

ÚZPI

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

2

VOLUME 40 (LXVIII)
PRAHA
FEBRUARY 1995
CS ISSN 0375-8427

Mezinárodní vědecký časopis vydávaný z pověření České akademie zemědělských věd a s podporou Ministerstva zemědělství České republiky

An international journal published by the Czech Academy of Agricultural Sciences and with the promotion of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic

Editorial Board – Redakční rada

Chairman – Předseda

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

Members – Členové

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

Doc. MVDr. Ivan Herzig, CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

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

Prof. MVDr. Bohumil Ševčík, DrSc., BIOPHARM – Research Institute of Biopharmacy and Veterinary Drugs, a. s., Jílové u Prahy, Czech Republic

Prof. MVDr. Zdeněk Věžník, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Editor-in-Chief – Vedoucí redaktorka

Ing. Zdeňka Radošová

Cíl a odborná náplň: Časopis uveřejňuje původní vědecké práce a studie typu review ze všech oblastí veterinární medicíny.

Časopis Veterinární medicína uveřejňuje práce v češtině, slovenštině a angličtině.

Časopis je citován v bibliografickém časopise Current Contents – Agriculture, Biology and Environmental Sciences a abstrakty z časopisu jsou zahrnuty v těchto databázích: Agri-Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

Periodicita: Časopis vychází měsíčně (12x ročně), ročník 40 vychází v roce 1995.

Přijímání rukopisů: Rukopisy ve dvou vyhotoveních je třeba zaslat na adresu redakce: Ing. Zdeňka Radošová, vedoucí redaktorka, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/25 75 41–9, fax: 02/25 70 90. Den doručení rukopisu do redakce je uváděn jako datum přijetí k publikaci.

Informace o předplatném: Objednávky na předplatné jsou přijímány pouze na celý rok (leden–prosinec) a měly by být zaslány na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací, vydavatelské oddělení, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 1995 je 396 Kč.

Aims and scope: The journal publishes experimental papers and reviews from all fields of veterinary medicine.

The journal Veterinární medicína publishes original scientific papers written in Czech, Slovak or English.

The journal is cited in the bibliographical journal Current Contents – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, abstracts from the journal are comprised in the databases: Agri-Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

Periodicity: The journal is published monthly (12 issues per year), Volume 40 appearing in 1995.

Acceptance of manuscripts: Two copies of manuscript should be addressed to: Ing. Zdeňka Radošová, editor-in-chief, Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/25 75 41–9, fax: 02/25 70 90. The day the manuscript reaches the editor for the first time is given upon publication as the date of reception.

Subscription information: Subscription orders can be entered only by calendar year (January–December) and should be sent to: Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Subscription price for 1995 is 92 USD (Europe), 96 USD (overseas).

OBSERVATION OF ROBERTSONIAN TRANSLOCATION IN A CATTLE POPULATION

NÁLEZ ROBERTSONOVEJ TRANSLOKÁCIE V CHOVE HOVÄDZIEHO DOBYTKA

B. Holečková, I. Šutiaková, N. Pijáková

Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: Robertsonian translocation (centric fusion) is one of the most frequent types of chromosome aberrations found in cattle. Observing the health state of a group of dairy cows in the fallout region of a metallurgical plant, centric fusion of chromosomes was discovered in one animal. Chromosome fusion is supposed within pairs 13–24 (dicentric translocation). Although the finding was started in a commercial flock, it is rather interesting from the viewpoint of the R. translocation type and because of the fact that the father of this dairy cow (bull NOM-37) had been used in insemination for several years and his semen is still preserved for further use.

cattle; chromosome; Robertsonian translocation

ABSTRAKT: V práci sme sa zaoberali nálezom chromozómovej aberácie typu centrickej fúzie, zistenej u jednej zo skupiny cytogeneticky vyšetrovaných dojníc. Na fúzaných chromozómoch sme identifikovali dva bloky heterochromatínu. Jedná sa o dicentrický typ fúzie, pravdepodobne v rámci 13.–24. páru.

dobytok; chromozómy; Robertsonova translokácia

ÚVOD

Robertsonova translokácia (R. t.) je jeden z najfrekvencovanejších typov aberácií chromozómov zisťovaný u dobytka. Najznámejšou a najlepšie preštudovanou je u chromozómov 1 a 29 (R. t. 1/29). Okrem nej bolo u dobytka zistených najmenej 24 rôznych Robertsonových translokácií (Eldridge, 1985).

