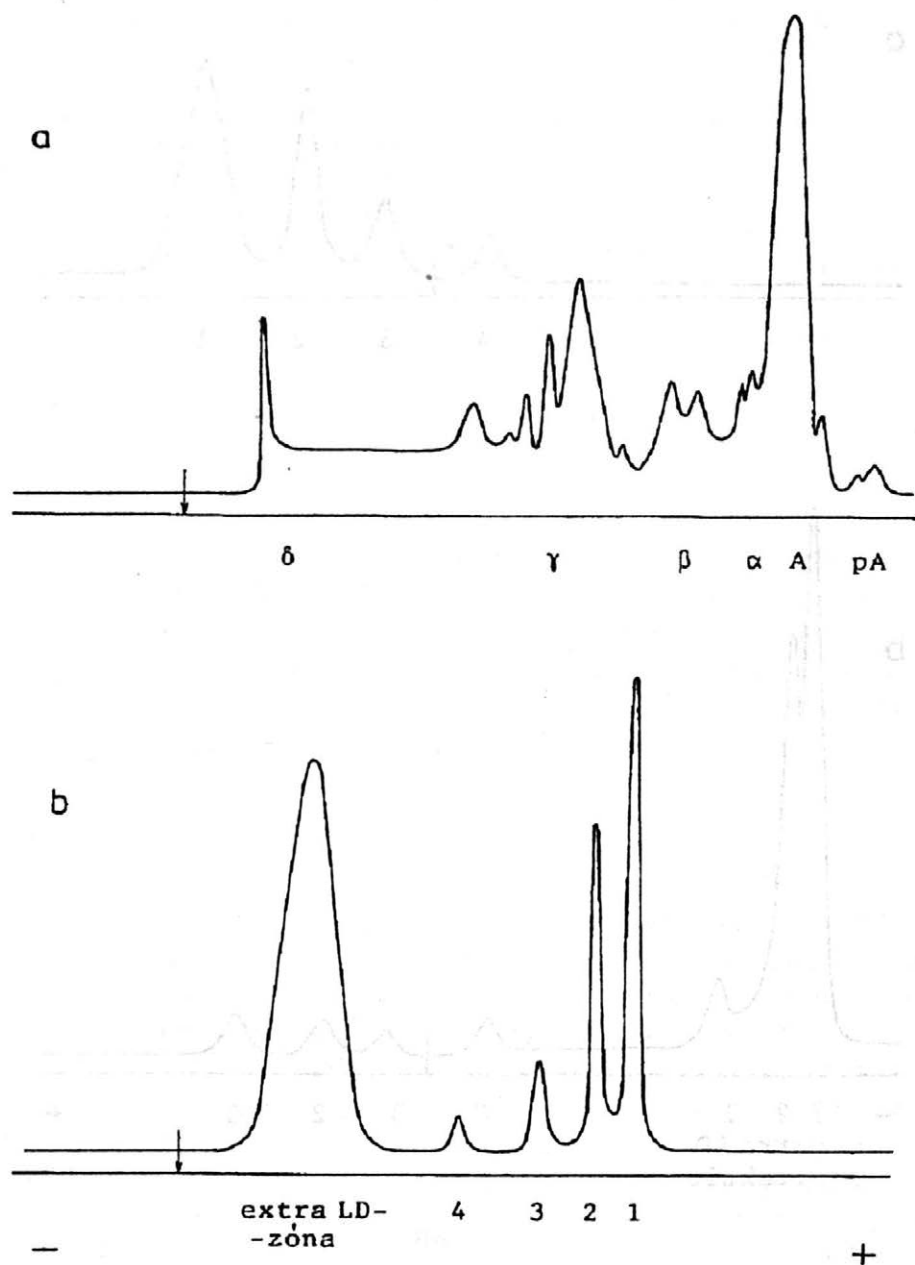
Typický denzitometrický obraz bielkovín a izoenzýmov LD normálneho krvného séra ošípaných a séra zvierat pri porážke po elektroforetickej separácii v gradiente polyakrylamidu (PAGE) znázorňuje obr. 1 a 2. Z obr. 1 je vidieť, že v anodickej časti elektroforeogramu normálnych krvných sér ošípaných boli detekované štyri frakcie enzýmu, LD₁ až LD₄. Ich mobilita zodpovedala mobilitе bielkovín putujúcich v oblasti skupiny β-γ-globulínov.

V prípade zvierat pri porážke sa elektroforeogram sérových LD vyznačoval objavením sa ďalšej - difúznej zóny v katodickej časti LD₄ (obr. 2). Na elektroforeograme sérových bielkovín tých istých zvierat (obr.2) sme príslušnú bielkovinovú frakciu, ktorá by zodpovedala tejto zvláštnej LD-zóne, nezistili.

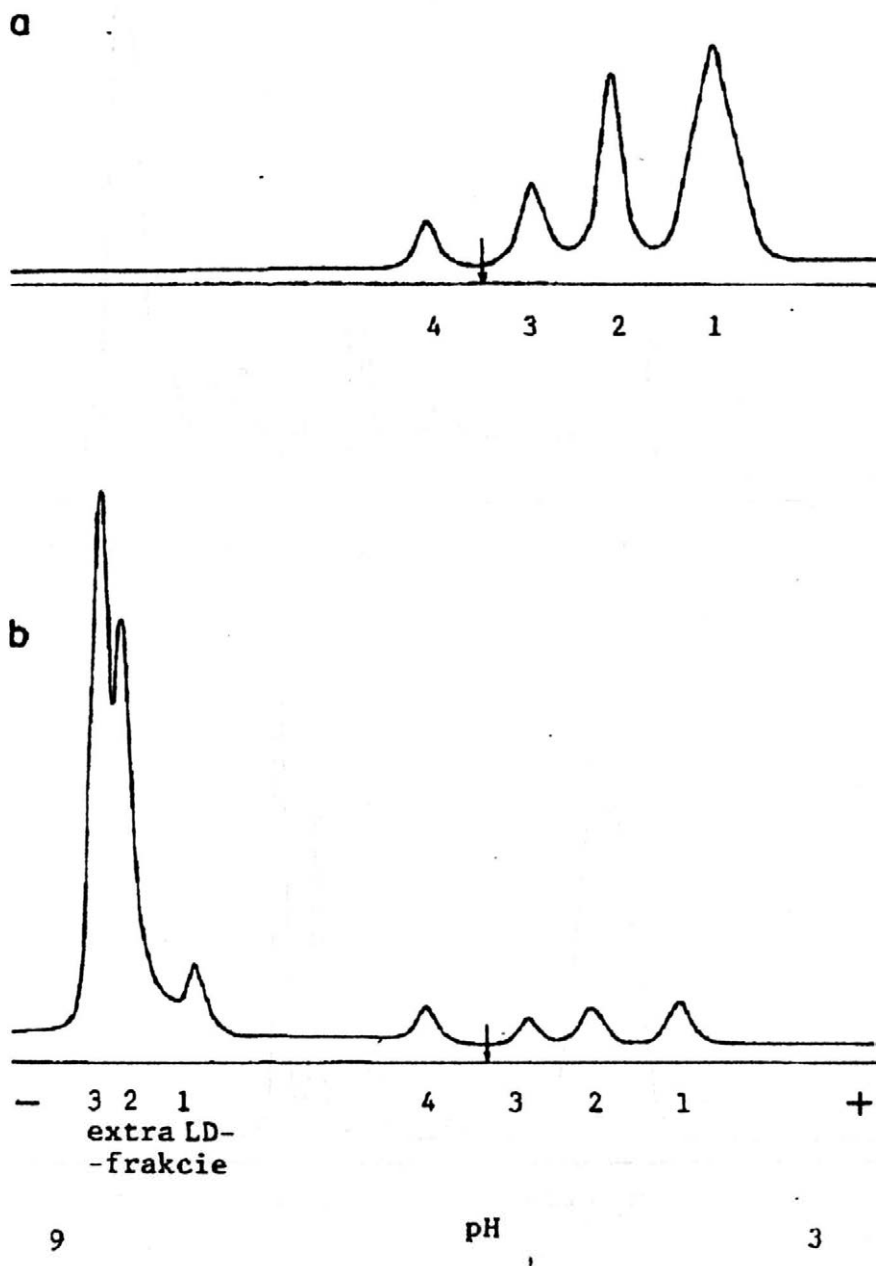
Hodnoty celkových bielkovín (g/l) a relatívne rozdelenie aktivity LD v sérach obidvoch skupín zvierat vyjadrené v percentách celkovej aktivity LD uvádza tab. I. Z tab. I vidieť, že celkové bielkoviny ani celková aktivita LD (IU) v sérach ošípaných pri porážke nebola oproti normálnym séram významne zvýšená (1,6- a 1,4- -krát, jednotlivo). V dôsledku prítomnosti extra LD-zóny v týchto sérach však došlo k proporcionálnemu poklesu (%) zastúpenia jednotlivých izoenzýmov s normálnou elektroforetickou mobilitou (tab. I).



1. Typický denzitometrický obraz bielkovín (a) a izoenzýmov laktátdehydrogenázy (b) v normálnych krvných sérach ošípaných (natívna PAGE 8 - 25%); pA - prealbumíny, A - albumín, α -, β -, γ -, δ -globulínové frakcie; šípka označuje miesto aplikácie vzorky – A typical densitometric pattern of proteins (a) and lactate dehydrogenase isoenzymes (b) in normal pig sera (native PAGE 8 - 25 %); pA - prealbumins, A - albumin, α -, β -, γ -, δ -globulin fractions: arrow indicates the place of sample application



2. Typický denzitometrický obraz bielkovín (a) a izoenzýmov laktátdehydrogenázy (b) v krvných sérach ošípaných pri porážke (natívna PAGE 8 - 25%); pA - prealbumíny, A - albumín, α -, β -, γ -, δ -globulínové frakcie; šípka označuje miesto aplikácie vzorky – A typical densitometric pattern of proteins (a) and lactate dehydrogenase isoenzymes (b) in the serum of pigs at slaughter (native PAGE 8 - 25); pA - prealbumins, A - albumin, α -, β -, γ -, δ -glubulin fractions; arrow indicates the place of sample application



3. Typický denzitometrický obraz izoenzýmov laktátdehydrogenázy v krvných sérach ošípaných po gélovej izoelektrickej fokusácii (pH 3 - 9); a - normálne sérum; b - sérum porázaných zvierat; šípka označuje miesto aplikácie vzorky - A typical densitometric pattern of lactate dehydrogenase isoenzymes in pig sera after separation by gel isoelectric focusing (pH 3-9); a - normal serum; b - slaughtered serum; arrow indicates the place of sample application

I. Pomerné rozdelenie aktivity laktátdehydrogenázy v krvných sérach ošípaných pri porážke (natívna PAGE 8 - 25 %); hodnoty sú priemerom (*n*) stanovení – Relative distribution of lactate dehydrogenase activity in the serum of pigs at slaughter; the values are averages of (*n*) measurements

Sérum ¹	Celkové bielkoviny ² (g/l)	Celková LD ³ (IU)	LD ₁	LD ₂	LD ₃	LD ₄	LD-like
			(%)				
Normálne ⁴ (<i>n</i> = 12)	61	223	56	29	15	1	-
Porážkové ⁵ (<i>n</i> = 20)	98	360	49	23	12	2	14

¹serum, ²total proteins, ³total LD activity, ⁴normal, ⁵slaughtered

Heterogenitu extra LD-frakcie krvných sér porázaných ošípaných sme vyšetrili pomocou gélovej izoelektrickej fokusácie (IEF 3-9). Typický denzitometrický obraz izoenzymov LD normálneho krvného séra ošípaných a séra zvierat pri porážke po ich elektroforetickej separácii v gradiente pH znázorňuje obr. 3. Z obr. 3 vidieť, že za použitia gélovej IEF sa nám podarilo rozdeliť extra LD-zónu na dve, a v niektorých prípadoch až tri frakcie.

DISKUSIA

Z literárnych údajov je známe, že v dôsledku rôznych fyzických záťaží dochádza v sérach zvierat k zmene obrazu izoenzymov laktátdehydrogenázy (Garbus et al., 1964; Anderson, 1976). Často je táto zmena spojená so zvýšenou aktivitou muskulárnej formy enzýmu, t. j. LD₅ (Mori et al., 1990; Weeding et al., 1993). Preto objavenie sa LD-zóny v katodickej oblasti LD₄ v krvných sérach ošípaných pri porážke (obr. 2) aj v našom prípade na prvý pohľad navodzovalo takéto vysvetlenie. Nami zaznamenaná zdanlivá LD₅ frakcia však bola neobvyklá svojou neochotou deliť sa v podmienkach natívnej PAGE a vytvárala obraz difúznej zóny. Pri vyšetrení homogenity tejto zóny pomocou gélovej izoelektrickej fokusácie (IEF) sa v oblasti s relatívne vysokou hodnotou pH (cca 9) objavili dva, a v niektorých prípadoch až tri extra píky (obr. 3). Ich lokalizácia v gradiente pH bola zjavne odlišná od lokalizácie pravých molekúl LD. Toto zistenie vylúčilo pôvodnú domnienku, že prítomnosť difúznej LD-zóny, zaznamenatej po natívnej PAGE, odráža zvýšenú aktivitu LD₅ v sérach postihnutých zvierat. Naopak, IEF ukázala, že v skutočnosti sa jedná o zmes dvoch až troch elektroforeticky odlišných bielkovín s relatívne vysokými pI hodnotami.

Z elektroforeogramu sérových bielkovín (obr. 1, 2) je zrejmé, že v oblasti zodpovedajúcej extra LD-zóne, t. j. v oblasti δ -globulínov, nedochádza k tvorbe nových proteínových bandov, ktoré by boli detekovateľné priamym farbením s Coomassie Brilliant Blue. Ani intenzita difúznej bielkovinovej zóny normálne prítomnej v tejto oblasti v krvných sérach zvierat nebola zmenená. Z toho možno usudzovať, že nami zistené extra bielkovinové frakcie vznikajú vo veľmi nízkych koncentráciách. Zviditeľnenie týchto bielkovín je možné len po ich reakcii s NBT.

Ako sme už uviedli, separácia krvných sér postihnutých zvierat pomocou gélovej IEF poskytla dve až tri extra bielkovinové frakcie s aktivitou laktátdehydrogenázy. Keďže tieto bielkoviny sa svojimi elektroforetickými vlastnosťami výrazne odlišovali od pravých izoenzýmov LD (obr. 3), nazvali sme ich bielkoviny podobné laktátdehydrogenáze (LD-like proteíny). Pre označenie jednotlivých LD-like proteínov sme použili princíp používaný pre označenie normálnych LD izoenzýmov, t. j. ich vzájomnú polohu s ohľadom na anódu. To znamená, že frakcia najbližšie k anóde bola označená LD-like-1, frakcia najbližšie ku katóde LD-like-3.

Pôvod týchto látok nám zatiaľ nie je známy. Vzhľadom na to, že sa jednalo o séra zvierat pri porážke, predpokladáme súvislosť so stresovou záťažou. V takomto prípade by boli možné dva spôsoby vysvetlenia prítomnosti nezvyčajných bielkovín. Na jednej strane môže ísť o tvorbu nových, oxido-redukčných enzýmov čo bolo pozorované u cicavcov pri rôznych stresových stavoch (P o l l a , 1991). Na strane druhej, nie je vylúčená ani možnosť vzniku komplexov LD s neznámymi novými bielkovinami s vysokou afinitou k molekulám LD.

V súvislosti s vyššie uvedeným by sme chceli pripomenúť, že podobne zmenený obraz sérových izoenzýmov LD sme zaznamenali aj u hovädzieho dobytku (krížence slovenského strakatého s nížinným čiernostrakatým plemenom) pri porážke (H e i n o v á a B l a h o v e c , 1994b). V prípade krvných sér u porázaného hovädzieho dobytku sa však neobvyklá LD-like zóna vyznačovala výrazne vyššou intenzitou a po IEF separácii poskytla až štyri bázičné extra bandy.

Otázka pôvodu nami zistených nových extra bielkovinových frakcií s katalytickou aktivitou laktátdehydrogenázy v krvných sérach zvierat pri porážke bude predmetom našej ďalšej práce.

Literatúra

- ANDERSON, M. G.: The effect of exercise on the lactate dehydrogenase and creatine kinase isoenzyme composition of horse serum. *Res. Vet. Sci.*, 20, 1976: 191-196.
- BARTÍK, M. - MARCANÍK, J.: Izoenzýmy dehydrogenázy kyseliny mliečnej v diagnostike. *Veterinářství*, 17, 1967: 556-561.

- BEATTY, E. M. - DOXEY, D. L.: Lactate dehydrogenase and creatine kinase isoenzyme levels in the tissue and serum of normal lambs. *Res. Vet. Sci.*, 35, 1983: 325-330.
- BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, 72, 1976: 248-254.
- GARBUS, J. - HIGHMAN, B. - ALTLAND, P. D.: Serum enzymes and lactic dehydrogenase isoenzymes after exercise and training in rats. *Amer. J. Physiol.*, 207, 1964: 467-472.
- HEINOVÁ, D. - BLAHOVEC, J.: Lactate dehydrogenase isoenzymes in mammalian and fowl sera. *Vet. Med.- Czech*, 39, 1994a, 75-84.
- HEINOVÁ, D. - BLAHOVEC, J.: Unusual LD-like proteins in serum of cattle at slaughter. Submitted for publication (1994b).
- MAEKAWA MASATO: Lactate dehydrogenase isoenzymes. A review. *J. Chromatogr.*, 429, 1988: 373-398.
- MICHÁLEK, A. - MARCANÍK, J.: Hodnoty aktivit izoenzymů dehydrogenázy kyseliny mléčné v sérech hospodářských zvířat. *Veter. Med. (Praha)*, 20, 1975: 199-205.
- MORI, Ch. - MAEDA, H. - YUASA, A.: Relationship between liver degeneration and the production of dark firm dry meat in slaughtered pigs. *Jap. J. Vet. Sci.*, 52, 1990: 613-620.
- PLAGEMANN, P. G. W. - GREGORY, K. F. - WRÓBLEWSKI, F.: The electrophoretically distinct forms of mammalian LDH. *J. Biol. Chem.*, 235, 1960: 2282-2287.
- POLLA, B. S.: The heat shock response in human phagocytes. *Immun. Lett.*, 30, 1991: 159-164.
- PREUS, M. - KARSTEN, B. - BHARGAVA, A. S.: Serum isoenzyme pattern of creatine kinase and lactate dehydrogenase in various animal species. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 27, 1989: 787-790.
- ŠEVELA, M. - TOVÁREK, J.: A method for estimation of lactic dehydrogenase in body liquids (in Czech). *J. Czech. Physiol.*, 98, 1959: 844-847.
- THORNTON, J. R. - LOHNI, M. D.: Tissue and plasma activity of lactic dehydrogenase and creatine kinase in the horse. *Equine Vet. J.*, 11, 1979: 235-238.
- WILSON, A. C. - CAHN, R. D. - KAPLAN, N. O.: Functions of the two forms of LDH in breast muscle of birds. *Nature*, 197, 1963: 330-334.
- WEEDING, C. M. - HUNTER, E. J. - GUISE, H. J. - PENNY, R. H. C.: Effects of abattoir and slaughter handling systems on stress indicators in pig blood. *Vet. Rec.*, 133, 1993: 10-13.
- YASUDA, J. - TATEYAMA, K. - SYUTO, B. - TOO, K.: Lactate dehydrogenase and creatine phosphokinase isoenzymes in tissues of laboratory animals. *Jap. J. Vet. Sci.*, 38, 1989: 19-29.

Došlo 23. 2. 1994

HEINOVÁ, D. - BLAHOVEC, J. - KOVÁČ, G. (University of Veterinary Medicine, Košice):

New aspects of lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in the serum of pigs at slaughter.

Vet. Med. - Czech, 39, 1994 (6): 287-296.

In the article we describe lactate dehydrogenase - (LD) (EC 1.1.1.27) isoenzyme pattern detected in the sera of pigs at slaughter. The pattern was different from that

of normal serum (Fig. 1) and was characterized by the occurrence of an extra LD-fraction in the cathodic site of LD₄ (Fig. 2). This fraction was unusual due to its unwillingness to separate by native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and took shape of a diffuse zone. The presence of the extra LD-zone caused a proportional decrease in quantitative distribution of the other LD forms, especially LD₁ to LD₃, in slaughtered pig sera (Tab. I). We examined the homogeneity of an apparent LD₅-fraction using gel isoelectric focusing (IEF). We found out that after separation in a gradient of pH (3-9) two to three new extra bands with LD activity appeared in the area with relatively high pH value (pH 9) (Fig. 3). Their localization in the gradient of pH was greatly different from that of true LD molecules, the latter being situated in more acidic area. It is obvious from the finding described above that the diffuse LD-zone, detected in the serum of pigs at slaughter by native PAGE, was in no case a homogeneous protein. Consequently, it eliminates a possibility that the extra LD fraction reflects an increased LD₅ activity in serum of affected animals. On the contrary, the IEF showed that the diffuse LD-zone consisted of two to three electrophoretically distinct proteins with relatively high pI values. As these proteins differed in their electrophoretic properties from the true LD isoenzymes we denoted them LD-like proteins. An origin of the unusual LD-like proteins detected in the serum of pigs at slaughter remains unknown for us for the time being.

serum of pigs at slaughter; lactate dehydrogenase isoenzymes; LD-like proteins

Contact Address:

MVDr. Dagmar H e i n o v á , CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva,
Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic
Tel. 095 34768, fax 095 767675

ÚČINNOST' INTRARUMINÁLNYCH ALBENDAZOLOVÝCH BÓLUSOV NA GASTROINTESTINÁLNE NEMATÓDY A TREMATÓDY *DICROCOELIUM DENDRITICUM* U OVIEC*

J. Čorba, I. Krupicer, M. Várady, B. Peňko

Parazitologický ústav SAV, Košice

Účinnosť intraruminálnych albendazolových (ABZ) bólusov (Proftril-Captec) a vplyv terapie na niektoré produkčné parametre sme študovali vo dvoch experimentoch celkove na 466 bahniciach prirodzene infikovaných gastrointestinálnymi nematódmi a trematódmi *D. dendriticum*. Ovoskopickým vyšetrením výkalov sme zistili, že liečené zvieratá počas 10-12 týždňov po aplikácii bólusov nevylučovali vajčka helmintov a že sa výrazne znížila aj kontaminácia pasienkov zárodkami helmintov. Pitevným vyšetrením sme zistili 96,9 až 99,2% účinnosť proti nematódom *Nematodirus* spp., *Oesophagostomum* spp., *Cooperia* spp., *Trichostrongylus* spp. a *Trichuris ovis*. Prioritne sme zistili dobrú efektívnosť ABZ bólusov aj proti trematódom *D. dendriticum*, keď v prvom pokuse bola účinnosť 88,5 % a v druhom 91,8 %. Počas šesťmesačnej pastevnej sezóny liečené bahnice produkovali v priemere o 2,56 kg syra a 0,6 kg vlny viac ako neliečené zvieratá.

bahnice; intraruminálne bólusy; albendazol; gastrointestinálne nematódy; *Dicrocoelium dendriticum*

V poslednom období bola pre prežúvavcov vyvinutá nová lieková forma antihelmintík - intraruminálne bólusy, v ktorých sa uplatňujú difúzne alebo pulzačné systémy uvoľňovania účinnej látky. Ako nosiče antihelmintík sa používajú nerozpustné polyméry, z ktorých látka difunduje do predžalúdkov, alebo odbúrateľné materiály (bioerozívne polyméry alebo rozpustné akryláty), z ktorých sa antihelmintikum uvoľňuje pri ich rozpade. Intraruminálne bólusy sú pokrokom v profylaxii a terapii parazitóz, lebo chránia pasúce sa zvieratá pred reinfekciou a zamedzujú vylučovaniu zárodkov parazitov do ich životného prostredia. Ich ďalšou výhodou je, že nevyžadujú ochrannú dobu pre mäso a mlieko a ich účinnosť doznieva vo veľmi krátkom čase po uvoľnení celej dávky účinnej látky.

Prvým takýmto prípravkom určeným pre ovce sú bólusy Proftril-Captec vyvinuté v laboratóriách SKB. Za obdobie asi 100 dní sa z nich v organizme pasúceho sa zvieratá postupne uvoľní 32,5 g albendazolu (ABZ). Úlohou našich dvoch

* Výsledky uverejnenej práce boli dosiahnuté pri riešení projektu 163/1993 GAV SR.

experimentov bolo študovať účinok tejto liekovej formy na gastrointestinálne nematódy a trematódy *D. dendriticum* a vplyv tejto terapie na niektoré produkčné parametre u prirodzene infikovaných bahníc.

MATERIÁL A METÓDY

V oboch experimentoch sme postupovali v súlade s doporučeniami Svetovej asociácie pre pokrok vo veterinárnej parazitológii (WAAVP) pre testovanie anti-helminťík u prežúvavcov (Powers a i., 1982).

POKUS 1

Pokus 1 sme urobili na 300 bahniciach plemena Valaška, veku 2-5 rokov a o hmotnosti 40-57 kg. Opakovaným ovoskopickým vyšetrením fécies modifikovanou McMasterovou metódou (Ministry of Agriculture, 1971) a laboratórnou kultiváciou vajčiek helmintov sme u týchto zvierat zistili infekciu nematódmi *Oesophagostomum* spp., *Ostertagia* spp., *Trichostrongylus* spp., *Cooperia* spp., *Nematodirus* spp., *Trichuris ovis* a trematódmi *D. dendriticum*. Zvieratá sme rozdelili do dvoch rovnakých skupín. Prvej skupine 150 bahníc sme 30. apríla 1991 (dva týždne po vyhnatí na pašu) aplikovali po jednom intraruminálnom bóluše špeciálnym aplikátorom. Pri aplikácii bólusov sme nezistili ani retenciu v ezofágu ani iné vedľajšie príznaky. Druhá skupina 150 bahníc zostala neliečená a slúžila na kontrolu. Počas celého experimentu boli zvieratá držané oddelene na dvoch pasienkoch približne rovnakých rozmerov. Na týchto pasienkoch sa v predchádzajúcich dvoch rokoch vyskytla klinicky zjavná forma gastrointestinálnych nematodóz a dikroceliózy.

V dvojtýždňových intervaloch sme v období apríl - október robili tieto vyšetrenia:

- odoberali sme rektálne individuálne vzorky fécies od 30 označených zvierat z oboch skupín (20 % stáda). V laboratóriu sme vzorky fécies vyšetřili McMasterovou metódou a stanovili sme hodnoty EPG (počet vajčiek helmintov v 1 g fécies),
- vzorky trávnatého porastu sme vyšetřili na prítomnosť lariiev nematódov metódou CVL (MAFF, 1986) a stanovili počty lariiev na 1 kg trávy,
- produkciu syra sme zaznamenali v oboch skupinách v mesačných intervaloch a prepočítali na hmotnosť syra v kg na bahniciu počas celej pastevnej sezóny,
- 30. októbra boli všetky bahnice ostrihané a po zvážení vlny v oboch skupinách sme prepočítali priemernú produkciu na bahniciu,
- 16. novembra sme odporazili 14 označených bahníc (7 z liečenej a 7 z kontrolnej skupiny) na sanitnom bitúnku a ich vnútorné orgány (abomasum, črevá, pečeň) sme vyšetřili orgánovou helmintologickou pitvou.

POKUS 2

Pokus 2 sme robili v stáde 156 bahníc plemena Slovenské merino veku 3 až 5 rokov, o hmotnosti 45-60 kg. Ovoskopickým vyšetrením féces sme zistili silnú infekciu trematódmi *D. dendriticum*. Túto diagnózu sme potvrdili aj klinickým vyšetrením, keď u chorých zvierat sme zisťovali výraznú anémiu alebo ikterus, submandibulárne edémy, nechutenstvo, chudnutie a výrazné zníženie produkcie mlieka. V pečeniach dvoch bahníc, ktoré uhynuli na pastve pred začiatkom experimentu, sme zistili 4 890 a 7 650 exemplárov dikrocélií. Okrem vajíčok *D. dendriticum* sme vo féces nachádzali ojedinele aj vajíčka gastrointestinálnych nematódov *Nematodirus* spp. a *Trichuris ovis*.

28. augusta 1992 sme 145 bahniciam aplikovali po jednom Proftril-Captec bôluse a 11 bahníc sme ponechali ako neliečenú kontrolu. Vo dvojtyždenných intervaloch sme odoberali individuálne rektálne vzorky féces od 11 označených liečených zvierat a 11 kontrolných, neliečených bahníc. Zároveň sme sledovali aj klinický priebeh ochorenia v oboch skupinách.

10. decembra 1992 sme označené zvieratá odporazili na bitútku a ich črevá a pečene podrobili orgánovej helmintologickej pitve. Porovnaním pitevných náleзов dikrocélií v liečených a neliečených bahniciach sme stanovili efektívnosť skúšaných bôlusov proti pohlavne zrelým dikrocéliám.

VÝSLEDKY

POKUS 1

Hodnoty EPG

Počty vajíčok helmintov vo féces na začiatku pokusu boli nízke (pod 100 v 1 g féces). V období od 2. do 14. týždňa boli ovoskopické nálezy u liečených zvierat negatívne (s výnimkou ojedinelých vajíčok *Nematodirus* spp.), kým u neliečených kontrolných zvierat boli hodnoty EPG medzi 550 až 1 800. Maximálne hodnoty EPG sme zisťovali v júli a auguste.

Kontaminácia pasienkov

Na začiatku pokusu bol počet lariев nematódov na oboch pasienkoch nízky (200-300 lariев v 1 kg trávy). Na pasienku kde sa pásli liečené zvieratá tieto nízke hodnoty pretrvávali počas celej pastvej sezóny (maximum 750 lariев v 1 kg trávy), kým na pasienku s neliečenými bahniciami maximálne hodnoty v auguste a septembri dosahovali až 12 000 lariев na 1 kg trávy.

Pitevné nálezy

Výsledky helmintologickej pitvy vnútorných orgánov (abomasum, tenké a hrubé črevo a pečeň) uvádzame v tab. I. Pri porovnaní nálezov helmintov u liečených a neliečených bahníc sme zistili túto efektívnosť bólusov: *Nematodirus* spp. 99,0 %, *Oesophagostomum* spp. 98,7 %, *Ostertagia* spp. 98,6 %, *Cooperia* spp. 99,2 %, *Trichostrongylus* spp. 99,1 %, *Trichuris ovis* 96,9 % a *D. dendriticum* 88,5 %.

Produkčné parametre

Priemerná produkcia syra na bahnicu počas pastevnej sezóny bola v liečenej skupine 13,20 kg, kým v neliečenej skupine 10,64 kg. Priemerná produkcia vlny v liečenej skupine bola 3,96 kg na bahnicu, kým v neliečenej skupine 3,36 kg na bahnicu.

POKUS 2

Hodnoty EPG

Pôvodné hodnoty EPG pred terapiou v oboch skupinách zvierat boli v rozmedzí 1 800 až 4 300 vajíčok dikrocélie v 1 g féces. U liečených zvierat už dva týždne po aplikácii bólusov sme zistili prudký pokles v počtoch vylučovaných vajíčok a v období od 4. do 12. týždňa bol nález vajíčok vo féces len ojedinelý. U kontrolných, neliečených zvierat sme zistili maximálne vylučovanie vajíčok dikrocélie v októbri a novembri, kedy sme nachádzali vyše 7 000 vajíčok v 1 g féces.

Klinický nález

U liečených zvierat sa rýchlo upravoval ich zdravotný stav. Zvieratá začali normálne prijímať potravu a zvýšila sa aj produkcia mlieka. V októbri a novembri sme už nepozorovali edémy ani ikterus i keď anémia slizníc pretrvávala. U kontrolných zvierat sa zdravotný stav postupne zhoršoval a na konci pokusu už zvieratá neprijímali potravu, zaostávali za stádom a polihovali.

Pitevné nálezy

Pri pitve u všetkých 11 liečených bahníc v ich predžalúdkoch našli prázdne cylindre od bólusov. Nálezy dikrocélie v pečeniach a priľahlej časti tenkého čreva (0,5 m) uvádzame v tab. II. Z nej je zrejmé, že albendazolové bólusy signifikantne redukovali počty pohlavne zrelej dikrocélie, keď ich priemerná efektívnosť u liečených bahníc bola 91,8 %. Nájdene dikrocélie, ktoré prežili terapiu, boli pohyblivé a nevykazovali žiadne známky poškodenia antihelmintikom.

I. Pitevné nálezy helmintov v liečených a neliečených bahniciach – Necropsy findings of helminths in treated and untreated ewes

Číslo zvierat ¹	Abomasum		Tenké črevo ²	Hrubé črevo ³		Pečeň ⁴	
	<i>Ostertagia</i> spp.	<i>Trichostrongylus</i> spp.	<i>Cooperia</i> spp.	<i>Nematodirus</i> spp.	<i>Oesophagostomum</i> spp.	<i>Trichuris</i> spp.	<i>Dicrocoelium dendriticum</i>
Proftril-Captec							
1	14	114	110	27	2	3	13
2	0	0	0	0	1	1	114
3	0	0	0	0	0	4	10
4	0	0	113	0	0	0	17
5	17	17	60	0	0	0	0
6	28	0	0	0	0	0	0
7	0	0	17	0	0	3	34
Priemer ± SD ⁵	8,4 ± 10,5	18,7 ± 39,3	42,8 ± 47,7	3,8 ± 0,72	0,4 ± 0,72	1,57 ± 1,59	26,6 ± 37,2
Neliečená kontrola ⁶							
8	1 258	2 396	7 631	896	27	28	864
9	976	1 824	5 330	117	16	49	114
10	181	2 430	4 261	94	33	76	96
11	589	2 871	3 920	389	79	47	129
12	74	1 110	5 824	210	44	19	321
13	239	2 436	4 410	936	7	66	70
14	786	2 093	6 147	84	11	73	115
Priemer ± SD	586,1 ± 412,4	2 165 ± 525,1	5 360,4 ± 1 204,8	389,4 ± 346,9	31,0 ± 22,9	51,1 ± 20,4	231,3 ± 262,5

¹animal no., ²small intestine, ³large intestine, ⁴liver, ⁵average ± SD, ⁶untreated control

II. Pitevné nálezy dikrocélif v liečených a neliečených bahniciach – Necropsy findings of dicrocoelias in treated and untreated ewes

Číslo zvierat ¹	Tenké črevo ²	Pečeň ³
Proftil-Captec		
1	10	36
2	17	58
3	29	168
4	13	231
5	7	118
6	11	297
7	13	214
8	26	117
9	39	230
10	41	289
11	11	214
Priemer ± SD ⁴	19,7 ± 13,2	179,3 ± 56,4
Neliečená kontrola⁵		
12	29	3 249
13	17	2 820
14	23	1 806
15	30	2 601
16	11	2 420
17	15	730
18	36	2 330
19	21	2 720
20	13	3 100
21	14	2 103
22	27	2 690
Priemer ± SD	21,5 ± 13,1	2 415,5 ± 694,6

¹ animal no., ² small intestine, ³ liver, ⁴ average ± SD, ⁵ untreated control

Výrazné rozdiely boli viditeľné aj na pečeniach liečených a neliečených zvierat. Na pečeniach kontrolných bahníc boli zreteľné symptómy katarálnej cholangitídy a pericholangitídy, výrazné zhrubnutie žľčovodov a cirhóza. U liečených zvierat boli ich pečene na pohľad bez zmien, len pri priečnom reze bolo pozorované zhrubnutie žľčovodov.

Prvé správy o účinnosti novej liekovej formy albendazolu v intraruminálnych bôlusoch u oviec poukázali na vyššiu účinnosť antihelmintík v porovnaní s perorálnou suspenziou (Dorchies a i., 1987). Tak isto Dorchies a i. (1988) zistili dobrú účinnosť ABZ bôlusov proti gastrointestinálnym nematódom a pľúcny červom *D. filaria*. Chaton-Schaffner a i. (1988) potvrdili v experimente, že ABZ bôluse chránili ovce na pasienku pred reinfekciou gastrointestinálnymi nematódmi vyše 90 dní.

Naše výsledky získané pri štúdiu účinnosti ABZ bôlusov proti trematódom *D. dendriticum* sú prioritné. V prvom pokuse sme zistili 88,5% účinnosť a v druhom pokuse 91,5% účinnosť na pohlavne zrelé dikrocélie. Výrazne sa redukovalo aj vylučovanie vajíčok dikrocélie na pasienok, čím sa prerušila ontogenéza tohto helminta. Takisto sme zistili výrazne zlepšenie zdravotného stavu infikovaných bahníc a signifikantne zvýšenie produkčných parametrov.

Intraruminálne bôluse s obsahom ABZ majú svoje prednosti okrem terapeutického a profylaktického efektu najmä v tom, že po ich aplikácii sa nevyžaduje ochranná doba na živočišné produkty. To má mimoriadny význam v krajinách, kde výroba ovčieho syra predstavuje významnú položku v ekonomike chovu oviec. Naše výsledky s ABZ bôlusmi Proftril-Captec dokazujú, že táto nová lieková forma antihelmintík nájde uplatnenie aj v našich chovateľských podmienkach.

Literatúra

- DORCHIES, P. - LAHITTE, I. D. - ALZIEN, J. P. - BICHET, I. P. - POTHIER, F.: Treatment and prevention of helminthoses of sheep by an intrarecticular slow-release device containing albendazole. *Rev. Met. Vet.*, 138, 1987: 101-108.
- DORCHIES, P. - ALZIEN, J. P. - POTHIER, F.: Control of strongylosis with a slow-release device of albendazole in sheep. In: Programme and Abstract of the Fifth European Multicoloquium of Parasitology (EMOP V), F-7-4, Budapest, 1988: 113.
- CHATON-SCHAFFNER, M. - DELATOUR, P. - NAVETAT, H. - POTHIER, F.: Reliability and efficacy of a slow-release intraruminal albendazol capsule in sheep. In: Programme and Abstract of the Fifth European Multicoloquium of Parasitology (EMOP V), F-7-5, Budapest, 1988: 114.
- Ministry of Agriculture Fisheries and Food. Manual of Veterinary Parasitological Techniques. London, HMSO, 1986: 13.
- POWERS, K. G. - WOOD, I. B. - ECKERT, I. - GIBSON, T. - SMITH, H. I.: WAAVP guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine and ovine). *Vet. Parasit.*, 10, 1982: 265-284.

Došlo 25. 2. 1994

ČORBA, J. - KRUPICER, I. - VÁRADY, M. - PETKO, B. (Parasitological Institute of Slovak Academy of Sciences, Košice):

Efficacy of intraruminal albendazole capsules against gastrointestinal nematodes and trematodes *Dicrocoelium dendriticum* in sheep.

Vet. Med. - Czech, 39, 1994 (6): 297-304.

The efficacy of intraruminal albendazole (ABZ) capsules (Proftril-Captec) and the effect of treatment on productivity parameters were studied in two experiments totally on 466 ewes naturally infected with gastrointestinal nematodes and trematodes *D. dendriticum*. Ovoscopical tests revealed that treated animals remained negative during 10 - 12 weeks after the administration of capsules and that pasture contamination with helminths was significantly reduced. Necropsy revealed 96.9 - 99.2% efficacy against nematodes *Nematodirus* spp., *Oesophagostomum* spp., *Cooperia* spp., *Trichostrongylus* spp. and *Trichuris ovis*. Priority finding is the efficacy of ABZ capsules against trematodes *D. dendriticum* which was in the first experiment 88.5% and in the second experiment 91.8%. During the 6-month pasture season treated ewes produced on average 2.56 kg cheese and 0.6 kg wool per ewe more than untreated controls.

ewes; intraruminal capsules; albendazole; gastrointestinal nematodes; *Dicrocoelium dendriticum*

Contact Address:

MVDr. Július Č o r b a , DrSc., Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3,
040 01 Košice, Slovak Republic
Tel.: 095 34455, fax - doplní autor

PHARMACOKINETICS OF SODIUM HUMATE IN CHICKENS*

J. Hampl¹, I. Herzig¹, J. Vlček²

¹*Veterinary Research Institute, Brno*

²*Pharmaceutical Faculty, Charles University, Hradec Králové*

Free or liposome-encapsulated sodium humate was administered to chickens intracardially, orally or subcutaneously and the following principal pharmacokinetic parameters were determined using the MW Pharm software for two-compartment models: elimination half-life ($t_{1/2\text{el}}$), steady state distribution volume (V_{dss}), blood clearance (Cl), maximal drug concentration (C_{max}), time required for appearance of C_{max} (t_{max}), area under the curve (AUC) and bioavailability (F). Blood clearance of liposome-encapsulated sodium humate was higher than that of free sodium humate regardless of the way of administration. On the other hand, the elimination half-life was longer after the extravascular than after the intracardial administration. C_{max} values indicate that the penetration of sodium humate from the injection site into blood circulation is very slow. Biological availability of sodium humate also depended on the way of administration and dosage form. Aside from the intracardial administration, the highest bioavailability was found after subcutaneous administration of free sodium humate.

¹²⁵I labelled sodium humate; intracardial application; oral application; subcutaneous application; distribution volume; elimination half-life; clearance; bioavailability; liposomes

Growing interest in the application of humins in biology and medicine has become apparent in recent years. Natural and synthetic humic acids are characterized by a set of properties including antiviral, profibrinolytic, anti-inflammatory and oestrogenic activities and production of chelate compounds with heavy metals (K l ö c k i n g , 1992). Favourable effects of humic acids and their salts are explained by the enhancement of metabolic cell wall activity, particularly by acceleration of oxidations which can result in stimulation of biological processes provided that the supply of nutrients into the extracellular compartment is adequate.

* This work has been supported by grant No. 322/3110/02/93 from the Ministry of Industry and Trade of Czech Republic.

Humic acids are weak organic acids with chelate structure, binding with a number of toxic compounds to form insoluble and unabsorbable complexes which are eliminated with faeces (Kühnert, 1982). The discovery of the binding capacity of humic acids instigated a number of studies (Beveridge and Pickering, 1980; Marinsky et al., 1982; Herzig et al., 1992) focused on the reduction of the content of heavy metals (e.g. cadmium) in or their elimination from water sediments and live organisms.

One of the ways of reducing the heavy metal content in live organisms is the administration of chelating agents specific for heavy metals. Frequently used for this purpose are for instance EDTA, DTPA (diethylene triamine pentaacetic acid), DF (desferrioxamine) and HBDE (N-N'-bis(2-hydroxybenzyl)-ethylene diamine-N, N'-diacetic acid). Such substances can be encapsulated into liposomes as a biologically degradable excipient (Rahman et al., 1973, 1988; Rosenthal et al., 1975; Guilmette et al., 1978; Blank et al., 1988; Herzig et al., 1994).

The aim of our investigations of principal pharmacokinetic characteristics of free and liposome-encapsulated sodium humate in chickens was to recognize its prospective applications.

MATERIALS AND METHODS

PREPARATION OF LIPOSOMES AND ENCAPSULATION OF SODIUM HUMATE

Multilamellar liposomes (MLV) were prepared from egg phosphatidyl choline (PC), cholesterol (C) and stearyl amine (SM) at the molar ratio 0.45 : 0.45 : 0.1 as described by Kirby and Gregoriadis (1984).

Sodium humate labelled with ^{125}I by the oxidation method with chloramine T (Hunter and Greenwood, 1962) was used to determine the rate of encapsulation into liposomes (Hampel et al., 1992) and also as a tracer for the determination of pharmacokinetic parameters in chickens. Radioactivity was measured using the Nuclear Enterprises NE 1600 counter. Freeze-dried liposomes were rehydrated always immediately before administration.

STABILITY OF ENCAPSULATION

The stability of encapsulation of sodium humate and tracer was checked during a 9-day period. MLV were suspended in chicken blood serum preserved with 0.01% of sodium azide at 24 °C, separated into a pellet by ultracentrifugation (Beckman, rotor SW 55 Ti, 40 000 r.p.m. for 30 min) at pre-set intervals, and radioactivity was measured in aliquots of the supernatant. Then the aliquot was returned to the supernatant and the liposome pellet was resuspended.