V našej práci sme sa zaoberali translokáciou chromozómov u jednej zo skupiny dojníc, ktorá bola cytogeneticky vyšetrená v rámci dlhodobého sledovania zdravotného stavu dobytka zo spádovej oblasti Východoslovenských železiarní a. s.

MATERIÁL A METÓDY

V jesennom období roku 1991 sme v rámci sledovania zdravotného stavu dojníc zo spádovej oblasti VSŽ a. s. urobili cytogenetické vyšetrenia 12 zvierat z užitočného chovu v lokalite Veľká Ida.

Dojnicu s neskôr zisteným nálezom Robertsonovej translokácie (ušné číslo 00136, nar. 13. 8. 1984, SNČ 50 %) bola dcérou býka NOM-37 (nar. 10. 12. 1981) a matky s ušným číslom 32 432 (t. č. vyradená z chovu).

Vzorky krvi sme odobrali z *vena jugularis* zvierata do heparinizovaných skúmaviek. 0,25 ml heparinizovanej periférnej krvi sme pridali do kultivačného média GPM-1 (MEM, laktalbumínhydrolyzát, rastové proteíny GPBoS-10%, NaHCO₃ – ÚSOL, Praha). Kultivačné médium ďalej obsahovalo: fytohemaglutinín HA 15

(Welcome) – 2,5 % z celkového objemu média, 100 µg/ml streptomycínu, 100 m. j./ml penicilínu. Kultúry boli kultivované 48 h v biologickom termostate pri teplote 38 °C. Delenie buniek sme zastavili kolchicínom (Fluka) vo finálnej koncentrácii 100 µg/ml 15–20 minút pred ukončením kultivácie.

Preparáty sme pripravili metódou podľa autorov Moorhead a i. (1960). Farbili sme ich konvenčnou farbiacou metódou a ďalšími metódami, potrebnými k identifikácii konštitutívneho heterochromatínu – C-pruhovanie (Sumner, 1972) a párov homologických chromozómov – GTG-pruhovanie (Tejskalová a i., 1988).

Pomocou svetelného mikroskopu sme vyhodnotili 100 konvenčne zafarbených mitóz v c-metafáze, 25 metafázových buniek ofarbených G-pruhovacou metódou a 50 metafázových buniek ofarbených C-pruhovacou metódou.

Karyotypy boli zostavené podľa doporučenia konferencie v Readingu (Anonymus, 1976), nomenklatúry Lin a i. (1977) a ISCNA (Anonymus, 1989).

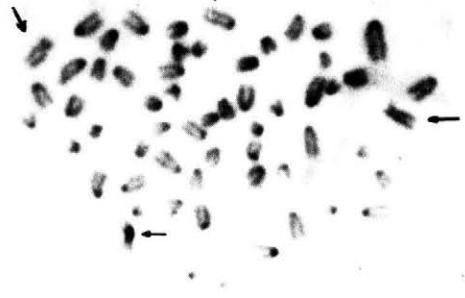
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Po vyhodnotení 100 konvenčne zafarbených c-metáfáz sme v 100 % prípadov zistili Robertsonovu translokáciu chromozómov v hererozygotnom stave. Diploidný počet chromozómov bol 59, XX, (obr. 1).

Prítomnosť dvoch blokov heterochromatínu v oblasti centromér C-pruhovaných chromozómov naznačuje dicentrický typ fúzie (obr. 2). Napriek využitiu GTG-pruhovacej



1. Konvenčne zafarbená metafáza kravy nositeľky Robertsonovej translokácie v heterozygotnom stave; 59, XX, t – Conventionally stained metaphase of R. translocation bearing cow in the heterozygous state; 59, XX, t



2. Metafáza kravy s Robertsonovou translokáciou zafarbená metódou C-pruhovania chromozómov; 59, XX, t – Metaphase stained by C-banding of chromosomes of the R. translocation-bearing cow; 59, XX, t

metódy sa nám nepodarilo s istotou identifikovať chromozómy podieľajúce sa na tomto type translokácie. Predpokladáme, že by mohlo ísť o chromozómy 13.–24. páru.

Dicentrický typ translokácie 14/24 popísal u podolského dobytká Di Bernardino a i. (1979). Eldridge (1985) uvádza v prehľade rôznych typov translokácií chromozómov aj translokáciu typu 13/21 u plemena holštajnsko-frízskeho, 14/20 u plemena švajčiarsko-simentálskeho a 11/20 u dobytká našej proveniencie. Uvedený autor poukazuje na fakt, že v mnohých prípadoch neboli použité bandovacie metódy, takže chýbala presnejšia identifikácia zúčastnených chromozómov. Až po konferencii v Readingu bola napr. presnejšie detekovaná centrická fúzia chromozómov 13 a 21 ako translokácia typu 14/20. C- a G-pruhovanie odhalilo dva bloky heterochromatínu v primárnej konštrukcii metacentrického chromozómu vzniknutého translokáciou.

Na základe poznatkov o dedičnosti Robertsonovej translokácie zapríčinennej centrickou fúziou dvoch akrocentrických chromozómov (ktorá sa prenáša z heterozygotných rodičov na ich potomstvo ako dominantná) sa očakáva, že polovica potomstva má ten istý typ R. t. ako rodičia (Miyake, 1991). Je možné predpokladať, že deéra 00136 získala translokáciu od svojho otca-býka NOM-37, ktorý ju počas pôsobenia v reprodukčnom procese odovzdal svojím potomkom. Zistili sme, že uvedený býk pôsobil viac rokov v inseminácii, potom bol odporazený a jeho semeno uskladnené hlbokým zmrazením. Z dôvodov obtiažneho získania presných podkladov o distribúcii ďalších potomkov býka (ako aj potomkov dojníc s nálezom) do rôznych úžitkových chovov sa nám uvedenú domnienu nepodarilo potvrdiť.

Napriek tomu, že v porovnaní s R. t. 1/29 sa iné typy translokácií zvyčajne vyskytujú v nízkych frekvenciách, bolo by zaujímavé sledovať ich distribúciu

v chovoch, prípadne ich súvislosť s výskytom nežiadúcich znakov, najmä ak sa nájdu u hospodárskych zvierat používaných v plemenitbe.

LITERATÚRA

- ANONYMUS: Reading Conference 1976. Proceedings of the First International Conference for the Standardization of Banded Karyotypes of Domestic Animals. Reading, England, 1976. In: *Hereditas*, 92, 1980: 145–162.
- ANONYMUS: ISCNDA 1989. International System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals. The Second International Conference on Standardization of Domestic Animal Karyotypes. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 53, 1990: 65–79.
- DI BERNARDINO, D. – IANNUZZI, L. – FERRARA, L. – MATASSINO, D.: A new case of Robertsonian translocation in cattle. *J. Hered.*, 70, 1979: 436–438.
- ELDRIDGE, E. F.: *Cytogenetic of Livestock*, Westpoint, Connecticut, USA, Avi Publishing Company, INC 1985: 122–143.
- LIN, C. C. – NEWTON, D. R. – CHURCH, R. B.: Identification and nomenclature of G-banded bovine chromosomes. *Can. J. Genet. Cytol.*, 19, 1977: 271–282.
- MIYAKE, Y. Y. – MURAKAMI, R. K. – KANEDA, Y.: Inheritance of Robertsonian Translocation 1/21 in the Holstein-Friesian cattle. I. Chromosome Analysis. *J. Vet. Med. Sci.*, 53, 1991: 113–116.
- MOORHEAD, P. S. – NOWELL, P. C. – MELLMAN, W. J. – BATTIPS, D. M. – HUNGERFORD, D. A.: Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.*, 20, 1960: 613–616.
- STEJSKALOVÁ, E. – KODEJŠOVÁ, S. – GOETZ, P.: *Metody analýzy chromozómu*, Brno, Cytogenetická sekce Československé biologické spoločnosti ČSAV 1988. 22 s.
- SUMNER, A. T.: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell. Res.*, 75, 1972: 304–306.