EXPERIMENTS IN CHICKENS

Sixty day-old sexed meat-type Hybro chicks were selected for the experiment. The birds were divided into six equal groups and the treatment began when their mean liveweight reached 800 g.

Treatment scheme:

Group 1 - intracardial administration of free sodium humate

Group 2 - intracardial administration of liposome-encapsulated sodium humate

Group 3 - oral administration of free sodium humate

Group 4 - oral administration of liposome-encapsulated sodium humate

Group 5 - subcutaneous administration of free sodium humate

Group 6 - subcutaneous administration of liposome-encapsulated sodium humate

Each bird in each group received 500 µg of sodium humate with the radioactivity $3.5 \cdot 10^6$ cpm. Blood samples were collected from *v. ulnaris* 3 (only Groups 1 and 2), 30, 60 and 120 min, 4, 10, 24, 48 and 72 h, and 5, 7 and 9 (only Groups 2, 4 and 6 at the latter term) days after the administration and radioactivity was measured in 0.2 ml volumes.

CALCULATION OF PHARMACOKINETIC PARAMETERS

Principal pharmacokinetic parameters were determined by non-linear regression of a two-compartment model using the MW Pharm software. Regression curves were made up from mean values of blood radioactivity in groups of 3 to 10 chickens. The pharmacokinetic behaviour of sodium humate was characterized by the following values:

- elimination half-life ($t_{1/2}$ el)
- steady state distribution volume (V_{dss})
- blood clearance (Cl)
- maximal drug concentration (C_{max})
- time required for appearance of C_{max} (t_{max})
- area under the curve (AUC)
- bioavailability (F)

RESULTS

Stability tests demonstrated that the liposomal phospholipid bilayer was damaged and 125 I labelled sodium humate was released into the incubation medium as soon as the liposomes came into contact with blood serum. The large part of the encapsulated drug (24.3%) was released within the first 45 min, but the subsequent release was very slow (Tab. I).

Principal pharmacokinetic parameters of sodium humate after single intracardial, oral and subcutaneous treatments are given in Tab. II.

I. Release of sodium humate from liposomes during incubation in chicken blood serum

	0 min	45 min	4 hours	1 day	2 days	6 days	9 days
Percentage of encapsulated sodium humate	100.0	75.7	72.5	71.6	71.0	68.6	68.3

II. Pharmacokinetic behaviour of a single dose of sodium humate in chickens

Parameter	Administration					
	intracardial		oral		subcutaneous	
	HuNa	LHuNa	HuNa	LHuNa	HuNa	LHuNa
t 1/2 el (hours)	14.8	27.0	78.1	76.2	83.0	85.5
Vd _{ss} (ml/pc)	1 834	4 669	9 674	12 663	8 735	14 805
Cl (ml/min)	1.4	2.0	1.4	1.9	1.2	2.0
C _{max} (cpm/ml)	-	-	1 755	1 114	1 985	305
t _{max} (min)	-	-	39	95	33	88
AUC ₀₋₇ (min/cpm/ml)	23.8	17.0	7.1	7.0	17.2	8.3
F (%)	100.0	100.0	29.8	41.3	72.3	49.2

HuNa = free sodium humate

LHuNa = liposome encapsulated sodium humate

The data show a considerable difference in elimination half-lives between the intracardial and both extravascular treatments. Similar values were found for oral and subcutaneous treatments, although those for both dosage forms were somewhat longer in the latter.

Vd_{ss}, as a parameter characterizing two-compartment models, was highest in birds treated subcutaneously with liposome-encapsulated humate and lowest in those receiving intracardial doses of free humate. Vd_{ss} and Cl were higher in birds treated with liposome-encapsulated humate irrespective of the way of administration. F of free sodium humate was higher after subcutaneous than after oral treatment. F of subcutaneously administered liposome-encapsulated sodium humate was higher than those of any of the orally administered dosage forms.

DISCUSSION

No data concerning pharmacokinetics of free or liposome-encapsulated sodium humate in chickens were found in the available literature.

MLV used in our experiments had a positive surface charge and the rate of encapsulation of sodium humate was higher than in chargeless or negatively charged liposomes (H a m p l et al., 1992). The labelling of sodium humate with

¹²⁵I was very stable as documented by the results of radiochromatographical analyses carried out during 35 days of incubation in chicken blood serum and PBS (Hampel et al., 1992).

Approximately 25 per cent of liposome-encapsulated sodium humate were released during the first 45 min of incubation in chicken blood serum. The tests were performed at room temperature, because turbidity is known to develop in blood serum when incubated at the physiological temperature (40 to 42 °C) (Senior et al., 1991). It is evident from our results that a part of the liposome-encapsulated sodium humate was released and its distribution and elimination behaviour was identical with that of free humate. This statement applies particularly to intracardial administration.

Intravenously administered liposomes are rapidly caught up by RES cells, particularly in the liver, spleen and bone marrow (Liu et al., 1992; Moghimi et al., 1991). The rate of catching depends on the size, surface charge, amount and phospholipid composition of liposomes (Illum et al., 1982; Senior et al., 1985; Kato et al., 1993).

The objective of the subcutaneous administration was to produce a depot from which liposomes and the encapsulated sodium humate would be slowly released (Perez-Soler et al., 1985). Low C_{max} values are an evidence that this objective was fulfilled in our experiments. As stated by Kadir (1993), liposomes are exposed to enzymatic digestion at the site of subcutaneous administration, and interactions of lipids of the phospholipid bilayer with endogenous lipids and proteins, various types of liposome-cell interactions (absorption, phagocytosis, fusion) and other events result in destabilization of liposomes.

Liposome size is an important factor associated with their penetration ability (Allen et al., 1993). Liposomes with a diameter not exceeding 120 nm penetrate from the injection site into lymphatic and blood vessels and accumulate in lymph nodes and other tissues (Perez-Soler et al., 1985). Larger liposomes, such as MLV used in our experiments, remain at the injection site. This may be an explanation for the lower biological availability (F) of subcutaneously administered liposome-encapsulated sodium humate.

Oral administration is a simple method and liposome-encapsulated substances are protected from the action of proteolytic enzymes of the gastrointestinal tract (Weiner and Chia-Ming Chiang, 1988; Clarke and Stokes, 1992a, b; Arien et al., 1992, 1993).

Pharmacokinetic studies of the administration of a single dose of sodium humate by three different ways have shown that only approx. one third of the oral dose will reach the system, which is less than the corresponding value for a subcutaneous dose. The supply of sodium humate from the gastrointestinal tract was enhanced by its encapsulation into liposomes.

Sodium humate elimination rate, expressed by blood clearance values, was independent of the way of administration. Distribution volumes were largest after subcutaneous and lowest after intracardial administrations. The differences were probably due to different persistence of sodium humate at the injection site. Due to slowed-down release, blood concentrations were lower than those which would result from the administration of a dose corrected for biological availability after intracardial administration. Distribution volume size also depends on the rate of catching-up of liposomes by RES. Comparisons of mean group live-weights and of sizes of steady state distribution volumes allow us to conclude that sodium humate accumulates markedly in some of the compartments.

It can be concluded from the results of the 7-day experiment that subcutaneous administration of free sodium humate is the most effective way as far as its biological availability is concerned.

References

- ALLEN, T. M. - HANSEN, C. B. - GUO, L. S. S.: Subcutaneous administration of liposomes: a comparison with the intravenous and intraperitoneal routes of injection. *Biochim. Biophys. Acta*, 1150, 1993: 9-16.
- ARIEN, A. - GOIGOUX, C. - BASSE-CATHALINAT, B. - DUPUY, B.: Orally administered liposomes prepared with egg phosphatidylcholine and sterylamine: possible destruction in rat intestinal wall. *Horm. metab. Res.*, 24, 1992: 597-598.
- ARIEN, A. - GOIGOUX, C. - BAQUEY, Ch. - DUPUY, B.: Study of *in vitro* and *in vivo* stability of liposomes loaded with calcitonin or indium in the gastrointestinal tract. *Life Sci.*, 53, 1993: 1279-1290.
- BEVERIDGE, A. - PICKERING, W. F.: Influence of humate-solute interactions on aqueous heavy metal ion levels. *Water, Air, Soil Pollut.*, 14, 1980: 171-185.
- BLANK, M. L. - BYRD, B. L. - CRESS, E. A. - WASHBURN, C. C. - SNYDER, F.: Use of DTPA in heavy metal detoxification. In: *Liposomes as Drug Carriers*. John Wiley and Sons Ltd., 1988: 497-506.
- CLARKE, C. J. - STOKES, C. R.: The intestinal and serum humoral immune response of mice to systemically and orally administered antigens in liposomes: I. The response to liposome-entrapped soluble proteins. *Vet. Immunol. Immunopath.*, 32, 1992a: 125-138.
- CLARKE, C. J. - STOKES, C. R.: The intestinal and serum humoral immune response of mice to orally administered antigens in liposomes: II. The response to liposome-entrapped bacterial proteins. *Vet. Immunol. Immunopath.*, 32, 1992b: 139-148.
- GUILMETTE, R. A. - CERNY, E. A. - RAHMAN, Y. E.: Pharmacokinetics of the iron chelator desferrioxamine as affected by liposome encapsulation: potential in treatment of chronic hemosiderosis. *Life Sci.*, 22, 1978: 313-320.
- HAMPL, J. - ŠTĚPÁNEK, J. - NEZVAL, J. - ČERNÍK, J. - ŠKROBÁK, F.: Incorporation of sodium humate into liposomes and their penetration through the skin in piglets. In: *Abstracts of*

invited and volunteered papers „Humic substances in the global environment and implications in human health“. Monopoli 1992. 332 p.

HERZIG, I. - DOČEKALOVÁ, H. - MAŠEK, J. - HAMPL, J.: Effect of humin substances on excretion of inorganic xenobiotics and digestibility of nutrients. In: Abstracts of invited and volunteered papers „Humic substances in the global environment and implications in human health“. Monopoli 1992. 334 p.

HERZIG, I. - HAMPL, J. - DOČEKALOVÁ, H. - PÍSAŘÍKOVÁ, B. - VLČEK, J.: Ukládání kadmia v orgánech kuřat. při aplikaci humátu sodného. Vet. Med. - Czech, 39, 1994: 175-185.

HUNTER, W. M. - GREENWOOD, F. C.: Preparation of iodine 131-labelled growth hormone of high specific activity. Nature, 194, 1962: 495-496.

ILLUM, L. - DAVIS, S. S. - WILSON, C. G. - THOMAS, N. W. - FRIER, M. - HARDY, J. G.: Blood clearance and organ deposition of intravenously administered colloidal particles. The effects of particle size, nature and shape. Int. J. Pharm., 12, 1982: 135-146.

KADIR, F.: Intramuscular and subcutaneous drug delivery: encapsulation in liposomes and other methods to manipulate drug availability. Pharm. World Sci., 15, 1993: 173-175.

KATO, Y. - WATANABE, K. - NAKAKURA, M. - HOSOKAWA, T. - HAYAKAWA, E. - ITO, K.: Blood clearance and tissue distribution of various formulations of α -tocopherol injection after intravenous administration. Chem. Pharm. Bull., 41, 1993: 599-604.

KIRBY, Ch. - GREGORIADIS, G.: Dehydration-rehydration vesicles - a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. Biotechnology, 2, 1984: 979-984.

KLÖCKING, R.: Humic substances as potential therapeutics. In: Abstracts of invited and volunteered papers „Humic substances in the global environment and implications in human health“. Monopoli 1992. 129 p.

KÜHNERT, M. - FUSCH, V. - GOLBS, S.: Pharmakologisch- toxikologische Untersuchungen an Huminsäuren unter der Zielstellung ihrer oralen Anwendung bei Magen-Darm- Erkrankungen der Nutztiere. In: Proc. Int. Symp., Minsk, 1982: 232-243.

LIU, D. - MORI, A. - HUANG, L.: Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes. Biochim. Biophys. Acta, 1104, 1992: 95-101.

MARINSKI, J. A. - GUPTA, S. - SCHINDLER, P.: The interaction of copper (II) with humic acid. J. Colloid Interface Sci., 1982: 401-411.

MOGHIMI, S. M. - PORTER, C. J. - MUIR, I. S. - ILLUM, L. - DAVIS, S. S.: Non-phagocytic uptake of intravenously injected microspheres in rat spleen: influence of particle size and hydrophilic coating. Biochem. Biophys. Res. Commun., 177, 1991: 861-866.

PEREZ-SOLER, R. - LOPEZ-BERESTEIN, G. - JAHNS, M. - WRIGHT, K. - KASI, L. P.: Distribution of radiolabelled multilamellar liposomes injected intralymphatically and subcutaneously. Int. J. Nucl. Med. Biol., 12, 1985: 261-266.

RAHMAN, Y. E.: Use of liposomes in metal poisonings and metal storage disease. In: Liposomes as Drug Carriers. John Wiley and Sons Ltd. 1988: 485-495.

RAHMAN, Y. E. - ROSENTHAL, M. W. - CERNY, E. A.: Intracellular plutonium: removal by liposome-encapsulated chelating agent. Science, 190, 1973: 300-302.

ROSENTHAL, M. W. - RAHMAN, Y. E. - MORETTI, E. S. - CERNY, E. A.: Removal of polymetric plutonium by DTPA directed into cells by liposome encapsulation. *Radiat. Res.*, 63, 1975: 262-274.

SENIOR, J. - CRAWLEY, J. C. W. - GREGORIADIS, G.: Tissue distribution of liposomes exhibiting long half-lives in the circulation after intravenous injection. *Biochim. Biophys. Acta*, 839, 1985: 1-8.

SENIOR, J. H. - TRIMBLE, K. R. - MASKIEWICZ, R.: Interaction of positively-charged liposomes with blood: implications for their application *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1070, 1991: 173-179.

VLČEK, J. - MACEK, K. - SUCHOPÁR, J. - RUDIŠAR, L.: *Klinická farmakokinetika*. Charles University Prague 1991. 61 pp.

WEINER, N. - CHIA-MING CHIANG: Gastrointestinal uptake of liposomes. In: *Liposomes as Drug Carriers*. John Wiley and Sons Ltd. 1988: 599-607.

Arrived on 15th March 1994

HAMPL, J. - HERZIG, I. - VLČEK, J. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno; Farmaceutická fakulta University Karlovy, Hradec Králové):

Farmakokinetika humátu sodného u kuřat.

Vet. Med. - Czech, 39, 1994 (6): 305-313.

U šesti skupin kuřat byly stanoveny základní farmakokinetické parametry humátu sodného ve volné formě nebo enkapsulovaného do liposomů, a to po intrakardiální, perorální a subkutánní aplikaci.

Velké multilamelární liposomy byly připraveny metodou dehydratace-rehydratace. Ke stanovení účinnosti enkapsulace humátu sodného byl jako radioindikátor použit humát sodný značený ^{125}I . Každému kuřeti bylo aplikováno 500 μg humátu sodného buď ve volné formě nebo v liposomech, a to vždy s konstantní aktivitou radioindikátoru. Z naměřených hodnot radioaktivity krve odebírané v určených intervalech byly pomocí software MW Pharm vypočteny tyto farmakokinetické parametry: poločas eliminační fáze ($t_{1/2\text{el}}$), distribuční objem za ustáleného stavu (V_{dss}), krevní clearance (Cl), maximální koncentrace aplikované látky (C_{max}) a doba potřebná k jejímu dosažení (t_{max}), plocha pod křivkou (AUC) a biologická dostupnost aplikované látky (F).

Testováním stability liposomů s enkapsulovaným humátem sodným inkubací v kuřecím séru bylo prokázáno poškození liposomální fosfolipidní dvojvrstvy a tím uvolňování enkapsulovaného humátu sodného do média. Tato ztráta má jen omezený rozsah.

Farmakokinetická analýza po podání humátu sodného třemi aplikačními cestami ukázala, že po perorálním podání se do systému dostává pouze asi 1/3 podaného množství, přičemž podání v liposomální formě přisun humátu sodného z gastrointestinálního traktu zvýšilo. Způsob podání neovlivňuje rychlost eliminace humátu sodného.

ho vyjádřenou hodnotami krevní clearance. Po podání liposomálních preparátů byly zaznamenány vyšší hodnoty clearance. Způsob podání naopak ovlivnil délku eliminačních poločasů, které jsou u extravaskulárních podání delší.

Vyšší distribuční objem za ustáleného stavu po perorálním podání než po intrakardiálním a nejvyšší po subkutánní aplikaci je zapříčiněn dlouhodobým setrváváním humátu sodného v místě aplikace, resp. hromaděním v některém kompartmentu. Při srovnání obou extravaskulárních aplikací byla maximální koncentrace (C_{max}) dosažena rychleji při podání volného humátu sodného.

Hodnoty AUC a z nich vyplývající biologická dostupnost (F) v průběhu sedmi dní po aplikaci byla z obou extravaskulárních způsobů podání vyšší po subkutánní aplikaci volného humátu sodného. Dostupnost humátu sodného aplikovaného subkutánně v liposomální formě je vyšší než dostupnost z obou druhů preparátů v případě podání *per os*.

¹²⁵I humát sodný; aplikace intrakardiální, perorální, subkutánní; poločas eliminace; distribuční objem; clearance; biologická dostupnost; liposomy

Contact Address:

RNDr. Jaroslav H a m p l, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70,
621 32 Brno, Czech Republic
Tel.: 05 41321241, fax 05 41211229

Upozorňujeme čtenáře, že v čísle 7/1994 časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

mají být uveřejněny tyto příspěvky:

P a k a n d l M.: The prevalence of intestinal protozoa in wild and domestic pigs

Herzig I., Písaříková B., Vrchlabský J., Standarda S.: Stravitelnost chemicky konzervované krve u prasat

Lauková A.: Výskyt rezistencie na ťažké kovy u bachorových stafylokokov

Košutský J., Škrobánek P.: Dlhodobá expozícia brojlerových kurčiat PCB - klinické a biochemické zmeny

Krajčovičová - Kudláčková M., Bobek P.: Koncentrácia cholesterolu v lipoproteinoch a rôznych príjem aminokyselín v experimente

THE ISOLATION OF SALMONELLAE FROM POULTRY CARCASSES AND EQUIPMENTS IN THE POULTRY PROCESSING PLANT BY MEANS OF TWO PROCEDURES

W. M. Tadesse, A. Čížek

University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno

A total of 235 samples (swabs, rinse and organs) from freshly dressed broiler carcasses and from equipments of poultry processing plant were examined for the presence of salmonellae by means of motility enrichment on modified semisolid Rappaport medium (SAM) and of a conventional cultural procedure using Rappaport-Vassiliadis broth (R-VB) as selective enrichment. In 61 samples (26%), *Salmonella* was isolated by means of one or both procedures. The highest contamination with *Salmonella* was found in the rinse of broiler carcasses (35.5%), followed by swabs of equipments (32.0%), tissues of organs (31.0%) and swabs of carcasses (19.7%). Twelve different serotypes and 65 strains of salmonellae were detected. *S. saint paul* and *S. enteritidis* were the most frequent serotypes. Statistical analysis showed that there was no significant difference between the procedures.

· *Salmonella*; motility medium; Rappaport-Vassiliadis broth; poultry processing

There have been certain efforts to develop methods for *Salmonella* isolation from foods that would be highly efficient, selective, rapid and easy to interpret.

The procedure of salmonellae isolation from foods and feeds traditionally used liquid media for the pre-enrichment and selective enrichment, and solid media for the selective isolation (F r i c k e r, 1987).

Semisolid media with and without selectively toxic chemicals have been used for the isolation of salmonellae for many years (S t u a r t and P i v n i c, 1965; H a r v e y et al., 1966; Š v a s t o v á et al., 1984), with similar or better results than classical culture methods. Recently, many investigators have recommended semisolid media on basis of Rappaport and Rappaport-Vassiliadis broth for the detection of salmonellae in foods (D e S m e d t et al., 1986; P e r a l e s and A u d i c a n a, 1989; P e r a l e s and E r k i a g a, 1991; D e Z u t t e r et al., 1991).

In the present paper the productivity of *Salmonella* motility medium (SAM) (P a k á n o v á and P a t a k y, 1982) with a conventional cultural procedure using Rappaport-Vassiliadis broth (V a s s i l i a d i s et al., 1976) for the isola-

tion of salmonellae and the level of salmonella contamination of freshly dressed broiler carcasses and equipments in poultry processing plant are presented.

MATERIAL AND METHODS

SAMPLES

Between March and June 1988 a total of 235 samples of different types were collected from the poultry processing plant - Brno, Modřice.

The types of samples were:

- (I) 122 swabs from freshly dressed broiler carcasses before chilling,
- (II) 31 rinses from broiler carcasses after chilling,
- (III) 29 organs (liver and heart),
- (IV) 53 swabs from different equipments.

The laboratory procedures were carried out within three hours after samples acquisition in all cases.

CULTURE MEDIA

The buffered pepton water - BPW (E d e l and K a m p e l m a c h e r, 1973) was used for pre-enrichment. For selective enrichment Rappaport-Vassiliadis broth (R-VB) was prepared in the laboratory according to V a s s i l i a d i s et al. (1976).

Salmonella motility medium - SAM (P a k á n o v á and P a t a k y, 1982) was prepared from the following three solutions:

Solution A contained Tryptone (Oxoid) 10 g, NaCl 8 g, KH_2PO_4 1.6 g, L-lysine 5 g, mannitol 3 g, Agar No. 3 (Oxoid) 1.2 g and distilled water ad 900 ml.

Solution B contained $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 40 g in 100 ml distilled water.

Solution C contained analytically pure malachite green oxalate (Merck) 0.4 g in 100 ml distilled water.

All the solutions were heated in a water bath to about 70 to 80 °C to dissolve the ingredients completely. For the preparation of SAM medium, 100 ml of solution B and only 7.5 ml of solution C were added to 900 ml of solution A at 55 - 60 °C in the water bath. The medium was transferred in to Craigie test tubes and sterilized at 100 °C for 20 min. Then it was stored in a refrigerator and used within one month.

Desoxycholate citrate agar (DCA, Imuna) was used for plating.

PROCEDURE

All swabs were put into test tubes containing 10 ml BPW. After that, they were shaken by hand for and incubated at 37 °C for 18 - 20 hrs.

Broilers organs (liver and heart) were cut into very small pieces with a sterile pair of scissors and forceps separately. These pieces of organs were macerated by fingers in the sterile plastics bags for several minutes. 25 g of macerated organs were transferred into a flask containing 225 ml BPW and incubated at 37 °C for 18 - 20 hrs.

20 µl of the culture obtained in the above procedure was transferred into a test tube containing 5 ml of R-VB, and the same amount was transferred into SAM medium. The inoculated R-VB was incubated at 42 °C for 24 and 48 hrs while the inoculated SAM medium was incubated at 37 °C only for 24 hrs.

After the indicated incubation period, a streak was taken using a loop (3 mm inner diameter) and separately plated on DCA from both media. Finally, agars were incubated at 37 °C for 24 - 48 hrs. From the inoculated agars after 24 and 48 hrs of incubation two to five presumptive *Salmonella* colonies were then subcultivated on lysine iron agar (Oxoid) and incubated for 24 hrs at 37 °C. The hydrogen sulphide and lysine decarboxylase positive cultures were serotyped by salmonella-specific antisera (Imuna, ÚSOL).

RESULTS AND DISCUSSION

The corresponding results of each examined type of samples by both selective enrichment media (R-VB and SAM) are shown in Tab. I. Out of the total of 235 samples examined, 61 (26%) were *Salmonella* positive after enrichment in R-VB and SAM together. Fifty-three (22.6%) and 43 (17.9%) samples were found *Salmonella* positive with R-VB and SAM, respectively.

Tab. II shows salmonella serotypes isolated from broiler carcasses and processing plant's equipment by means of both procedures. On four occasions two serotypes were isolated from a single sample and total of 65 different strains belonging to 12 serotypes were isolated by means of both media.

I. *Salmonella* positive samples with both procedures (R-VB and SAM)

Types of samples	n	No. of positive samples (%)		
		R-VB	SAM	R-VB & SAM
Swabs of carcasses	122	21	19	24 (19.7)
Organs	29	8	5	9 (31.0)
Rinse of carcasses	31	9	6	11 (35.5)
Swabs of equipments	53	15	13	17 (32.0)
Total	235	53 (22.6)	43 (18.3)	61 (26.0)

II. Salmonella serotypes isolated from poultry carcasses and processing plant equipment by means of both procedures

Serotypes	R-VB SAM	+	+	- +	Total
<i>S. saint paul</i>		9	6	2	17
<i>S. enteritidis</i>		11	4	0	15
<i>S. reading</i>		3	2	1	6
<i>S. montevideo</i>		0	4	2	6
<i>S. derby</i>		4	0	1	5
<i>S. kentucky</i>		3	1	0	4
<i>S. infantis</i>		2	1	1	4
<i>S. lagos</i>		2	0	1	3
<i>S. anatum</i>		1	0	0	1
<i>S. sandiego</i>		1	0	0	1
<i>S. eastbourne</i>		0	0	1	1
<i>S. agona</i>		0	1	0	1
Total		36	19	9	65

Poultry and poultry products are a well known source of human salmonellosis (Oosterom, 1991). For the microbiological safety of food processing, rapid detection methods are necessary for the timely identification of contamination of products. Standard cultural procedures for isolation of salmonellae in foods are time consuming and require a minimum of 4 - 5 days to obtain presumptive evidence of salmonella contamination (D'Aoust, 1981).

In the Czech and Slovak Republics, SAM medium has been used for Salmonella isolation for many years (Pakánová and Patáky, 1982). This medium is simply the modified semisolid Rappaport medium with a low content of malachite green (30 mg/l), enriched with L-lysine and mannitol. However, in our study, even though the samples detected Salmonella positive with SAM medium were 43 (17.9%), less than of Rappaport-Vassiliadis broth 53 (22.6%). Statistical calculation according to the McNemar test shows a χ^2 value of 2.89, which is not significant at the 0.05 level of significance.

Several studies have shown that motility enrichment is at least as productive as and in some cases even superior to the cultural procedure for Salmonella detection from foods (De Smedt et al., 1986; De Zutter et al., 1991; Perales and Erkiaga, 1991). The results of the present study partly agree with these findings.

We observed almost pure *Salmonella* cultures on DCA after enrichment of sample in SAM medium. The other advantage of SAM medium is that it is possible to obtain presumptive results after 48 hrs from the beginning of pre-enrichment. The possibility to obtain presumptive results within a short time is by direct screening of polyvalent salmonella antisera with the culture from SAM medium or after growth of the migrated culture in nutrient broth. SAM medium enables routine examinations of a large number of samples in a moderately equipped laboratory, bearing in mind that, since it is based on the principle of motility, it is not reliable for the detection of nonmotile *Salmonellas*.

References

- D' Aoust, J. Y.: Update on preenrichment and selective enrichment condition of *Salmonella* in foods. *J. Fd Protec.*, 44, 1981: 369-374.
- De SMEDT, J. - BOLDERDIJK, R. F. - RAPOLLD, H. - LAUTENSCHLAEGER, D.: Rapid salmonella detection in foods by motility enrichment on a modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium. *J. Fd Protec.*, 49, 1986: 510-514.
- DE ZUTTER, L. - DE SMEDT, J. M. - ABRAMS, R. - BECKERS, H. - CATTEAU, M. - DE BORCHGRAVE, J. - DEBEVERE, J. - HOEKSTRA, J. - JONKERS, F. - LENGES, J. - NOTERMANS, S. - VAN DAMME, L. - VANDERMEERSCH, R. - VERBRAEKEN, R. - WAES, G.: Collaborative study on the use of motility enrichment on modified semisolid Rappaport-Vassiliadis medium for the detection of *Salmonella* from foods. *Int. J. Fd Microbiol.*, 13, 1991: 11-20.
- EDEL, W. - KAMPELMACHER, E. H.: Comparative studies on the isolation of sublethally injured salmonella in nine European laboratories. *Bull. WHO*, 48, 1973: 167-174.
- FRICKER, C. R.: A review. The isolation of salmonellas and campylobacters. *J. Appl. Bacteriol.*, 63, 1987: 99-116.
- HARVEY, R. W. S. - MAHABIR, D. E. - PRICE, T. H.: A method of secondary enrichment for salmonellas independent of selectively toxic chemicals. *J. Hyg. (Camb.)*, 64, 1966: 361-366.
- OOSTEROM, J.: Epidemiological studies and proposed preventive measures in the fight against human salmonellosis. *Int. J. Fd Microbiol.*, 12, 1991: 41-52.
- PAKÁNOVÁ, M. - PATAKY, A.: Použití pody MAL a SAM pri diagnostike salmonel. *Veterinářství*, 32, 1982: 376-378.
- PERALES, I. - AUDICANA, A.: Evaluation of semisolid medium for detection of *Salmonellae* in meat products. *Int. J. Fd Microbiol.*, 5, 1989: 316-319.
- PERALES, I. - ERKIAGA, E.: Comparison between semisolid Rappaport and modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis media for the isolation of *Salmonella* spp. from foods and feeds. *Int. J. Fd Microbiol.*, 14, 1991: 51-58.
- STUART, P. F. - PIVNIC, H.: Isolation of salmonellae by selective motility systems. *Appl. Microbiol.*, 13, 1965: 365-372.
- ŠVASTOVÁ, A. - SKALKA, B. - SMOLA, J.: A modified medium for *Salmonella*-isolation by the selective motility test. *Zbl. Vet.-Med., R. B.*, 31, 1984: 396-399.

VASSILIADIS, P. - PATERAKI, E. - PAPAICONOMOU, N. - PAPADAKIS, J. - TRICHOPOULOS, D.: Nouveau procédé d' enrichissement de Salmonella. Ann. Inst. Pasteur Microbiol., 127B, 1976: 159-200.

Arrived on 2nd Feb. 1994

TADESSE, W. M. - ČÍŽEK, A. (Vysoká škola veterinární a farmaceutická, Brno):
Izolace salmonel z jatečné drůbeže a zařízení drůbežích jatek dvěma postupy.
Vet. Med. - Czech, 39, 1994 (6): 315-320.

Konvenční metodou a postupem, který zahrnoval selektivní pomnožení v modifikované polotuhé Rappaportově půdě (SAM) bylo vyšetřeno 235 vzorků odebraných z čerstvě poražené drůbeže a zařízení drůbežích jatek (stěry, oplachy a orgány). Oběma postupy byly salmonely prokázány v 61 (26 %) vzorcích. Úroveň kontaminace salmonelami představovala u oplachů z jatečné drůbeže 35,5 %, u stěrů ze zařízení 32,0 % u tkání orgánů 31,0 % a u stěrů z jatečné drůbeže 19,7 % vzorků. Bylo prokázáno dvanáct různých sérotypů salmonel, nejčastěji byly izolovány *S. saint paul* (26 %) a *S. enteritidis* (23 %). Mezi oběma postupy nebyl prokázán statisticky významný rozdíl.

salmonely; motility medium; Rappaport - Vassiliadisova půda; jatečné zpracování drůbeže

Contact Address:

MVDr. Alois Č í ž e k , CSc., Vysoká škola veterinární a farmaceutická, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic
Tel. 05 41321107, fax 05 41211151

ZVÝŠENÍ OBRANYSCHOPNOSTI BROJLERŮ PO PODÁVÁNÍ BIOLOGICKÝCH KRMNÝCH DOPLŇKŮ

V. Kotrbáček, R. Halouzka, V. Jurajda, Z. Knotková, J. Filka

Vysoká škola veterinární a farmaceutická, Brno

V experimentech na 90 brojlerch jsme ověřovali vliv biologických krmných doplňků na somatický růst a vybrané ukazatele obranyschopnosti. Prvé pokusné skupině ($n = 30$) bylo do komerčních krmných směsí BR I. a BR II. přidáno 0,5 % sušené biomasy řas (*Chlorella vulgaris*). Oproti kontrolám ($n = 30$) byl zaznamenán průkazný vzestup živé hmotnosti pokusných jedinců na konci druhého týdne života ($p < 0,05$). Významně se u nich zvýšila fagocytární aktivita leukocytů ($p < 0,01$) a stimuloval vývoj střevní lymfatické tkáně a Harderovy žlázy. U druhé pokusné skupiny ($n = 30$), kde kromě 0,2 % *Ch. vulgaris* bylo přidáváno 0,9 % šetrně sušeného kravského mleziva a 0,9 % stejným způsobem sušených pivovarských kvasnic, nedošlo k průkaznému ovlivnění růstu živé hmotnosti. Ještě výrazněji než u první pokusné skupiny však vzrostla fagocytární aktivita leukocytů ($p < 0,01$) a byl prokázán i silný stimulační vliv na vývoj lymfatických tkání. Kromě toho byla u těchto jedinců nalezena zvýšená hladina specifických protilátek jako odpověď na vakcinaci Newcastleskou nemocí ($p < 0,05$). Hematologické hodnoty nebyly biologickými přídatky podstatněji ovlivněny.

Chlorella vulgaris; pivovarské kvasnice; mlezivo; lymfatická tkáň; leukocyty

O nutričním významu takových biologických krmných doplňků, jako jsou kvasnice, mlezivo, krev nebo sladkovodní řasy, bylo již publikováno mnoho údajů. Společnou charakteristikou těchto produktů je vysoký obsah dusíkatých látek, jejich příznivé aminokyselinové složení, vysoká stravitelnost a značné zastoupení vitaminů a minerálů. Kromě toho jsou biologické komponenty ceněny jako donátory látek působících specificky. Mlezivo je známým zdrojem imunoglobulinů, řasy rodu *Chlorella* mimo jiné obsahují tzv. *Chlorella* růstový faktor, v krevním séru je pestrá škála protilátek, enzymů, hormonů a dalších komponentů. Využitelnost těchto specifických látek v organismu je však malá vzhledem k tomu, že v procesu konzervace většina z nich je narušena nebo zcela zničena vysokými teplotami. I když byly činěny pokusy uplatnit šetrnější konzervační postupy, např. lyofilizaci, výsledek nesplnil očekávání z ekonomického hlediska. Např. cena 1 kg mleziva sušeného lyofilizací přesahuje 600 Kč, což předem vylučuje jeho širší praktické využití.

V posledních letech došlo k zavedení nových konzervačních postupů. Lze jmenovat např. chemickou konzervaci krve jatečných zvířat. Ta obchází tepelné zpracování krve, přičemž zaručuje její zdravotní nezávadnost (V r c h l a b s k ý , 1992). Široké možnosti rovněž nabízí fluidní sušení biologických materiálů, při kterém lze jejich cenné komponenty chránit před tepelnou degradací (K o t r b á - č e k a j . , 1988; P i š t ě l á k a j . , 1991). Produkty uvedených postupů bylo však třeba ověřit v pokusech na zvířatech. Nešlo o klasické sledování výživné hodnoty takto konzervovaných biologických krmných doplňků, ale spíše o zjišťování účinků specifických, které by rozšířily dosavadní znalosti a představy o tom, jak tyto látky v organismu působí.

Jako model sloužili v našich prvních experimentech brojleři. Sledovali jsme u nich vliv přísadků řasové biomasy, fluidně sušených pivovarských kvasnic a stejným způsobem připravovaného mleziva na vybrané hematologické ukazatele, na obranyschopnost a vývoj lymfatických tkání.

MATERIÁL A METODY

Z 11 000 brojlerů Hybro zastavených do výkrmu bylo náhodně vybráno 90 kusů pokusných jedinců. Čtyřdenní kuřata byla převezena do pokusné odchovny a rozdělena do tří skupin. Prvé pokusné skupině P1 ($n = 30$; 18 ♂ a 12 ♀) bylo ke komerčním krmným směsím BR I., zkrmované do konce třetího týdne, a BR II., podávané jedincům starším, přidáváno 0,5 % sušené biomasy řas (*Ch. vulgaris*). Druhé pokusné skupině P2 ($n = 30$; 15 ♂ a 15 ♀) bylo do těchto směsí přidáno 0,2 % biomasy řas, 0,9 % fluidně sušeného kravského mleziva a 0,9 % fluidně sušených pivovarských kvasnic. Třetí, kontrolní skupina ($n = 30$; 18 ♂ a 12 ♀) dostávala pouze krmné směsi komerční.

Kuřata byla držena na podestýlce z hoblin, krmena a napájena *ad libitum*. Spotřeba směsi byla denně vážena. Hmotnost kuřat byla zjišťována individuálně, a to při zahájení experimentu, na konci prvního týdne života a dále v týdenních intervalech.

Ve věku 22 dnů byla kuřatům všech tří skupin aplikována vakcína proti Newcastleké nemoci (Avipest, Mevak Nitra). Ve 33., 46. a 56. dnu byla zjišťována hladina specifických protilátek v krevním séru hemaglutinačním inhibičním testem (B e a r d , 1980).

Ve věku 21, 33 a 56 dnů bylo z každé skupiny 10 jedinců utráceno dekapitací. V odebraných vzorcích krve jsme stanovili základní hematologické hodnoty a obsah cholesterolu v krevním séru. Dále byla zjišťována fagocytární aktivita leukocytů a to pomocí 2-hydroxyetylmetakrylátových částic.

V daných intervalech byla zjišťována hmotnost Fabriciovy burzy a sleziny a kuřata byla patologickomorfologicky vyšetřena. Na histologické vyšetření jsme odebírali vzorky thymu, Fabriciovy burzy, sleziny, ileocékální chlopně, Mecke-

lova divertikulu, Harderovy žlázy, gonád a nadledvin. Po fixaci v 10% neutrálním vodném roztoku formalínu byly vzorky zpracovány běžnou parafínovou technikou a barveny hematoxilinem a eosinem podle Giemsy a Van Giesona. Ve vyšetřovaných orgánech jsme počítali zárodečná centra a v 10 zorných polích při zvětšení 80x stanovili průměry u jednotlivých kuřat a experimentálních skupin.

VÝSLEDKY

Růst živé hmotnosti udává tab. I. V prvních týdnech života je patrná tendence kuřat obou pokusných skupin převyšovat živou hmotností kuřata kontrolní. Rozdíly dosahovaly až 8 %, většinou však ležely jen na hranicích statistické významnosti. Výjimkou byla statisticky významná diference zjištěná mezi 14denními brojlerly skupiny P1 a kontrolou ($p < 0,05$).

I. Hmotnost brojlerů (g) – Broiler live weight (g)

Věk kuřat (dny) ¹	n	K $\bar{x} \pm SD$	P1 $\bar{x} \pm SD$	P2 $\bar{x} \pm SD$	Statistická významnost ²
4	90	56,8 ± 0,90	58,1 ± 0,83	58,1 ± 1,03	K:P1 $p < 0,05$
7	90	83,6 ± 1,69	88,1 ± 1,47	87,7 ± 1,76	
14	90	190,0 ± 4,79	205,8 ± 4,75	201,3 ± 4,87	
21	90	415,3 ± 11,32	438,1 ± 9,77	433,9 ± 9,03	
28	60	714,0 ± 23,41	776,0 ± 22,38	744,0 ± 20,19	
33	60	1 066,0 ± 34,66	1 123,0 ± 33,62	1 083,0 ± 29,81	
35	30	1 236,0 ± 56,56	1 260,0 ± 51,54	1 252,0 ± 43,12	
42	30	1 798,0 ± 64,54	1 664,0 ± 61,65	1 764,0 ± 67,66*	
49	30	2 270,0 ± 86,01	2 279,0 ± 95,08	2 237,0 ± 79,88*	
56	30	2 870,0 ± 87,63	2 779,0 ± 118,86	2 769,0 ± 99,35*	

* = v důsledku postupného zabíjení zvířat došlo ke snížení počtu kohoutů u P1 a P2 – due to gradual killing of the birds the number of cocks decreased in P1 and P2

¹ age of chickens (days), ² statistical significance

V růstu hmotnosti Fabriciovy burzy a sleziny nebyly mezi skupinami kuřat zjištěny signifikantní rozdíly, i když je třeba uvést, že s postupujícím věkem se rozdíly zvyšovaly ve prospěch obou pokusných skupin (tab. II).

Hematologické ukazatele ani obsah cholesterolu v krevním séru nebyly přídavkem biologických doplňků výrazně změněny. Výjimkou byl průkazně vyšší hematokrit u 33denních kuřat skupiny P1 a P2 vůči kontrolám.

II. Hmotnost sleziny a Fabriciovy burzy brojlerů (g) – The weight of spleen and bursa Fabricii in broilers (g)

Věk kuřat (dny) ¹		P1	P2	K
		$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
21	slezina ²	0,35 ± 0,06	0,40 ± 0,07	0,41 ± 0,10
	F. burza ³	1,19 ± 0,30	1,16 ± 0,25	0,97 ± 0,29
33	slezina	1,37 ± 0,28	1,29 ± 0,30	1,32 ± 0,35
	F. burza	2,83 ± 0,72	2,39 ± 0,50	2,31 ± 0,84
56	slezina	3,50 ± 0,92	3,70 ± 0,76	3,00 ± 0,42
	F. burza	4,30 ± 1,02	5,00 ± 1,29	4,20 ± 1,05

¹age of chickens (days), ²spleen, ³bursa F.

Přídavek řas a zejména pak řasy v kombinaci s pivovarskými kvasnicemi a mlezivem výrazně zvyšovaly fagocytární schopnost leukocytů (obr. 1). Vysoce významné rozdíly ($p < 0,01$) byly zaznamenány u jedinců 21 a 33denních. V 56. dnu pak rozdíly mezi skupinami P2 a K již klesly na hranici významnosti a mezi skupinami P1 a K pod tuto hranici. Na specifickou zátěž, jakou představovala vakcinace virem Newcastleké choroby, byla odezva méně výrazná (obr. 2). Nejvyšší titr protilátek byl zaznamenán ve 33. dnu života. Významnost rozdílů byla doložena mezi skupinou P2 a kontrolní skupinou ($p < 0,05$).