Došlo 4. 5. 1994

Kontaktná adresa:

RNDr. Beáta Holečková, Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Hlinkova 1/A, 040 01 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/622 00 74, fax 095/318 53

POSSIBILITIES OF ELIMINATION OF MAGNESITE LIGHT ASHES IMPACTS IN BEEF BULLS

MOŽNOSTI ELIMINÁCIE PÔSOBENIA MAGNEZITOVÝCH ÚLETOV U VÝKRMOVÝCH BÝKOV

J. Bیره¹, P. Bartko¹, F. Jenčík¹, T. Weissová¹, M. Jesenská¹, M. Bیرهová²

¹University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

²Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: The objective of the paper was to test efficiency of feed ration enriched with calcium, phosphorus salts and fat concentrate for elimination of negative impacts of magnesite light ashes in beef bulls kept in an exposure area of magnesite works. For this purpose, 24 animals received a feed mix fortified with dicalcium phosphate at a rate of 100 g per head/day for eight months (P1 group) and another group of 24 bulls were administered a feed mix with an addition of 8% corn fat concentrate (P2 group). The other 24 animals were control (control group K). The clinical picture involved the occurrence of mild to profuse diarrheas which were alternately characteristic of all animal species in the first two months of the trial. Feed intake of the investigated groups was equal. Supplementation of feed ration with dicalcium phosphate and corn concentrate increased the weight gains of experimental animals in comparison with control bulls, the increase being 13.2 and 24.5%, resp. In comparison with the control bulls, the intake of the above supplements did not basically influence the dynamics of hematological profile indicators in the experimental bulls (Figs. 1–4). As for the parameters of hepatic profile, in the 3rd month of testing AST activity was positively influenced in both experimental groups if compared with the control group ($P < 0.01$), Fig. 5, and at the end of observation ALT activity in P2 group ($P < 0.01$), Fig. 6. Bilirubinemia dynamics did not change in the investigated groups after administration of either supplement (Fig. 9). ALP activity maintained statistically insignificantly higher values in the control animals in the second half of the trial, which demonstrated impairment of mineral metabolism in this group (Fig. 8). Significant differences in IgC levels between the control and experimental groups were confirmed in the 3rd month of the trial ($P < 0.01$), Fig. 12. In comparison with the control animals, the effect of dietary dicalcium phosphate supplementation in the experimental group P1 and dietary fat extract supplementation in the P2 group was observed in Ca, P and Mg concentrations to a more significant extent in the examined organs as well as in blood serum (Tabs. I–V). Except in spleen, there was a trend of higher cumulation of Ca in all the examined organs of bulls receiving dicalcium phosphate supplement. Phosphorus cumulation showed the same dependence upon dicalcium phosphate intake in the examined organs. Mg deposition in all examined organs showed minimum differences between the experimental groups and control animals. The response of Fe, Cu and Zn concentrations in blood serum and examined organs of the experimental animals was minimum to dietary dicalcium phosphate and fat extract while the significant differences determined between the experimental groups and control group during testing did not reveal any explicit relationship.

beef cattle; magnesite light ashes; elimination of negative effect; dicalcium phosphate; corn extract

ABSTRAKT: Cieľom práce bolo overiť účinnosť kŕmnej dávky obohatenej soľami vápnika, fosforu a tukovým koncentrátom pri eliminácii negatívneho pôsobenia magnezitových úletov u výkrmových býkov chovaných v exponovanej oblasti magnezitových závodov. Za tým účelom dostávalo 24 zvierat počas ôsmich mesiacov kŕmnu zmes fortifikovanú dikalciumfosfátom v množstve 100 g na kus a deň (P1) a ďalších 24 býkov bolo kŕmených zmesou s prídavkom 8% kukuričného tukového koncentrátu (P2). Ostatných 24 zvierat slúžilo ako kontrola (K). V klinickom obraze dominoval výskyt miernych až profúzných hnačiek, ktoré boli striedavo charakteristické pre všetky skupiny zvierat v prvých dvoch mesiacoch experimentu a ich výskyt nebol jednoznačne ovplyvnený aplikáciou dikalciumfosfátu alebo tukového koncentrátu. Príjem uvedených látok preukazne neovplyvnil u experimentálnych býkov pri porovnaní s kontrolnými dynamiku ukazovateľov hematologického profilu. Z parametrov hepatálneho profilu bola pozitívne ovplyvnená u oboch pokusných skupín oproti kontrolnej v treťom mesiaci overovania aktivita AST ($P < 0,01$) a ALT na konci pozorovania u P2 skupiny ($P < 0,01$). Fortifikácia kŕmnej dávky dikalciumfosfátom a kukuričným extraktom pozitívne vplývala u experimentálnych zvierat na produkciu sérových imunoglobulínov. Vplyv suplementácie kŕmnej dávky uvedenými látkami sa u pokusných býkov významnejšie prejavil na hladinách Ca, P a Mg vo vyšetrovaných orgánoch ako v krvnom sére. Odozva koncentrácie Fe, Cu a Zn v krvnom sére a vyšetrovaných orgánoch experimentálnych zvierat bola na podaný dikalciumfosfát a tukový extrakt minimálna a významné rozdiely, ktoré sme v priebehu overovania zaznamenali medzi pokusnými skupinami a kontrolnou neprejavili jednoznačnú závislosť. Priemerný denný hmotnostný prírastok bol oproti kontrolným býkom v pokusnej skupine P1 vyšší o 13,2 % a v P2 skupine o 24,5 %.