Počet zjišťovaných zárodečných center v periferních lymfatických orgánech uvádí tab. III. Z ní jsou patrné rozdíly mezi pokusnými a kontrolními skupinami

III. Průměrný počet zárodečných center v periferních lymfatických orgánech experimentálních brojlerů – Average number of germinal centers in the peripheral lymphatic organs of experimental broilers

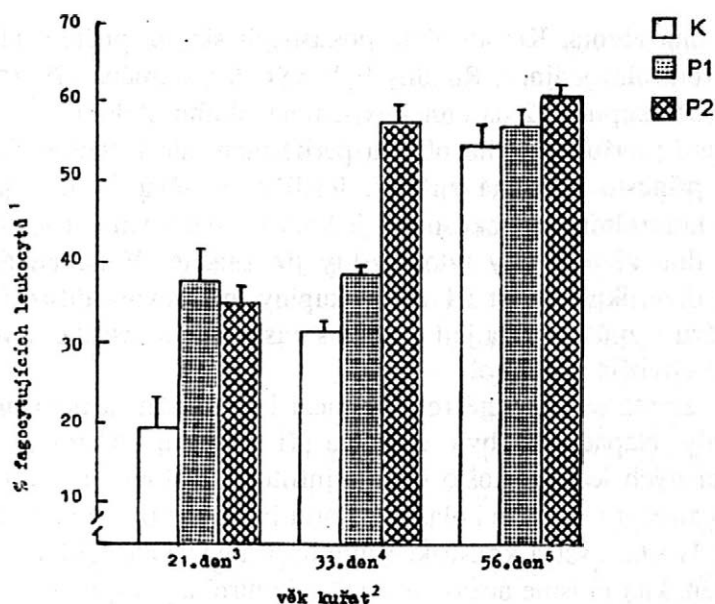
Věk (dny) ¹	P1			P2			K		
	SI	ICCH	MD	SL	ICCH	MD	SL	ICCH	MD
21	1,5	3,0	0,0	1,5	3,0	0,0	1,5	3,0	0,0
33	1,3	4,5	0,3	1,3	4,5	0,3	1,5	3,5	0,0
56	3,2	6,8	1,2	4,3	8,5	4,5	2,0	3,0	0,8

SI = slezina – spleen

ICCH = ileocékální chlopeň – ileocecal valve

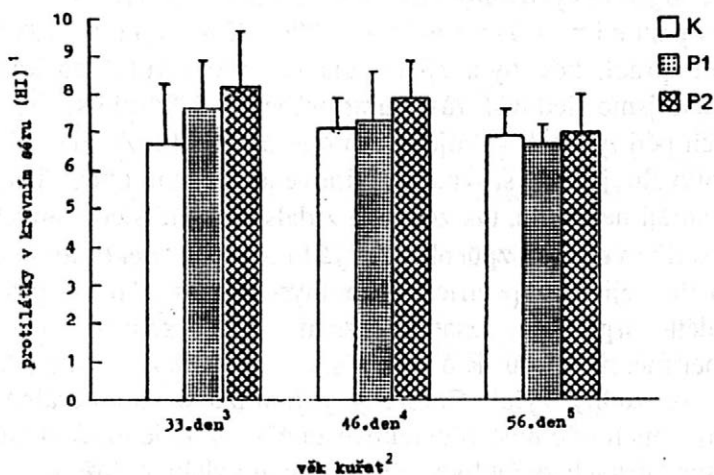
MD = Meckelův divertikul – Meckel's diverticulum

¹age (days)



1. Fagocytární aktivita leukocytů brojlerů; 21. den K:P1 = $p < 0,01$; K:P2 = $p < 0,01$; 33. den K:P1 = $p < 0,01$; K:P2 = $p < 0,01$; P1:P2 = $p < 0,01$; 56. den K:P2 = hranice významnosti – Phagocytic activity of broiler leucocytes: day 21 K:P1 = $p < 0,01$; K:P2 = $p < 0,01$; $p < 0,01$; day 33 K:P1 = $p < 0,01$; K:P2 = $p < 0,01$; P1:P2 = $p < 0,01$; day 56 K:P2 = significance level

¹% of phagocytising leucocytes, ²age of chickens, ³day 21, ⁴day 33, ⁵day 56



2. Hladina protilátek v krevním séru brojlerů; 33. den K:P2 = $p < 0,05$ – The level of antibodies in blood serum of broilers; day 33 K:P2 = $p < 0,05$

¹antibodies in blood serum, ²age of chickens, ³day 33, ⁴day 46, ⁵day 56

ve 33. a 56. dnu života. Kuřata obou pokusných skupin počtem těchto center převyšovala kontrolní jedince. Rozdíly byly výrazné zejména při srovnání kontrolní a pokusné skupiny P2 na konci experimentálního období.

Vyhodnocení morfologického obrazu periferních, ale i centrálních lymfatických orgánů přineslo obdobná zjištění. Jestliže ve věku 21 dnů jsme zjevné rozdíly mezi kontrolními a pokusnými jedinci nepozorovali, u vzorků odebraných ve 33. dnu života byly tyto rozdíly již značné. V ileocekální chlopni a Meckelově divertikulu kuřat P1 a P2 skupiny infiltrovala difuzní lymfatická tkáň submukózu a způsobovala její elevaci s následnou konstrikcí lumina. Taková infiltrace chyběla u kontrol.

V 56. dnu života se popsané rozdíly mezi kontrolními a pokusnými kuřaty dále zvětšovaly. Nápadné to bylo zejména při srovnání kontrol a skupiny P2. U těchto pokusných jedinců došlo k silné infiltraci svalové vrstvy střeva i jeho submukózy lymfocyty. Výrazná plazmocytární infiltrace byla pozorována v Harderově žláze, tvorba cyst a konstriktce lumina v ileocekální chlopni. Ektopická lymfatická tkáň, kterou jsme nezaznamenali u kontrol a jen sporadicky u skupiny P1, zde byla běžným nálezem.

U poloviny kontrolních kuřat byly nalezeny známky involuce thymu s výraznou lymfocytodeplecí kory. U několika jedinců byla kromě toho zaznamenána akutní ileitida s atrofií murální lymfatické tkáně.

DISKUSE

Většina autorů, zabývajících se nutričním významem řas u brojlerů, udává jejich malý nebo jen nevýznamný vliv na akceleraci růstu živé hmotnosti (K o č í a j., 1964; L i p s t e i n a H u r w i t z , 1980; C h r a p p a , 1989). Na rozdíl od zmíněných prací, kde byla zjišťována hmotnost kuřat na konci výkrmu, v našem pokusu jsme sledovali růst kuřat průběžně. Ukázalo se, že přídavek řas může v prvních pěti týdnech vývoje růst brojlerů urychlit. Že zřejmě nejde o vliv nutriční, vyplývalo jak ze srovnání živinového složení obou diet, které naše aditiva podstatněji neměnila, tak zejména z dalších námi sledovaných ukazatelů. Přídavek řas totiž výrazným způsobem zvýšil fagocytární aktivitu leukocytů mladých kuřat a tím jejich nespecifickou obranyschopnost. To má pro zdárný růst a vývoj mladého organismu zásadní význam. V této souvislosti je třeba uvést výsledky experimentů autorů R o t k o v s k á a j. (1989), V a c e k a j. (1990), kteří zjistili, že vodný výluh *Chlorelly* jednorázově parenterálně aplikovaný myším zvyšuje jejich odolnost vůči takové zátěži, jakou je ozáření gama paprsky. Rovněž u hospodářských zvířat byly účinky tohoto výluhu doloženy. S m r č e k a Š t ě p e k (1981) pozorovali výrazné zlepšení zdravotního stavu selat a B o u š k a (1988) zaznamenal vzestup počtu leukocytů u experimentálních telat.

Směs řas s pivovarskými kvasnicemi a mlezivem sledovaný imunostimulační efekt brojlerů nejen zvýraznil, ale posunul i do starších věkových skupin. Při

zmíněné kombinaci biologických aditiv byl kromě toho nalezen průkazný vzestup titru specifických protilátek jako odpověď na předchozí vakcinaci virem Newcastle'ské choroby.

Výsledky morfologického semikvantitativního hodnocení vzorků orgánů pokusných kuřat prokázaly výrazný stimulační efekt řas samotných a směsi řas s dalšími doplňky na vývoj lymfatické tkáně. Nejvýraznější účinek jsme pozorovali v intestinální lymfatické tkáni a Harderově žláze. Spočíval ve zvýšené proliferaci jak zárodečných center, tak difuzní lymfatické tkáně. U kuřat, kterým byla podávána aditiva, jsme v průběhu pokusu nezjistili žádné patologické změny na orgánech na rozdíl od nálezů zánětlivých změn střeva u kontrol, kde byly navíc pozorovány i známky involuce thymu. Zvýšená proliferace lymfatické tkáně a vyšší produkce protilátek u kuřat P1 a P2 svědčila o imunogenním účinku podávaných, šetrně konzervovaných biologických doplňků.

Z experimentu uzavíráme, že přídatek řas nebo směsi řas se šetrně sušenými pivovarskými kvasnicemi a stejným způsobem konzervovaným kravským mlezivem do krmné dávky brojlerů může příznivě ovlivňovat jejich růst a vývoj, a to zejména v prvních týdnech jejich života. Vliv na růst živé hmotnosti je spíše nepřímý. Primární efekt spočívá ve stimulaci celulární a zřejmě i humorální imunity.

Literatura

- BEARD, C. W.: Serology procedures. In: ITCHNER, S. B. et al.: Isolation and Identification of Avian Pathogens. 2nd ed. AAAP, Texas, Univ. Coll. State 1980: 40-135.
- BOUŠKA, J.: První výsledky klinicko-biochemických sledování preparátu Ivastimul v provozních podmínkách odchovu telat. Veterinářství, 1, 1988: 19-29.
- CHRAPPA, V.: Produkční účinek skrmování sušených řas (*Chlorella*) u brojlerových kuřat. Živoč. Výr., 34, 1989: 271-278.
- KOČÍ, E. - PETER, V. - KOČÍ, Š.: Použití sušených řas jako náhrady za rybiu múčku a sójový extrahovaný šrot v krmné zmesi pro výkrmové kuřčata. Živoč. Výr., 9, 1964: 569-576.
- KOTRBÁČEK, V. - RAŠKA, M. - VESELÝ, J.: Způsob konzervace mleziva. AO 268488, 1988.
- LIPSTEIN, B. - HURWITZ, S.: The nutritional value of algae for poultry. Dried *Chlorella* in broiler diets. Brit. Poult. Sci., 21, 1980: 9-21.
- PIŠTĚLÁK, M. - KOTRBÁČEK, V. - RAŠKA, M. - ŠTASTNÝ, J.: Způsob zpracování tekutých stažkových pivovarských kvasnic. PV 3010, 1991.
- ROTKOVSKÁ, D. - VACEK, A. - BARTONÍČKOVÁ, A.: The radioprotective effects of aqueous extract from chlorococcal freshwater algae (*Chlorella kessleri*) in mice and rats. Strahlenther. Onkol., 165, 1989: 813-816.
- SMRČEK, Č. - ŠTĚPEK, M.: Uplatnění sladkovodních řas ve výkrmu jatečných prasat. Náš chov, 5, 1981: 164-166.
- VACEK, A. - ROTKOVSKÁ, D. - BARTONÍČKOVÁ, A.: Radioprotection of hemopoiesis conferred by aqueous extract from chlorococcal algae (Ivastimul) administered to mice before irradiation. Exp. Hematol., 18, 1990: 234-237.
- VRCHLABSKÝ, J.: Osobní sdělení. 1992.

Došlo 31. 1. 1994

KOTRBÁČEK, V. - HALOUZKA, R. - JURAIDA, V. - KNOTKOVÁ, Z. - FILKA, J.
(University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno):

Enhancement of defence mechanisms in broilers after administration of biological feed supplements.

Vet. Med. - Czech, 39, 1994 (6): 321-328.

The trial involved broilers from the 4th to the 56th day of life. The first group P1 ($n = 30$) received commercial mash with supplements of 0.5% biomass of fresh-water algae (*Chlorella vulgaris*). The second group P2 ($n = 30$) received 0.9% dried cow's colostrum and 0.9% dried brewer's yeasts in addition to the algae (0.2%). All the ingredients came from fluid-bed drying at temperatures maximally 50 °C. Control group K ($n = 30$) consisted of broilers which received commercial mash only.

At the age of 21, 33 and 56 days, 10 birds of each group were killed, and basic hematological values were determined in the blood samples and phagocytic activity of leucocytes was determined. Samples of the thymus, bursa Fabricii, spleen, ileocecal valve, Meckel's diverticulum, gonads, suprarenal glands and Harder's gland were subjected to histological examination. 22-day chickens of all three groups were vaccinated with Newcastle disease (the vaccine Avipest, Mevak Nitra) and the levels of specific antibodies in blood serum were determined on days 33, 46 and 56.

0.5% alga supplement to feed ration increased the live weight of experimental broilers at the end of the second week of life only ($p < 0.05$). On the 21st and 33rd day of life, phagocytic activity of leucocytes increased significantly ($p < 0.01$) in these individuals, while in the second month of life development of the intestinal lymphatic tissue and Harder's gland was largely stimulated. Combination of algae with other biological additives did not significantly influence the live weight of broilers, but it enhanced the above-mentioned effect on the phagocytic activity and lymphatic tissue development. Besides, a significant increase in specific antibodies as a reaction to Newcastle disease vaccination was demonstrated on day 33 in this experimental group ($p < 0.05$). The hematological values nor cholesterol levels were influenced by the biological supplements to any larger extent. The growth of bursa Fabricii and spleen was not significantly influenced either even though the differences were increasing with age in favor of the experimental birds.

Chlorella vulgaris; brever's yeast; colostrum; lymphatic tissue; leucocytes

Contact Address:

Doc. ing. Václav K o t r b á č e k, CSc., Vysoká škola veterinární a farmaceutická, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic
Tel. 05 41321107, fax 05 41211151

BIOKLÍMA VÝKRMNE BROJLEROVÝCH KURČIAT A JEJ VPLYV NA MYKOTICKÚ KONTAMINÁCIU

E. Čonková

Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice

V priebehu jedného výkrmového turnusu brojlerových kurčiat boli sledované vzájomné súvislosti medzi bioklimatickými parametrami maštalného prostredia a výskytom mikroskopických húb. Z maštalného vzduchu boli vykultivované xerofilné aj hydrofilné druhy mikroskopických húb. Ich prítomnosť bola ovplyvnená predovšetkým hlavnými zdrojmi kontaminácie maštalného prostredia - kŕmnymi zmesami a podstielkou. V kŕmnych zmesiach boli diagnostikované skladištné druhy mikroskopických húb (penicília, aspergily), ako aj poľné druhy (fuzária, alternárie). Na začiatku turnusu dominovali hlavne xerofilné penicilínové druhy. Na konci turnusu prevládali kvasinky. Vo vyšetrovaných vzorkách prachu najväčšiu frekvenciu výskytu mal rod *Penicillium*.

výkrm kurčiat; bioklíma; zdroje mikromycét; obsah NH_3 a CO_2 vo vzduchu

Dosahovanie maximálnej úžitkovosti a udržanie dobrého zdravotného stavu hydiny je podmienené nielen úspešnou šľachtiteľskou prácou a genetickými vlastnosťami hydiny, ale aj tvorbou optimálneho maštalného prostredia. Dôležitými faktormi bioklímy sú: teplota, relatívna vlhkosť, prúdenie vzduchu, chemické a bakteriálne zloženie vzduchu. Významnú úlohu zohráva aj kontaminácia prostredia mikroskopickými hubami, ktoré vo vhodných podmienkach prostredia sú schopné nielen sa rozmnožovať, ale aj negatívne ovplyvniť zdravie hospodárskych zvierat. Pôsobením mikroskopických húb v organizme zvierat môže dôjsť ku vzniku mykóz. Ochorenia však môžu byť vyvolané aj sekundárnymi metabolitmi mikroskopických húb, toxínmi, účinkom ktorých vznikajú mykotoxikózy.

Zdrojom mikroskopických húb v maštálnom prostredí je predovšetkým kŕmivo a podstielka, ale na prenose sa môžu zúčastniť aj vtáci, hlodavci, ako aj ošetrojúci personál (G e d e k , 1980).

Cieľom práce bolo sledovať a vyhodnotiť maštalnú mikroklímu vo vzťahu k mykotickej kontaminácii prostredia na hydínarskej farme zameranej na chov výkrmových brojlerových kurčiat.

MATERIÁL A METÓDA

V priebehu jedného výkrmového turnusu brojlerových kurčiat od 28. 4. do 11. 6. 1993 bola v týždňových intervaloch ambulantne vyšetrovaná denná dynamika bioklimatických parametrov. V sledovanom objekte bolo na podstielke umiestnených 12 000 kurčiat s biologickým zaťažením 24 ks/m^2 . Podstielku, ktorá bola založená tesne pred osadením haly vo výške 5-10 cm, tvorili hoblíny z mäkkého dreva. Meraniami sa zisťoval stav teploty, relatívnej vlhkosti vzduchu, obsah CO_2 a NH_3 . Na stanovenie mykotickej kontaminácie boli odoberané vzorky kŕmnych zmesí, podstielky a sedimentovaného prachu.

Relatívna vlhkosť a teplota boli merané digitálnym termohydrometrom (Therm 2286-2) v dvojhodinových intervaloch (8,00; 10,00; 12,00; 14,00; 16,00). Prítomnosť CO_2 v maštalnom vzduchu sa stanovovala titračnou metódou a NH_3 farebnou reakciou pH papierikov (P a r a a kol., 1991). Koncentrácie maštalných plynov boli zisťované o 8,00; 12,00 a 16,00 hodine. Merania boli vykonávané na troch miestach pozdĺžnej stredovej osi maštale.

Počet mikroskopických húb v 1 m^3 maštalného vzduchu bol stanovovaný sedimentačnou metódou na troch miestach haly a prepočítaný vzorcom podľa S p u r n é h o (1961).

Vzorky kŕmnych zmesí boli odoberané z dvoch zásobníkov umiestnených v hale. Podstielka bola vyšetrovaná tiež vždy z troch miest haly. Na získanie prachového sedimentu boli použité hliníkové fólie o rozmeroch $50 \times 50 \text{ cm}$, na ktoré sa prachový spád zachytával po dobu jedného týždňa.

Kvantitatívne stanovenie fungálnej kontaminácie kŕmnych zmesí, podstielky a prachu sa vykonávalo metódou desatinového riedenia. 10% suspenzia vzorky, ktorá bola základom pre rad riedení 10^{-2} až 10^{-4} , sa pretrepávala dve hodiny. Na riedenie sa používala sterilná peptónová voda. Banky a pipety použité pri riedení boli sterilné. Z jednotlivých riedení sa odoberal 1 ml a po 0,5 ml sa inokulovalo na povrch Sabouraudovho agaru v dvoch Petriho miskách. Po 5-7 dňoch kultivácie pri teplote 21°C sa spočítali kolónie a určil sa počet spór prepočítaný na 1 g vyšetrovanej vzorky.

Kvalitatívne mykologické vyšetrenie sa robilo metódou posypu. Sterilnou lyžičkou sa na povrch Sabouraudovho agaru naniesla tenká vrstva vyšetrovaného materiálu. Inkubácia prebiehala pri teplote 21°C a po štyroch dňoch sa vzorky posudzovali. Mikroskopická identifikácia jednotlivých rodov umožnila zistenie najčastejšie sa vyskytujúcich mikroskopických húb.

VÝSLEDKY

Dynamiku teploty, relatívnej vlhkosti, CO_2 a NH_3 počas sledovaného obdobia, ako aj počet mikromycét v 1 m^3 maštalného vzduchu dokumentuje tab. I. Od 2. do 6. týždňa veku kurčiat bol zaznamenaný postupný nárast mikroskopických

I. Dynamika sledovaných fyzikálnych, chemických a biologických faktorov prostredia pri výkme brojlerov – Dynamics of monitored physical, chemical and biological factors of environment in fattening of broilers

Dátum merania ¹ (týždeň turnusu) ²	Čas merania ³ (h)	Teplota ⁴ (°C)	Relatívna vlhkosť ⁵ (%)	CO ₂ (%)	NH ₃ (ppm)	Počet mikroskopických húb ⁶ (h.j./m ³)
28. 4. (1. týždeň) ⁷	8,00	23,1	47,5	0,28	0	159
	10,00	25,0	44,0	-	-	477
	12,00	25,0	45,2	0,21	0	954
	14,00	27,0	47,0	-	-	795
	16,00	27,3	50,1	0,38	0	556
6. 5. (2. týždeň) ⁸	8,00	23,4	41,0	0,46	5	318
	10,00	26,2	45,6	-	-	397,5
	12,00	26,9	47,0	0,35	5	556
	14,00	27,0	43,9	-	-	238
	16,00	26,4	44,0	0,51	10	318
13. 5. (3. týždeň) ⁹	8,00	23,9	58,0	0,54	10	798
	10,00	24,3	64,0	-	-	477
	12,00	25,1	56,0	0,45	15	159
	14,00	24,0	60,9	-	-	556,5
	16,00	25,0	62,1	0,40	50	954
21. 5. (4. týždeň) ¹⁰	8,00	20,6	59,0	0,40	15	1 431
	10,00	22,0	63,0	-	-	8 745
	12,00	22,5	56,0	0,33	15	1 828,5
	14,00	20,0	59,0	-	-	4 770
	16,00	19,0	55,0	0,48	20	6 678
27. 5. (5. týždeň) ¹¹	8,00	18,0	55,8	0,31	20	2 067
	10,00	20,6	60,3	-	-	4 314
	12,00	20,3	58,5	0,21	20	4 293
	14,00	24,3	60,1	-	-	3 816
	16,00	25,3	63,2	0,38	20	5 008
4. 6. (6. týždeň) ¹²	8,00	18,0	68,5	0,43	20	1 431
	10,00	20,0	69,0	-	-	2 558
	12,00	22,0	70,0	0,38	10	2 475
	14,00	20,0	70,0	-	-	1 325
	16,00	19,6	72,1	0,46	20	524
11. 6. (7. týždeň) ¹³	8,00	19,9	68,0	0,53	20	398
	10,00	20,0	70,0	-	-	524
	12,00	22,3	72,5	0,53	35	747
	14,00	22,6	70,0	-	-	463
	16,00	20,6	68,2	0,43	50	754

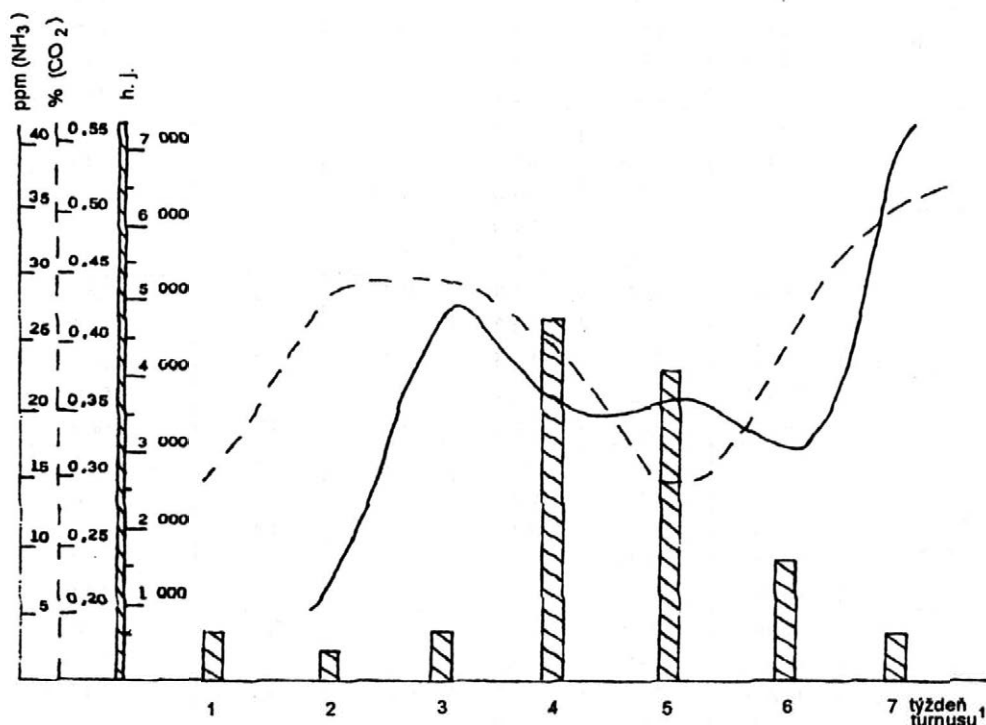
¹ date of measurement, ² week of cycle, ³ time of measurement, ⁴ temperature, ⁵ relative humidity, ⁶ number of moulds, ⁷ 1st week, ⁸ 2nd week, ⁹ 3rd week, ¹⁰ 4th week, ¹¹ 5th week, ¹² 6th week, ¹³ 7th week

húb. Najvyššie počty boli zachytené v 4. až 5. týždni. Teplota prostredia sa v tomto období ustálila, ale postupne sa zvyšovala vlhkosť prostredia.

Tab. II udáva prehľad o počtoch mikroskopických húb v 1 g kŕmnej zmesi, podstielky a prachu. Zároveň poskytuje prehľad o najčastejšie sa vyskytujúcich druhoch mikroskopických húb.

Fungálna kontaminácia kŕmnych zmesí BR 1 (sypká forma) bola v porovnaní s kŕmnymi zmesami BR 2 a BR 3 (granulovaná forma) vyššia. Kontaminácia prachového spádu kolísala v závislosti od výskytu mikroskopických húb v kŕmnych zmesiach a podstielke. Počty mikroskopických húb v podstielke i v prachu, vyšetrených riediacou ako aj posypovou metódou, mali ku koncu turnusu ($2,7 \cdot 10^5$ až 0) klesajúcu tendenciu.

Výskyt mikromycét do určitej miery mohli ovplyvniť aj maštalné plyny. Vo vlhkom prostredí, pri zvýšení CO_2 a NH_3 v poslednom týždni turnusu klesal počet mikroskopických húb vo vzduchu, v podstielke i v sedimentovanom prachovom spáde.



1. Hodnoty CO_2 a NH_3 v maštalnom vzduchu a počet mikroskopických húb v 1 m^3 vzduchu namerané v priebehu turnusu – The values of CO_2 and NH_3 in stable air and the number of microscopic moulds per 1 m^3 of air measured in the course of the cycle

¹ week of cycle

II. Výskyt mikroskopických húb v 1 g kŕmnej zmesi, podstielky a prachu – Occurrence of moulds in 1 g of feeding mixture, litter, and dust

Dátum odberu ¹	Kŕmna zmes ³			Podstielka ⁴		Prach ⁵	
	Druh kŕmnej zmesi ²	Celkový počet mikroskopických húb ⁶ (h.j./g ¹)	Druhy izolovaných mikroskopických húb ⁷	Celkový počet mikroskopických húb (h.j./g ¹)	Druhy izolovaných mikroskopických húb	Celkový počet mikroskopických húb (h.j./g ¹)	Druhy izolovaných mikroskopických húb
28. 4.	BR1	4,0.10 ³	<i>M. sp.</i> <i>F. sp.</i> <i>P. sp.</i>	2,7.10 ⁵	<i>Cl. sp.</i> <i>P. sp.</i> <i>M. sp.</i>	- - -	- - -
6. 5.	BR1	6,0.10 ³	<i>A. fumigatus</i> <i>M. sp., P. sp.</i> <i>Rh. sp.</i>	8,0.10 ⁴	<i>M. sp.</i> <i>P. sp.</i> <i>A. fumigatus</i>	2,0.10 ⁵	<i>P. sp.</i> <i>A. fumigatus</i>
13. 5.	BR1+BR2	9,0.10 ³	<i>A. flavus</i> <i>A. fumigatus</i> <i>A. niger, Rh. sp.</i> <i>M. sp., P. sp.</i>	3,0.10 ⁴	<i>M. sp., P. sp.</i> <i>Cl. sp.</i>	2,0.10 ²	<i>P. sp.</i>
21. 5.	BR2	2,0.10 ³	<i>M. sp., P. sp.</i>	4,0.10 ⁴	<i>P. sp., Cl. sp.</i>	2,0.10 ⁵	<i>P. sp.</i>
27. 5.	BR2	1,5.10 ³	<i>M. sp., P. sp.</i>	6,0.10 ²	<i>P. sp., kvasinky</i> ⁸	5,0.10 ⁵	<i>P. sp., M. sp.</i>
4. 6.	BR2	4,0.10 ²	<i>M. sp., Al. sp., Rh. sp.</i>	0	kvasinky	3,0.10 ⁵	<i>P. sp., kvasinky</i>
11. 6.	BR3	2,0.10 ³	<i>M. sp., P. sp.</i>	0	kvasinky	0	kvasinky

A. - *Aspergillus*, Al. - *Alternaria*, Cl. - *Cladosporium*, F. - *Fusarium*, M. - *Muco*, P. - *Penicillium*, Rh. - *Rhizopus*

¹date of sampling, ²type of feeding mixture, ³feeding mixture, ⁴litter, ⁵dust, ⁶total number of moulds, ⁷species of isolated moulds, ⁸yeasts

Obr. 1 znázorňuje výkyvy hodnôt CO_2 a NH_3 , ako aj počty mikroskopických húb v maštalnom vzduchu v priebehu celého sledovaného turnusu. V 4.-5. týždni dosiahol počet mikromycét vrchol, v 6.-7. týždni je zaznamenaný ich pokles.

DISKUSIA

Mikroskopické huby pre svoj rast a rozmnožovanie vyžadujú určité podmienky prostredia. Maštalné prostredie zamerané na výkrm brojlerových kurčiat, kde optimálna relatívna vlhkosť má dosahovať 50-70 % a teplota vzduchu s postupne klesajúcou tendenciou 35-18 °C (P e t e r , 1986) vytvára optimálne podmienky pre rast a rozmnožovanie väčšiny mikroskopických húb.

Z literárnych údajov (G e d e k , 1980) vyplýva, že v takomto prostredí sa môžu nachádzať psychrofilné druhy mikroskopických húb s optimálnou teplotou rastu 20-25 °C. Najvýznamnejšími zástupcami sú fuzáriové druhy a *Cladosporium*. Z mezofilných druhov, u ktorých je optimum rastu 25-35 °C sa tu môže dať dvom najrozšírenejším mikromycétam, za ktoré B ö h m (1989) považuje *Aspergillus* a *Penicillium*. Tiež môže byť zaznamenaná aj prítomnosť fakultatívne termotolerantných druhov s optimom rastu 30-40 °C, ku ktorým C o o n e y a E m e r s o n (1964) zaraďujú napríklad zástupcov rodu *Rhizopus* a niektoré aspergily (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*).

Výskyt mikroskopických húb v maštalnom prostredí do určitej miery môže byť ovplyvnený aj maštalnými plynmi. Maximálna prípustná hodnota pri odchove brojlerov pre CO_2 je 0,25 % a pre NH_3 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (P e t e r , 1986). Hlavným zdrojom NH_3 v maštali je trus a podstielka. Na produkcii CO_2 sa podieľajú predovšetkým zvieratá. Enormne vysoké osadenie kurčiat (24 ks/ m^2) určite prispelo k zvyšovaniu koncentrácie týchto plynov. Podľa pozorovaní autorov G r a s e n a c k a S t r o h s c h e i n (1988) optimálne rozpätie osadenia je 19,0 až 20,5 ks/ m^2 . Vyššia hustota (22 a viac kurčiat) vedie spravidla k neefektívnemu využitiu krmiva, poklesu jatočnej hmotnosti a k zvýšenému úhynu kurčiat. Sledovať tieto údaje však nebolo cieľom tejto práce.

L i l l y a B a r n e t t (1951) poukázali na schopnosť klíčenia mikroskopických húb bez prítomnosti O_2 za prítomnosti N_2 . B e r n á t a i. (1986) zistili, že v obilí uskladnenom v atmosfére s N_2 sa počet mikromycét zvýšil, pričom v atmosfére s CO_2 sa udržiaval na najnižšej úrovni. Určitá koncentrácia CO_2 vo vzduchu môže spomaliť rýchlosť rastu niektorých mikroskopických húb, alebo dokonca viesť k úplnej inhibícii rastu (B ö h m , 1989).

Pri porovnaní získaných údajov s grafickým znázornením môžeme konštatovať platnosť týchto tvrdení aj v maštalnom prostredí. V období 3.-4. týždňa veku kurčiat narastal počet mikromycét a súčasne bol zaznamenaný aj zvýšený obsah NH_3 v maštalnom vzduchu. Pribúdaním CO_2 počet mikromycét v prostredí klesal.

Ďalším dôležitým faktorom pre rast a klíčenie spór mikroskopických húb je vlhkosť substrátu a prostredia. Weissbach a Kwell (1986) zistili, že pre rast niektorých druhov rodu *Aspergillus* je rozpätie 13,5-18,9 % a pre *Penicillium* 16,5-19,4 % optimálnou hranicou vlhkosti v substráte. Relatívna vlhkosť prostredia môže presahovať aj 85 %, pričom bol zachytený rast niektorých mikroskopických húb (Jesenská, 1987).

V závislosti od nárokov na obsah vody v prostredí a v substráte môžu dominovať xerofilné alebo hydrofilné druhy mikroskopických húb. Za extrémne xerofilné druhy Chelkowski (1991) považuje napríklad *Eurotium* sp. a *Aspergillus restrictus*. Mierne xerofilné sú reprezentované *A. candidus* a *A. flavus*. K slabó xerofilným priraduje napríklad *A. fumigatus*. Tieto typy mikroskopických húb charakterizujú niektorí autori (Gedek, 1980; Weissbach, 1989) ako „skladištné“ plesne. Pri zvýšení obsahu vody v prostredí a v substráte je umožnený rozvoj hydrofilných húb. Gedek (1980) ich charakterizuje ako „poľné“ plesne a zaraďuje k nim rody: *Alternaria*, *Epiccocum*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* a *Fusarium*.

Výšetrením bolo zistené, že v prostredí haly slúžiacej na odchov brojlerových kurčiat, ako aj v substrátoch (krmné zmesi, podstielka) boli zastúpené xerofilné aj hydrofilné mikroskopické huby. V sedimentovanom prachu dominovali penicília a mukorovité druhy. Menej sa vyskytovali *Cladosporium*, *Alternaria* a *Aspergillus*. Z odobraných vzoriek prachu vyšetrovaných riediacou metódou boli najčastejšie diagnostikované penicília. V krmných zmesiach prevažnú časť tvorili *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, ale aj *Alternaria* a *Fusarium*.

Z 1 g vyšetrovanej podstielky boli izolované hlavne *Penicillium*, *Mucor* a *Cladosporium*. Pred ukončením turnusu dominovali predovšetkým kvasinky. Zároveň sa v podstielke znižoval počet mikroskopických húb. Dá sa predpokladať, že neošetrovaním podstielky a pribúdaním trusu určitú úlohu zohrali aj baktérie, ktoré svojou biologickou aktivitou prispeli k vytvoreniu podmienok nepriaznivých pre rozmnožovanie mikroskopických húb.

Na základe uvedených poznatkov je možné konštatovať, že poznanie vzájomného pôsobenia fyzikálnych, chemických a biologických faktorov umožní vytvárať stále priaznivejšie prostredie pre chov hospodárskych zvierat.

Literatúra

- BERNÁT, J. - DUBOVSKÁ, A. - GREČO, V.: Skladovanie obilia v zmenenej atmosfére. Krmivárství a služby, XXII, 1986: 86-89.
- BÖHM, K. H.: Entwicklungsbedingungen für toxinbildende Pilze. Dtsch. Tierärztl. Wschr., 96, 1989: 339-341.
- COONEY, D. G. - EMERSON, R.: Thermophilic fungi, an account of their biology, activities and classification. San Francisco, London, W. H. Freeman and Comp. 1964.

- GEDEK, B.: Kompendium der medizinischen Mykologie. Berlin und Hamburg, Verlag Paul Parey 1980. 395 s.
- GRASENACK, H. - STROHSCHNEIN, R.: Möglichkeiten zur Intensivierung der Broilermast. Tierzucht, 1988: 414-416.
- CHELKOWSKI, J.: Cereal grain. Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage. Amsterdam - London - New York - Tokyo, ELSEVIER 1991: 5-118.
- JESENSKÁ, Z.: Mikroskopické huby v poživatinách a v krmivách. Bratislava, Alfa 1987. 319 s.
- LILLI, B. - BARNETT, G.: Fiziologia gribov. Moskva, Izdatel'stvo inostrannoj literatury 1951. 531 s.
- PARA, L. a kol.: Návod na praktické cvičenia zo zoohygieny. Košice, ZENIT Press 1991. 193 s.
- PETER, V. a kol.: Chov hydiny. Bratislava, Príroda 1986. 374 s.
- SPURNÝ, K. a kol.: Aerosoly. Praha, SNTL 1961. 342 s.
- WEIßBACH, F. - KWELLA, M.: Schimmelpilzbefall und Futtergetreidequalität. Teil I: Biologische Grundlagen. Tierzucht, 1986: 457-459.

Došlo 21. 2. 1994

ČONKOVÁ, E. (University of Veterinary Medicine, Košice):

Bioclimate of the hall for broiler chickens and its influence on mycotic contamination.
Vet. Med. - Czech, 39, 1994 (6): 329-336.

Consequences between climate parameters of stable environment and mould occurrence were monitored during one fattening cycle. Xerophilic and hydrophilic species of moulds were diagnosed in the stable air. Their presence was especially influenced by contaminated feeding mixtures and litter. Mostly the „storage“ species of moulds (*Penicillium*, *Aspergillus*) but also the „field“ species (*Fusarium*, *Alternaria*) were isolated from the feeding mixtures. Xerophilic *Penicillium* species as well as hydrophylic species, e.g. *Cladosporium* dominated in litter in the beginning of the cycle. Yeasts dominated in the end of the cycle. In examined samples of sedimented dust, the highest frequency of occurrence was in *Penicillium* germs.

broiler fattening; bioclimate; sources of micromycetes

Contact Address:

MVDr. Eva Č o n k o v á , Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73,
041 81 Košice, Slovak Republic
Tel. 095 32111-15, fax 095 767675

EPIZOOTOLOGIE A PATOGENEZE AVIÁRNÍ MYKOBAKTERIÓZY HAVRANA POLNÍHO (*CORVUS FRUGILEGUS*)

K. Hejlíček, F. Tremel, L. Černý

Vysoká škola veterinární a farmaceutická, Brno

V průběhu let 1966–1985 byl sledován výskyt aviární mykobakterií u havrana polního (*C. frugilegus*). Bylo vyšetřeno patologickomorfologicky a kultivačně 188 jedinců ulovených ve třech různých lokalitách České republiky. Patologickoanatomické změny byly nalezeny u pěti havranů (2,6 %), *M. avium* izolováno z 10 havranů (5,3 %). Pozitivní nálezy se vyskytovaly v každé vyšetřované lokalitě. Vnímavost havrana k infekci *M. avium* byla pak ověřena experimentálními infekcemi. Po intramuskulární infekci suspenzí *M. avium* byly nalezeny makroskopické tuberkulózní změny v místě vpichu, histologické změny na začátku pokusu (12. až 35. den) v játrech a ve slezině. Mykobakterie byly izolovány z různých orgánů a tkání, častěji na začátku pokusu. Perorální infekcí krmivem kontaminovaným játry tuberkulózního kura se nepodařilo vyvolat tuberkulózní změny a jen ojedinělý byl průkaz *M. avium* po 157 dnech z orgánů. Kontakt havrana polního s tuberkulózním kurem nevedl po 238 dnech ke vzniku tuberkulózních změn a ani nebyly prokázány ve tkáních havranů mykobakterie. Podle výsledků experimentálních infekcí je havran polní ve srovnání např. s vrabcem domácím, vrabcem polním a bažantem obecným velmi resistentní k infekci *M. avium*. Poměrně častý výskyt tuberkulózních procesů či mykobakterií u havranů polních ulovených ve volné přírodě je pravděpodobně podmíněn možností opakovaného, častého kontaktu havrana polního s kontaminovaným prostředím při jeho větší délce života. Havrana polního nutno považovat za významný zdroj mykobakterií zejména tam, kde jedinci přicházejí ve větších počtech do kontaktu s krmivem pro domácí zvířata.

havran polní (*Corvus frugilegus*); aviární mykobakterií; epizootologie; patogenese

Volně žijící ptáci se mohou významným způsobem podílet na šíření a cirkulaci aviárních mykobakterií. Pozornost je věnována především synantropním druhům, přicházejícím celoročně nebo sezónně do přímého či nepřímého kontaktu s domácími zvířaty. Jedním z nich je i havran polní (*Corvus frugilegus*), zimující v některých oblastech České republiky v hojných počtech v období od října do března. Havrani zalétají do těsné blízkosti stájí pro zvířata, zejména ke zdrojům krmiv jako jsou např. silážní jámy. Při tom značně kontaminují prostředí svými exkrementy a mohou tak přenášet a šířit různé původce infekčních chorob, mezi nimi i aviární mykobakterie.

Tuberkulózu havrana polního popsala řada autorů (Riegler, 1917; Bohl, 1925; Plum, 1942; McDiarmid, 1948; Wilson, 1960; Švrček aj., 1966; Rankin a McDiarmid, 1966; Michajlova,

1976; K o v a č i ě aj., 1985; K o v a č i ě a L a c k o v i ě, 1986). Pozornost byla věnována i rozšíření tuberkulózy, resp. mykobakterií v populacích havrana. R i e g l e r (1917) vyšetřil 25 havranů a u pěti zjistil tuberkulózu. P l u m (1942) vyšetřil sedm jedinců a v jednom případě prokázal mykobakterie. R a n k i n a M c D i a r m i d (1966) našli tuberkulózu u 10 % vyšetřovaných ptáků. K o v a č i ě aj. (1985) při objasňování výskytu aviární mykobakteriální infekce na farmě prasnic prokázali tuberkulózní změny u jednoho z 23 vyšetřených havranů. Z havranů izolovali stejný sérotyp *M. avium* jako z tuberkulózních změn prasat. Uvedené údaje ukazují na značný výskyt tuberkulózy, resp. aviárních mykobakteriálních infekcí u havrana polního. Nesetkali jsme se však s prací, zkoumající vnímavost havrana k aviárním mykobakteriím a patogenezi procesu.

Cílem naší práce bylo sledovat v průběhu delšího časového období a na různých místech České republiky výskyt tuberkulózních změn, resp. aviárních mykobakterií v populaci havrana polního. Experimentálními infekcemi u odchycených jedinců pak studovat vnímavost havrana k aviárním mykobakteriím a nástup změn v jednotlivých orgánech a tkáních.

MATERIÁL A METODY

V letech 1966-1985 jsme vyšetřovali patologickomorfologicky a kultivačně 188 havranů polních, získaných odstřelem ve třech lokalitách. Naše sledování jsme konali v okolí dvou odchytových středisek pernaté lovné zvěře, kde by infikovaní havrani mohli být nebezpečným zdrojem *M. avium* pro chované ptáky. Dále pak v prostoru, kde byl budován velkokapacitní kravín pro 2000 dojnic a v okolí silážních jam, kde byl předpoklad vzniku četných potravních možností pro havrana. Havrani polní k experimentální infekci byli získáni odchycem po omámení narkotikem (alfa glukochloralóza) podaným v potravě.

K experimentální intramuskulární infekci bylo použito suspenze kmene *M. avium* sérotyp 2, v dávce 1 mg/kg ž. h., izolovaného z tuberkulózního kura domácího. Kmen vyvolával u kura domácího v dávce 1 mg/kg ž. h. (*i. m.*), generalizovanou tuberkulózu.

K perorální infekci bylo použito krmivo kontaminované tuberkulózně změněnými játry kura domácího (9 dílů krmiva + 1 díl jater). Izolované mykobakterie ze změněných jater byly typizovány jako *M. avium* sérotyp 2.

Ke kontaktní infekci byl použit kur domácí z chovu infikovaného tuberkulózou. Ptáci reagovali na tuberkulín a někteří jevíli klinické příznaky onemocnění. Po ukončení pokusu byl kur usmrcen a vyšetřen. Izolované mykobakterie byly typizovány jako *M. avium* sérotyp 2.

Celkem bylo infikováno intramuskulárně 13 havranů, perorálně kontaminovaným krmivem osm havranů a kontaktem s tuberkulózním kurem osm havranů.

Po intramuskulární infekci, pokud dříve neuhynuli, byli havrani po skupinách usmrceni za 12-69 dnů, po perorální infekci kontaminovaným krmivem za 106 až 157 dnů, po kontaktu s tuberkulózním kurem za 157-238 dnů.

Ptáci byli vyšetřeni patologickeoanatomicky, jednotlivé orgány a tkáně kultivačně a histologicky. Kultivováno bylo na tři zkumavky s půdou podle Petragna-niho a dvě zkumavky se sérovou půdou pro kultivaci mykobakterií. Kultivaci předcházela preparace suspendované tkáně 10% kyselinou sírovou po dobu 20 minut s následnou neutralizací 8% louhem sodným. Kultivace byla ukončena po dvouměsíční inkubaci v termostatu při teplotě 37 °C. Izolované kmeny mykobakterií byly dále určeny biochemicky a sérologicky (IHE Praha). Histologické řezu byly barveny hematoxilin-eosinem na průkaz specifické granulární tkáně a Ziehl-Neelsenem na průkaz mykobakterií.

VÝSLEDKY

VYŠETŘENÍ VOLNĚ ŽIJÍCÍCH HAVRANŮ

Vyšetřením 188 jedinců havrana polního, ulovených ve třech lokalitách, resp. ve čtyřech obdobích byly prokázány vždy tuberkulózní změny nebo aviární mykobakterie (tab. I). Patologickeoanatomické tuberkulózní změny, ve všech případech změny v játrech a ve slezině, byly nalezeny u celého souboru ve 2,6 %, kultivací byly prokázány mykobakterie, typizované jako *M. avium* sérovar 2, v 5,3 %.

I. Výsledky patologickeomorfologického a kultivačního vyšetření na aviární mykobakterií u ulovených havranů polních (*C. frugilegus*) – The results of patho-morphological and culture examination for avian mycobacteriosis in the captured rooks (*C. frugilegus*)

Místo odchyty ¹	Rok ²	Vyšetřeno ptáků ³	Nález PA tbc změn ⁴	Pozitivní kultivace ⁵
Okolí odchytového střediska - Přerov ⁶	1966 1968	39	1	1
Okolí odchytového střediska - Židlochovice ⁷	1968	79	0	5
Okolí velkokapacitního kravína - Chropyně ⁸	1977 1980	47	2	2
Okolí velkokapacitního kravína - Chropyně ⁸	1981 1985	23	2	2
Celkem ⁹	1966-1985	188	5 (2,6 %)	10 (5,30 %)

¹place of capture, ²year, ³birds examined, ⁴finding of PA tbc lesions, ⁵positive culture, ⁶environs of the center of capture - Přerov, ⁷environs of the center of capture - Židlochovice, ⁸environs of a large cowshed - Chropyně, ⁹total

1. Výsledky patologiickoanatomického, histologického a kultivačního vyšetření havrana polního (*C. frugilegus*), infikovaného intramuskulárně suspenzí *M. avium* (1 mg/kg ž.h.) – The results of patho-anatomic, histological and culture examination of the rook (*C. frugilegus*), intramuscularly infected with *M. avium* suspension (1 mg/kg l.w.)

	A						B								
	Sv	Ja	Si	Pl	L	St	Sv	Ja	Si	Pl	L	St	PO	KD	N
12 dnů															
12															
12															
21															K
21															
21								K							
35													K		
35															
35															
44										A	K	K			
69											K			K	
69															
69															

Vysvětlivky – Explanations:

A	
	beze změn - without changes
	histologické změny - histological changes
	izolované tbc změny - isolated tuberculous changes
	miliární tbc - miliar tuberculosis
N	nevyšetřeno - unexamined
+	úhyn - mortality

B	
	negativní - negative
	do 20 kolonií - up to 20 colonies
	nad 20 kolonií - above 20 colonies
	souvislý porost - continuous stand
K	kontaminace - contamination
K	nevyšetřeno - unexamined

EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE

Po intramuskulární infekci (obr. 1) vznikly makroskopické tuberkulózní změny (kaseózní ložiska) pouze ve svalovině v místě vpichu od 12. dne. U části ptáků pak byly nalezeny histologické změny (specifický granulární zánět a mykobakterie) v játrech a ve slezině, převážně za 12 a 21 dnů po infekci. Kultivací byly prokázány mykobakterie již od 12. dne po infekci z různých orgánů a tkání. Intenzivnější a častější kultivační záchyt byl pozorován opět v počátečních obdobích po infekci.

Perorální infekce kontaminovaným krmivem nevedla ani u jednoho z pokusných havranů ke vzniku tuberkulózních změn. Pouze v jednom případě se podařilo z prsního svalu a jater za 157 dnů po infekci izolovat mykobakterie.

V pokusu, kdy byli havrani vystaveni 238 dnů kontaktu s tuberkulózním kurem, ani u jednoho ptáka nebyly nalezeny tuberkulózní změny, ani prokázány mykobakterie.

U každé experimentální skupiny byla založena kontrolní skupina. Po skončení pokusů byli kontrolní jedinci usmrceni a vyšetřeni s negativním výsledkem.

DISKUSE

Význam havrana polního jako šířitele původců infekčních onemocnění je dán několika okolnostmi. Jako migrující druh má možnost se infikovat různými mikroby v prostředí značně vzdáleném a nám epizootologicky neznámém. Vzhledem k velkému počtu vyskytujících se jedinců a relativně větší tělesné hmotnosti může velmi intenzivně kontaminovat prostředí. Epizootologický význam infikovaných ptáků je násoben i jejich dlouhověkostí, umožňující zejména při chronicky probíhajících chorobách, jako je např. aviární mykobakteriíza, dlouhodobě působit jako zdroj. Z tohoto důvodu jsme také věnovali pozornost havranu polnímu.

Vysvětlivky k obr. 1 – Explanations to Fig. 1:

Sv = sval – muscle

Ja = játra – liver

Sl = slezina – spleen

Pl = plíce – lungs

L = ledviny – kidneys

A = dynamika vývoje patologickeoanatomických a histologických tbc změn – dynamics of development of patho-anatomical and histological tuberculous changes

B = kultivační vyšetření – cultivation examination

dnů – days

St = střevo – intestine

PO = pohlavní orgány – sexual organs

KD = kostní dřev – bone marrow

M = mozek – brain

mu v souvislosti se zdroji aviárních mykobakterií. Ve všech třech, resp. čtyřech vyšetřeních v průběhu 20 let jsme u havranů našli tuberkulózní změny či mykobakterie v procentech odpovídajících, či o něco nižších, údajům různých autorů (Riegler, 1917; Plum, 1942; Rankin a McDiarmid, 1948; Kovačič aj., 1985). Lze tedy epizootologickou situaci ve výskytu aviární mykobakterií u havrana polního na území České republiky považovat za přiměřenou v porovnání s jinými státy. Nález mykobakteriální infekce v jednotlivých částech sledovaného období svědčí o konstantnosti výskytu nákazy v populaci havrana polního. Je ho tedy možno na území České republiky považovat za významný, dlouhodobě se vyskytující zdroj aviárních mykobakterií. Infikovaní jedinci nemusí ve všech případech vykazovat patologickomorfologické změny, jak jsme měli možnost prokázat u pěti havranů z lokality Židlochovice. Stejný poznatek jsme učinili při experimentální infekci havranů kontaminovaným krmivem, kdy jsme izolovali mykobakterie ze svaloviny a jater, přičemž patomorfolický nález byl negativní.

Pravidelný a relativně častý výskyt tuberkulózních změn a aviárních mykobakterií u havrana polního nás vedl k záměru ověřit experimentálními infekcemi vnímavost tohoto druhu k infekci *M. avium*. Při různých způsobech infekce (intramuskulární, perorální, kontaktem) jsme měli možnost prokázat vysokou resistenci havrana polního k aviárním mykobakteriím. Ani po intramuskulární infekci suspenzí *M. avium* se nám nepodařilo vyvolat, s výjimkou místa vpichu, makroskopické tuberkulózní změny. Při tom použitá dávka 1 mg/kg ž. h. vede u kura domácího již za 21 dnů po infekci ke vzniku makroskopických změn v játrech (Hejlíček, 1976). Histologické změny a průkaz mykobakterií z různých orgánů a tkání byly častější a výraznější na začátku pokusu, tj. u havranů usmrčených za 12, resp. 21 dnů. Později (za 35 a 65 dnů) nálezů, resp. průkazů ubývalo. I to svědčí pro značnou resistenci havrana polního k infekci *M. avium*. Další dva pokusy, tj. perorální infekce kontaminovaným krmivem a infekce kontaktem s tuberkulózním kurem domácím vyzněly, s výjimkou kultivačního průkazu mykobakterií z jednoho havrana, negativně. Zejména závažný je poznatek, že ani po 238 dnech kontaktu s tuberkulózním kurem ve voliérě nedošlo k přenosu aviárních mykobakterií z kura na havrana. Vzniká tedy otázka, jak je možné, že se u havrana polního, velmi resistantního k experimentální infekci *M. avium*, nacházejí relativně tak často tuberkulózní procesy či aviární mykobakterie. Vysvětlení lze hledat v tom, že havran polní při svém dlouhém věku má možnost často a opakovaně přicházet do styku s prostředím chovů drůbeže kontaminovaným *M. avium*. A právě tento často opakovaný kontakt může způsobit vznik aviární mykobakterií u jinak velmi resistantního druhu.

Literatura

- BOHL, B.: Zur Tuberkulose bei wilden Vögeln. Veterinarny truženik, 1, 1925: 4-6.
- Mc DIARMID, A.: The incidence of tuberculosis in free-living wood pigeons. J. comp. Path., 58, 1948: 128-133.
- HEJLÍČEK, K.: Epizootologie aviární tuberkulózy. [Doktorská disertační práce.] Brno 1976. 140 s. - Vysoká škola veterinární.
- KOVAČIČ, H. - LACKOVIČ, M. - MAJSTROVIČ, S. - BRANEŽAC, N.: Znacaj vrana gacaca - *Corvus frugilegus* u pojavi avijarne tuberkuloze svinjogojskim farmama. Vet. Glas., 32, 1985: 1325-1330.
- KOVAČIČ, H. - LACKOVIČ, M.: Tuberkuloza u vrana gacaca (*Corvus frugilegus*). Vet. Arch., 55, 1986: 858-860.
- MICHAJLOVA, K. I.: Dikie pticy - istočnik tuberkuljoznoj infekcii. Trudy (Nauč-issled. Inst. Tadžickoj SSR), 6, 1976: 35-39.
- PLUM, N.: Studies on the occurrence of avian tuberculosis among wild birds, especially gulls and sparrows and in rats and hares. Scand. Vet. Tidsskr., 31, 1942: 465-487.
- RANKIN, J. E. - McDIARMID, A.: Mycobacterial infections in free-living wild animals. Symp. Zool. Soc., (London), 24, 1966: 119-131.
- RIEGLER, P.: Quoted by EBER, A.: Tuberculose der Tiere. Ergebn. allg. Path. path. Anat., 18, 1917: 1-371.
- ŠVRČEK, Š. - VRTIAK, O. J. - KAPITANČIK, B. - BAUER, T. - KOPPEL, Z.: Volne žijúce vtáctvo a domáce holuby ako zdroj aviárnej tuberkulózy. Rozhl. tuberkul., 26, 1966: 659-667.
- WILSON, J. E.: Avian tuberculosis: An account of diseases in poultry, captive birds and wild birds. Brit. Vet. J., 116, 1960: 380-393.

Došlo 17. 1. 1994

HEJLÍČEK, K. - TREML, F. (University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno):

Epizootology and pathogenesis of avian mycobacteriosis in the rook (*Corvus frugilegus*).

Vet. Med. - Czech., 39, 1994 (6): 337-344.

The occurrence of avian mycobacteriosis in the rook (*C. frugilegus*) was investigated in the years 1966-1985. A total of 188 birds captured at three localities of the Czech Republic were subjected to patho-morphological examination and to culture examination. Patho-anatomic lesions were observed in five rooks (2.6%), *M. avium* was isolated from 10 rooks (5.3%). Positive findings occurred in each examined locality.

Rook sensitivity to *M. avium* infection was tested by experimental infections. After intramuscular infection with *M. avium* suspension macroscopic tuberculosis lesions were found out at the place of puncture, histological lesions in liver and spleen at the beginning of the trial (days 12 - 35). Mycobacteria were isolated from particular organs and tissues, more frequently at the beginning of the trial. Peroral infection by

feed contaminated with liver of tuberculous fowl failed to induce tuberculous lesions, while a proof of *M. avium* from the organs was the only one after 157 days. The contact of the rook with the tuberculous fowl did not lead to the origin of tuberculous lesions after 238 days nor were the mycobacteria proved in the rook tissues.

. In comparison with e.g. the house sparrow, tree sparrow and pheasant, the rook is very resistant to *M. avium* infection according to the results of experimental infections. A relatively frequent occurrence of tuberculous processes or of mycobacteria in the rook captured in the open area is probably conditioned by a possibility of repeated, frequent contacts of the rook with the contaminated environment during its longer life.

The rook should be taken as an important source of mycobacteria, particularly at the localities where larger numbers of rooks come into contact with feed for domestic animals.

rook (*Corvus frugilegus*); avian mycobacteriosis; epizootology; pathogenesis

Contact Address:

Doc. MVDr. František T r e m l , CSc., Vysoká škola veterinární a farmaceutická,
Palackého 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic
Tel. 05 41321107, fax 05 41211241

BAKTERIOLOGICKÝ, MYKOLOGICKÝ A PARAZITOLOGICKÝ PRIESKUM KONTAMINÁCIE BITÚNKOVÝCH ODPADOVÝCH VÔD*

P. Juriš¹, J. Gulovič², V. Lašanda³, V. Ružík³, P. Plachý¹

¹Parazitologický ústav SAV, Košice

²Okresná veterinárna správa, Košice

³Štátny veterinárny ústav, Košice

Vykonal sa bakteriologický, mykologický a helmintologický prieskum bitúnkových odpadových vôd, ktoré vtekajú priamo do mestskej kanalizačnej siete. Zo vzoriek boli izolované baktérie *Escherichia coli*, *Proteus* sp., aeróbne sporuláty a skupina baktérií, ktoré zaraďujeme medzi gram negatívne nefermentujúce tyčinky (najmä rody *Pseudomonas* a *Alcaligenes*). Rod *Salmonella* sa vo vyšetrovaných vzorkách kultivačne nezistil. Pri mykologickom vyšetrení boli vo vzorkách odpadových vôd izolované rody: *Mucor*, *Peecilomyces*, *Fusarium* a druh *Calenularia fuliginea*. Z parazitárnych zárodkov sa v odpadových vodách dominatne vyskytovali vajčká *Ascaris suum*. Podstane menej boli diagnostikované rody resp. druhy parazitárnych zárodkov: *Hymenolepis*, *Fasciola hepatica*, *Trichuris*, *Oesophagostomum*, *Isospora*, *Eimeria*, *Taenia* (zapísané v zostupnom poradí podľa výskytu). Najväčší počet parazitárnych zárodkov vo vzorkách odpadových vôd sa v priebehu prevádzky zisťoval v čase medzi 8,30 až 12,30 hodín.

Životné prostredie; hygienické problémy; bitúnkové odpadové vody; zárodky baktérií, plesní a parazitov

Odpadové vody z potravinárskych podnikov (mliečárne, hydínárne, bitúanky) sa významne podieľajú na celkových objemoch komunálnych odpadových vôd v urbánnych ekosystémoch. Okrem organického resp. anorganického znečistenia sa v odpadových vodách prichádzajúcich do komunálnych čistiarní odpadových vôd (ČOV), nachádza značné množstvo mikroorganizmov, vrátane patogénov. Tieto prechádzajú v priebehu čistiarenských procesov najčastejšie do kalov, kde sa koncentrujú. Väčšie mikroorganizmy (vajčká helmintov, oocysty a sporocysty protozoí) sú v ČOV zachytávané už v primárnom kale. Menšie mikroorganizmy (vírusy, baktérie, kvasinky, plesne ap.) sa dostávajú až do biologických stupňov

* Výsledky boli získané pri riešení grantu 132/93 Grantovej agentúry pre vedu.

čistenia odpadových vôd (Strauch a kol., 1980; Horák, 1991; Rybářová, 1991).

Z hygienicko-epidemiologického hľadiska majú osobitné postavenie tie odpadové vody z potravinárskych podnikov (bitúanky), ktoré spracovávajú jatočné zvieratá. Pri jatočnom spracovaní zvierat odchádzajú ako odpad črevný obsah, krv, telové sekréty ap. V nich sú aj zárodky vírusových, bakteriálnych, mykotických a parazitárnych ochorení. Väčšina skôr postavených bitúanok nemá vybudovanú vlastnú ČOV, a tak tieto tekuté odpady odtekajú po čiastočnej sedimentácii priamo do kanalizačnej siete.

Aeróbna i anaeróbna stabilizácia, ako klasické a súčasne základné technologické spôsoby čistenia odpadových vôd v ČOV redukovávajú počty resp. infekcie-schopnosť väčšiny baktérií obligátne sa vyskytujúcich v kaloch. Technologický proces v ČOV prebieha prevažne v mezofilnej teplotnej oblasti, devitalizácia patogénov z vyššou tenacitou voči biotickým i abiotickým faktorom prostredia (enetrovírusy, protozoá, vajíčka helmintov) je preto problematická. Potvrdzujú to i naše laboratórne experimenty s prežívania neembryonovaných vajíčok *Ascaris suum* v priebehu aeróbnej mezofilnej stabilizácie tekutých exkrementov ošísaných (Juríš a i., 1993). Po 54 hodinách stabilizácie bolo devitalizovaných len 32 % modelových vajíčok. Naproti tomu testované baktérie *Salmonella typhimurium* prežívali len do 32 hodín. Podobný problém je pri eliminácii vírusov. Tak napr. Bittón a i. (1984) uvádzajú, že vírusy v odpadových vodách nie sú odstránené bežnými čistiarenskými technológiami.

MATERIÁL A METÓDA

V jarnom období v roku 1993 sme zisťovali kontaminovanosť odpadových vôd vytekajúcich z prevádzok bitúanky (kde sa nachádza tiež sanitný bitúanok) zárodkami baktérií, plesní a parazitov. Vzorky odpadových vôd sme odoberali dvakrát mesačne, v dopoludňajších hodinách, v dvojhodinových intervaloch (päť odberov za deň). Tekutú vzorku určenú na vyšetrenie sme dostali po 30-minútovej sedimentácii 10 l objemu a následnom zliatí supernatantu do objemu 1 000 ml. Vzorky boli potom laboratórne spracované. Kvantitatívne aj kvalitatívne bakteriologické vyšetrenia odpadových vôd sme robili bežnými mikrobiologickými metódami a postupmi (ČSN 83 051). Na kvantitatívne vyšetrenie sme použili laktózový agar (Imuna). Pomocou tohto média sme zisťovali len tie baktérie prítomné v odpadových vodách, ktoré sú schopné vyrásť v 2% laktózovom agare o pH 7 až 7,2 pri teplote 37 °C. Kvalitatívne vyšetrenie sme zamerali najmä na prítomnosť hygienicky významných baktérií rodu *Salmonella*. Ako selektívne médium sme použili Endoagar a XLD agar (Imuna). Ako pomnožovacie médium sa použila Kauffmanova tekutá pôda (Imuna).

Na mykologické vyšetrenie odpadových vôd sme použili na Czapek-Doxov agar (Imuna) a Sabouradov agar (Imuna). Vzorky odpadových vôd sme očkovali na Petriho misky s vyššie uvedeným médiom a po 5-dňovej inkubácii pri teplote 22 °C sme plesne identifikovali.

Vajíčka helmintov zo vzoriek odpadových vôd (po ich 45-minútovej sedimentácii a zliatí supernatantu) sme získavali flotačno-sedimentačnou metódou podľa R o m a n e n k a (1968) s použitím nasýteného roztoku sacharózy.

Odbery vzoriek odpadových vôd boli odoberané technikom za asistencie pracovníka štátnej veterinárno-hygienickej služby na bitúnku v uvedených dňoch a vykonali sa tieto vyšetrenia:

26.03.93: parazitologické

15.04.93: bakteriologické, parazitologické

26.04.93: bakteriologické, mykologické, parazitologické

11.05.93: bakteriologické, parazitologické

25.05.93: parazitologické

VÝSLEDKY

BAKTERIOLOGICKÉ A MYKOLOGICKÉ VYŠETRENIA:

Ako sme už uviedli vyššie, monitoring odpadových vôd z bitúnka bol z kvalitatívneho aspektu zameraný najmä na dôkaz prítomnosti baktérií rodu *Salmonella*. Tieto však v odobraných vzorkách neboli kultivačne preukázané. V sledovaných vzorkách bol pravidelne zaznamenaný výskyt baktérií rodov *Escherichia* a *Proteus*, aeróbných sporulárov a veľkej skupiny baktérií, ktoré zaraďujeme medzi gram negatívne nefermentujúce tyčinky (najmä rody *Pseudomonas* a *Alcaligenes*).

Pri kvantitatívnom hodnotení celkového počtu izolovaných baktérií bol u všetkých odobratých vzoriek počet kolónií väčší ako 100 i v riedení 10^{-10} . Spätný prepočet na vyšetrovaný objem 1 000 ml vzorky sme nevykonávali. Preto je v tab. I uvádzaný iba kvalitatívny záchyt baktérií.

Pri mykologickom vyšetrení vzoriek bitúnkových odpadových vôd boli izolované rody resp. druhy *Mucor*, *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Calenularia fuliginea*.

Prehľad identifikovaných baktérií a plesní je uvedený v tab. I.

PARAZITOLOGICKÉ VYŠETRENIA

Vo vzorkách odpadových vôd sa dominantne vyskytovali vajíčka rodu *Ascaris*. Podstatne menší výskyt sme zaznamenali u nasledovných vajíčok rodov resp. druhov (uvádzame ich v zostupnom poradí podľa výskytu: *Hymenolepis*, *Fasciola hepatica*, *Trichuris*, *Oesophagostomum*, *Taenia*. Z ostatných parazitárnych zárodkov sme vo vzorkách zistili aj výskyt oocýst rodov *Isospora* a *Eimeria* (tab. II). Z výsledkov uvádzaných v tab. III je zrejmé, že k najvyššej kontaminácii

I. Prehľad hygienicky významných ochorení jatočných zvierat spracovaných na sledovanom bitúnku v rokoch 1992 - 1993 – Survey of hygienically important diseases of slaughter animals processed in the given slaughterhouse in 1992 - 1993

Jatočné ošípané ¹					
		počet pozitívnych nálezov ²			
Rok ³	počet odporazených kusov ⁴	<i>Echinococcus</i> sp.		<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (TBC)	
		prevalencia ⁵		prevalencia ⁵	
		ks	%	ks	%
1992	91 890	15	0,00001	1 006	1,09
1993	67 001	11	0,0164	880	1,31

Jatočný dobytok ⁶					
		počet pozitívnych nálezov ²			
Rok ³	počet odporazených kusov ⁴	<i>Fasciola hepatica</i>		<i>Cysticercus bovis</i>	
		prevalencia ⁵		prevalencia ⁵	
		ks	%	ks	%
1992	17 919	1 100	6,13	223	1,24
1993	12 549	622	4,95	138	1,09

¹slaughter pigs, ²number of positive findings, ³year, ⁴number of slaughtered animals, ⁵prevalence, ⁶slaughter cattle

cii bitúnkových odpadových vôd parazitárnymi zárodkami dochádza v čase medzi 8,30 až 12,30 hodín.

DISKUSIA

Z výsledkov mikrobiologického a parazitologického monitoringu bitúnkových odpadových vôd vyplýva, že do mestskej kanalizačnej siete sa dostáva okrem organického znečistenia, široká škála mikroorganizmov z tiel odporazených jatočných zvierat. Z hygienicko-epidemiologického hľadiska je závažné, že väčšinou ide o zárodky zoonózných ochorení, ktoré by mali byť na konci kanalizačnej siete v ČOV spoľahlivo devitalizované, tak aby nebolo sekundárne kontaminované životné prostredie a ohrozené zdravie človeka.

Značná bakteriálna kontaminácia bitúnkových odpadových vôd, v priebehu nášho sledovania sa prejavila i tým, že aj v najvyššom riedení vzorky (10^{-10}), bolo zistených viac ako 100 kolónií. Do tejto veľkej skupiny baktérií patria primárne aj sekundárne patogény (napr. *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Listeria* sp. a iné).

II. Prehľad bakteriálnych, mykotických a parazitárnych zárodkov v odpadových vodách sledovaného bitúnka – Survey of bacterial, mycotic and parasitic germs in wastewaters from the given slaughterhouse

Baktérie ¹	Plesne ²	Protozoá ³	Helminty ⁴
<i>E.coli</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Eimeria</i> sp.	<i>Ascaris</i> sp.
<i>Proteus</i> sp.	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Isospora</i> sp.	<i>F. hepatica</i>
Aeróbne sporuláty ⁵	<i>Fusarium</i> sp.		<i>Hymenolepis</i> sp.
Gramnegatívne ne-fermentujúce tyčinky ⁶	<i>Celanularia fuliginea</i>		<i>Trichuris</i> sp.
<i>Pseudomonas</i> sp.,			<i>Oesophagostomum</i> sp.
<i>Alcaligenes</i> sp.			<i>Taenia</i> sp.

¹bacteria, ²molds, ³protozoans, ⁴helminths, ⁵aerobic sporulates, ⁶Gram negative nonfermenting rods

Baktérie rodu *Salmonella* sme vo vzorkách bitúnkových odpadových vôd nedokázali. Výskyt tohto hygienicky významného rodu v odpadových vodách sledovaného bitúnku však nemožno vylúčiť. Tak napr. Sogaard a Brest Nielsen (1979) pri prieskume jedenástich bitúnkov v Dánsku zistili až v 58 % vzoriek odpadových vôd prítomné salmonely rôznych sérotypov v koncentráciách od 0,9 do 668 baktérií v 100 ml. Najčastejšie izolovali štyri sérotypy

III. Výskyt parazitárnych zárodkov v bitúnkových odpadových vodách – Occurrence of parasitic pathogens in wastewaters from slaughterhouses

Čas odberu ¹ (h)	Rodové resp. druhové zastúpenie parazitárnych zárodkov ²	Priemerný počet zárodkov ($\bar{x}$) z piatich odberov v 1000 ml vzorky ³
06,30	<i>Ascaris suum</i> , <i>Hymenolepis</i> , <i>Taenia</i>	1,6
08,30	<i>Ascaris suum</i> , <i>F. hepatica</i> , <i>Trichuris</i> , <i>Oesophagostomum</i> , <i>Isospora</i>	10,8
10,30	<i>Ascaris suum</i> , <i>F. hepatica</i> , <i>Eimeria</i>	12,4
12,30	<i>Ascaris suum</i> , <i>Isospora</i> , <i>Oesophagostomum</i> , <i>Trichuris</i>	16,8
14,30	<i>Ascaris suum</i> , <i>Hymenolepis</i>	4,0

¹time of sampling, ²generic or specific composition of parasitic pathogens, ³average number of pathogens ($\bar{x}$) in five samplings per 1 000 ml of sample

(*Salmonella agona*, *S. indiana*, *S. senftenberg* a *S. typhimurium*). Prítomnosť rodu *Salmonella* v odpadových vodách bitúnkov i sanitných bitúnkov na Slovensku zisťoval R o s o c h a a i. (1980).

Prítomnosť plesní v bitúnkových odpadových vodách je tiež zaujímavým epidemiologickým zistením, o ktorom sa doposiaľ veľa nepublikovalo. Hygienický význam majú plesne najmä z aspektu produkcie mykotoxínov. Ako je všeobecne známe, tak napr. rod *Fusarium*, ktorý sme vo vzorkách detekovali, produkuje mykotoxín T-2 (zearalenon).

Výskyt vajčiek *Taenia* sp. vo vzorkách je podmienený tým, že bitúnkové odpadové vody obsahujú aj splaškové vody zo sociálnych zariadení v jednotlivých prevádzkach. Možno z toho predpokladať, že niektorí zamestnanci bitúnku sú postihnutí taeniózou. Obráz o možnom výskyte parazitárnych zárodkov v odpadových vodách môžu dokumentovať údaje o niektorých ochoreniach jatočných ošípaných a hovädzieho dobytku na sledovanom bitúnku (tab. III).

Široká škála parazitárnych zárodkov, ktoré sme determinovali, súvisí jednak s veľkými počtami spracovaných zvierat, ktoré pochádzajú z veľkej nasávacej oblasti s rôznou epizootologickou situáciou vo vzťahu k parazitózam a tiež s odlišnou úrovňou hygieny chovu.

Potravinárske podniky, ktoré spracúvajú jatočné zvieratá sú významnými producentmi organických odpadov patriaceho do kategórie nebezpečných odpadov a tým sú i potenciálnym zdrojom znečistenia životného prostredia. Je preto potrebný zvýšený dozor najmä zo strany hygienickej služby. Z epidemiologického hľadiska je nevyhnutné aby podniky v ktorých sa spracúvajú zvieratá zo širokého okolia prevádzkovali vlastnú čistiareň odpadových vôd a nevypúšťali kontaminované odpady do mestskej kanalizačnej siete. Táto kapacitne nevyhovuje a súčasne návazná mestská ČOV pre asi 250 tisíc obyvateľov je v havárijnom stave (P l a c h ý a J u r i š, 1993).

Literatúra

- BITTON, G. - PANCORBO, O. C. - FARRAH, S. R.: Virus transport and survival after land application of sewage sludge. Appl. Envir. Microbiol., 47, 1984: 905-909.
- ČSN 83 0531. Mikrobiologický rozbor povrchovej vody. 1983.
- HORÁK, P.: Helminths eggs in the sludge from three sewage treatments plants in Czechoslovakia. Folia Parazitol., 39, 1992: 153-157.
- JURIŠ, P. - PLACHÝ, P. - DUBINSKÝ, P. - VENGLOVSKÝ, J. - TÓTH, F.: The effect of laboratory aerobic stabilization of liquid excrements of pigs on vitality of *Salmonella typhimurium* and *Ascaris suum*. Vet. Med. - Czech, 38, 1993: 553-558.
- PLACHÝ, P. - JURIŠ, P.: Problematika komunálnych odpadových vôd urbánnej oblasti Košíc z aspektu helmintologického. Českoslov. Hyg., 38, 1993: 27-33.
- ROMANENKO, N. A.: Methods for the examination of soil and sediment of wastewater on helminth eggs. Med. Parasit. Parasit. Bolez., 1968: 723-729.

ROSOCHA, J. - GARAJ, O. - VARGOVÁ, M. - ONDRAŠOVIČ, M. - VENGLOVSKÝ, J.: Hygienic problems of slaughterhouse wastewaters. Zbl. Bakt. Parasitenk. Infektionskrank. Hyg., Abt. 1, R. B, 170, 1980: 337-341.

RYBÁŘOVÁ, J.: Sanitary measures to safeguard waste sludges for agricultural applications. Vodní hospodářství, 41, 1991: 340-342.

SOGAARD, H. - BREST NIELSEN, B.: The occurrence of *Salmonella* in waste water from Danish slaughterhouses. Nord. Vet.- Med., 31, 1979: 353-359.

STRAUCH, D. - BAADER, W. - TIETJEN, C.: Odpady zo živočíšnej výroby. Bratislava, Príroda 1980.

Došlo 10. 2. 1994

JURIŠ, P. - GULOVIČ, J. - LAŠANDA, V. - RUŽÍK, V. - PLACHÝ, P. (Institute of Parasitology of the Slovak Academy of Sciences, Košice; District Veterinary Administration, Košice; State Veterinary Institute, Košice):

Bacteriological, mycological and parasitological survey of slaughterhouse wastewaters contamination.

Vet. Med. - Czech, 39, (6): 345-351.

A bacteriological, mycological and parasitological survey was carried out of wastewaters entering directly the municipal sewerage. The bacteria isolated from samples were *Escherichia coli*, *Proteus* sp., aerobic sporulates and a group of bacteria known as Gram negative nonfermenting (particularly the genera *Pseudomonas*, *Alcaligenes*). Cultivation of these samples showed no presence of the genus *Salmonella*. A mycological examination of wastewater samples yielded the following genera: *Mucor*, *Peecilomyces*, *Fusarium* and the species *Calenularia fuliginea*. Eggs of *Ascaris suum* were the dominant parasitic pathogens found in the wastewaters. Seldom diagnosed were parasitic pathogens of the following genera or species: *Hymenolepis*, *F. hepatica*, *Trichuris*, *Oesophagostomum*, *Isospora*, *Eimeria*, *Taenia* (listed in the order: max-min). The highest count of parasitic pathogens in wastewater samples during the operation was ascertained at the time between 8.30 and 12.30 hr.

environment; slaughterhouse wastewaters; hygienic problems; bacterial, mycotic and parasitic germs

Contact Address:

MVDr. Peter J u r i š , CSc., Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3,
040 01 Košice, Slovak Republic
Tel. 095 31411-13, fax 095 31414

POKYNY PRO AUTORY VĚDECKÉHO ČASOPISU VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Časopis uveřejňuje původní vědecké práce, krátká sdělení a výběrově i přehledné referáty, tzn. práce, jejichž podkladem je studium literatury a které shmují nejnovější poznatky v dané oblasti. Práce jsou uveřejňovány v češtině, slovenštině nebo angličtině. Rukopisy musí být doplněny krátkým a rozšířeným souhrnem.

Autor je plně odpovědný za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. K práci musí být přiloženo prohlášení autora o tom, že práce nebyla publikována jinde.

O uveřejnění práce rozhoduje redakční rada časopisu, a to se zřetelem k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu a kvalitě práce.

Rozsah vědeckých prací nemá přesáhnout 10 stran psaných na stroji včetně tabulek, obrázků a grafů. V práci je nutné používat jednotky odpovídající soustavě měrových jednotek SI (ČSN 01 1300).

Technická úprava rukopisu

Úprava rukopisu pořizovaného na psacím stroji má odpovídat ČSN 88 0220 (formát A4, 30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, tzn., že mezi řádky se dělají dvojité mezery). Při pořizování rukopisu na počítači je pro nás nejvhodnější textový editor T602, popř. text převedený do ASCII kódu. Text příspěvku se posílá spolu s disketou, která po zkopírování se vrací autorům zpět.

Ilustrace, grafy, tabulky a fotografie (černobílé) mají vyhovovat ČSN 88 2109, dodávají se zvlášť a nepodlepují se. Grafy se rýsují tuší na bílý nebo pauzovací papír a popisují se jednotnou velikostí písma (šablona 3,5 mm). Obrázky pořizované počítačem je možné publikovat přímo, pokud jsou ve formátu vektorovém (.GEM, .WMF, .CDR, atd.) nebo bitovém (.TIF, .PCX, atd.). Na zadní straně se vyznačí tužkou pořadové číslo obrázku a napíše se jméno autora článku. Texty k obrázkům se dodávají na zvláštním listě, umístění obrázků se označuje na levém okraji příslušné strany rukopisu číslicí v kroužku. Tabulky se číslují římskými číslicemi. Na všechny obrázky i tabulky musí být v textu práce odkazy. Pro překlad do angličtiny je nutné vysvětlit všechny použité zkratky.

Úprava vlastní práce

Název práce (titul) nemá přesahovat 85 úhozů. Je nutné se v názvu vyvarovat obecných frází jako: Studie o... Příspěvek k ... Pokus o... Každý zaslaný článek musí být samostatnou prací, nemohou být publikovány články na pokračování, označené např.: Studie o ... I, II, III atd., stejně tak jsou vyloučeny podtitulky článků.

Jména autorů se uvádějí bez titulů - příjmení a první písmeno jména..

Souhrn

Vypracování souhrnu je nutné věnovat obzvláštní péči. Autor do něho má shrnovat vše, co je na jeho práci pozoruhodné a nové a co má být dokumentováno. Souhrn má být nekritickým informačním výběrem významného obsahu a závěru, nikoliv však jeho pouhým popisem. Musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo ve vědecké práci, nemá ji však nahradit. Nemá překročit rozsah 170 slov. Je třeba, aby byl psán celými větami, nikoliv heslovitě. Pro překlad do angličtiny se požaduje souhrn delší (do dvou rukopisných stran) s odkazy na tabulky a obrázky, popř. s anglickými odbornými termíny nebo už přeložený do angličtiny. Souhrn začíná jménem autorů, názvem pracoviště a jeho sídlem (v závorce), titulem článku a citací: Vet. Med. - Czech, 00, 1990. Místa označená nulami doplní na kompletní citaci při korektuře redakce.

Klíčová slova (key words, index terms)

Připojují se po vynechání řádku pod souhm krátký i rozšířený (k oběma souhmům musí být připojena stejná klíčová slova). Klíčové slovo je substantivum, které je nutné pro věcné zařazení práce. Klíčová slova se řadí směrem od obecnějších výrazů ke konkrétním. Začínají malým písmenem a oddělují se středníkem. Jejich počet závisí na povaze práce, neměl by klesnout pod tři a převýšit 12 slov.

Úvod

Úvod má obsahovat hlavní důvody, proč byla práce uskutečněna, a velmi stručnou formou stav studované otázky. Je nutné se v něm vyhnout rozsáhlým historickým přehledům. Uvádí se bez nadpisu, je možné v něm uvést k práci se vztahující citaci autorů (doporučuje se co nejnížší počet citací - čtyři až osm autorů).

Materiál a metody

Metody se popisují pouze tehdy, jsou-li původní, jinak postačuje citovat autora metod a uvádět jen případné odchylky. Je v nich popsán pokusný materiál. Popis metod by měl umožnit, aby kdokoli z odborníků mohl podle něho a při použití uvedených citací práci opakovat.

Výsledky

Doporučuje se nepoužívat k vyjádření kvantitativních stavů tabulek a dát přednost grafům nebo tabulky shrnout ve statistickém hodnocení naměřených hodnot. Tato část by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale pouze faktické nálezy.

Diskuse

Diskuse obsahuje zhodnocení práce. Diskutuje se o možných nedostacích a práce se konfrontuje s výsledky dříve publikovanými (požaduje se citovat jen ty autory, kteří mají k publikované práci bližší vztah), pokud mají souvislost nebo pokud jsou s předloženou prací nějak srovnatelné.

Poděkování

Je-li to nutné, uvádí se stručné poděkování (jedna až dvě věty), např.: za technickou spolupráci, za pomoc při statistickém zpracování, za poskytnutí méně běžného léčiva apod.

Literatura

Musí odpovídat státní normě ČSN 01 0197. Citace se řadí abecedně podle jména prvních autorů: příjmení (verzálkami), zkratka jména, plný název práce, úřední zkratka časopisu, ročník, rok vydání, první stránka, poslední stránka; u knih je uvedeno místo vydání, vydavatel a rok. Odkazy na literaturu v textu uvádějí jméno autora a rok vydání. Do seznamu se zařadí jen práce citované v textu. Na práce v seznamu literatury musí být odkaz v textu.

Adresa autora

Na zvláštním listě uvede autor akademický titul, jméno (ne jen zkratku), příjmení, vědeckou hodnost a podrobnou adresu pracoviště s PSČ, číslem telefonu a faxu. U spoluautorů uvede akademický titul, jméno a příjmení, název a místo pracoviště.

Sedmnáctý Světový kongres Společnosti pro vědy a umění

Praha se stane ve dnech 26. až 29. června 1994 již podruhé dějištěm Světového kongresu Společnosti pro vědy a umění. V pořadí sedmnáctý kongres je pořádán ve spolupráci s Radou českých vědeckých společností a pod záštitou prezidenta České republiky Václava Havla. Patronaci nad kongresem převzala Akademie věd České republiky, České vysoké učení technické v Praze, Univerzita Karlova v Praze, Masarykova univerzita v Brně a Univerzita Palackého v Olomouci. Mottem kongresu je příspěvek Čechů a Slováků ke světové kultuře.

Kongres je rozdělen do 32 sekcí: historie; muzikologie a hudební historie; umění, historie umění; literární historie a kritika; literatura; lingvistika, literární věda, informační věda; judaica; náboženství; filozofie, estetika, etika; mezinárodní vztahy; stát, právo a politika; ekonomie, ekonometrie, management; vědní politika; psychologie, sociologie; antropologie; sociální činnost; etnografie; historie vědy; výchova a vzdělávání; medicína a zdravotnictví; astronomie; matematika, fyzika; chemie; geologie; biologie, fyziologie, genetika; farmakologie; ekologie; zemědělství a potravinářství; lesnictví; technika; doprava. Příspěvky budou zaměřeny na historický vývoj, současný stav i perspektivy jednotlivých oborů z pohledu Čechů a Slováků žijících v zahraničí i odborníků domácích - z vysokých škol, vědeckých a výzkumných ústavů a ústředních orgánů. Jednacím jazykem budou angličtina, čeština a slovenština.

Slavnostní zahájení kongresu se uskuteční v Dvořákově síni Rudolfiny, pracovní jednání v areálu ČVUT v Praze-Dejvicích. Kongres je doprovázen řadou společenských a kulturních akcí. Je pořádán v týdnu, který předchází Vsesokolskému sletu v Praze.

Součástí kongresu bude Konference lesnické sekce, kterou pořádá Národní lesnický komitét pod záštitou Společnosti pro vědy a umění se sídlem ve Washingtonu, Rady vědeckých společností v Praze, Odvětví lesního hospodářství Ministerstva zemědělství České republiky a Sekce ochrany přírody a krajiny Ministerstva životního prostředí České republiky.

Jednací část konference se uskuteční v pondělí 27. června na Strojní fakultě ČVUT v Praze-Dejvicích. Na jednání naváže dvoudenní exkurze (28. a 29. června) do Vodňanských bučin, Žďárských vrchů, Školního lesního podniku (Masarykův les) a arboreta Vysoké školy zemědělské v Brně.

Bližší informace získáte na těchto adresách:

o Světovém kongresu Společnosti pro vědy a umění:

Rada vědeckých společností České republiky, Národní 3, 111 42 Praha 1,
tel. 242 405 30, 242 203 84, fax 242 405 31, 242 209 44

o Konferenci lesnické sekce:

Sekretariát Národního lesnického komitétu (ing. B. Vinš),

Žabovřeská 210, 156 00 Praha 5, tel. 798 33 96 nebo 286 22 07, fax 231 28 36

OBSAH – CONTENTS

Heinová D., Blahovec J., Kováč G.: Nové poznatky o izoenzýmoch laktátdehydrogenázy v krvných sérach ošípaných pri porážke – New aspects of lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in the serum of pigs at slaughter.	287
Čorba J., Krupicer I., Várady M., Pet'ko B.: Účinnosť intraruminálnych albendazolových bôlusov na gastrointestinálne nematódy a trematódy <i>Dicrocoelium dendriticum</i> u oviec – Efficacy of intraruminal albendazole capsules against gastrointestinal nematodes and trematodes <i>Dicrocoelium dendriticum</i> in sheep	297
Hámpel J., Herzig I., Vlček J.: Pharmacokinetics of sodium humate in chickens – Farmakokinetika humátu sodného u kuŕat.	305
Tadesse W. M., Čížek A.: The isolation of salmonellae from poultry carcasses and equipments in the poultry processing plant by means of two procedures – Izolace salmonel z jatečné drůbeže a zařízení drůbežích jatek dvěma postupy.	315
Kotrbaček V., Halouzka R., Jurajda V., Knotková Z., Filka J.: Zvýšení obranyschopnosti brojlerů po podávání biologických krmných doplňků – Enhancement of defence mechanisms in broilers after administration of biological feed supplements	321
Čonková E.: Bioklíma výkrmne brojlerových kurčiat a jej vplyv na mykotickú kontamináciu – Bioclimate of the hall for broiler chickens and its influence on mycotic contamination	329
Hejlíček K., Tremel F., Černý L.: Epizootologie a patogeneze aviární mykobakteriôzy u havrana polního (<i>Corvus frugilegus</i>) – Epizootology and pathogenesis of avian mycobacteriosis in the rook (<i>Corvus frugilegus</i>)	337
Juriš P., Gulovič J., Lašanda V., Ružík V., Plachý P.: Bakteriologický, mykologický a parazitologický prieskum kontaminácie bitúnkových odpadových vôd – Bacteriological, mycological and parasitological survey of slaughterhouse wastewaters contamination	345

UPOZORNĚNÍ PRO ODBĚRATELE

Od letošního roku vyřizuje veškeré služby spojené s distribucí časopisu Veterinární medicína vydavatel - Ústav zemědělských a potravinářských informací Praha.

Objednávky na předplatné posílejte na adresu:

Ústav zemědělských a potravinářských informací
referát odbytu
Slezská 7
120 56 Praha 2

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA ● Vydává Česká akademie zemědělských věd a Slovenská akadémia pôdohospodárskych vied - Ústav zemědělských a potravinářských informací ● Vychází měsíčně ● Redaktorka: ing. Zdenka Radošová ● Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/257541 ● Sazba: Studio DOMINO - ing. Jakub Černý ● Popovice 144, 267 01 Králův Dvůr, tel.: 0311/22959 ● Tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1994

Rozšiřuje Ústav zemědělských a potravinářských informací, referát odbytu, Slezská 120 56 Praha