výkrmový dobytok; magnezitový úlet; eliminácia negatívneho účinku; dikalciumfosfát; kukuričný extrakt

ÚVOD

S rozvojom magnezitového priemyslu v regióne Jelšava-Lubeník narastá u hospodárskych a voľne žijúcich zvierat riziko nadbytočného príjmu Mg z magnezitových úletov. Dominantným klinickým nálezom u hovädzieho dobytky bola pri experimentálnej magnezitovej záťaži profúzna hnačka (Bíreš a i., 1994). Mechanizmus digestívnych porúch pri zvýšenom príjme Mg sa na tráviaci systém vysvetľuje hypermotilitou tráviaceho traktu, gastroenteritídami, dyspepsiami, zníženou resorpciou živín a metabolickou alkalózou (Gdovin a Vrzgula, 1967; Delaigue a Duchene-Marulaz, 1979). Z ostatných negatívnych vplyvov sa u laboratórných zvierat vystavených magnezitovému úletu zistil pokles fertility, počet narodených mláďat, zníženie hmotnosti vnútorných orgánov pri odstave a nárast koncentrácie Mg v pľúcach a svalovine (Reichrtová a i., 1984). Erytropénia vzniká u zvierat po expozícii k magnezitovým emisiám ako dôsledok narušenia rezistencie erytrocytarnej membrány (Reichrtová, 1982). Hepatotoxický účinok magnezitových emisí sa u jalovic prejavil stúpnutím aktivity sérových transamináz (Bíreš a i., 1994).

Významná z hľadiska mechanizmu pôsobenia Mg na biologické systémy prežúvavcov v priebehu magnezitovej záťaže je jeho reakcia s niektorými metabolitmi. Interakcia Mg s ostatnými biologickými látkami prebieha v procese absorpcie, intermediárneho metabolizmu a sekrécie (Vrzgula a i., 1990; Khorasani a Armstrong, 1992). Najdôležitejšie u prežúvavcov sú metabolické vzťahy Mg s ostatnými makro- a mikropvkami, ale aj lipidovým, sacharidovým a bielkovinovým metabolizmom (Waterman a i., 1991; Brink, 1992). Poznatky o metabolických závislostiach Mg a ostatných živín počas jeho nadbytočného príjmu je možné aplikovať pri metódach eliminácie toxického účinku Mg na organizmus zvierat.

Cieľom práce bolo overiť účinnosť kŕmnej dávky obohatenej soľami vápnika, fosforu a tukovým koncentrátom pri eliminácii negatívneho pôsobenia magnezitových úletov u výkrmových býkov.

MATERIÁL A METÓDY

Sledovania prebehli na hospodárstve lokalizovanom v priemyselnom aglomeráte magnezitových závodov Jelšava-Lubeník u 72 výkrmových býkov plemena čiernostrakatého a slovenského strakatého v zástavovej hmotnosti 210 ± 10 kg. Kŕmna dávka u všetkých zvierat pozostávala z kukuričnej siláže, sena a tvarovaného krmiva (seno 38 %, bielkovinové úsušky 22 %, melasa 8 %, kŕmna zmes HŽB 30 %, kŕmna soľ 1 %, minerálna kŕmna prísada MKP₃ 1 %). Objemové krmivo pochádzalo z oblastí zaprašovaných magnezitovým úletom. 24 zvierat dostávalo kŕmnu zmes HŽB fortifikovanú dikalciumfosfátom v množstve 100 g na kus

a deň (pokusná skupina P1) a ďalších 24 býkov bolo kŕmených zmesou HŽB s prídavkom 8% kukuričného tukového koncentrátu (pokusná skupina P2). Ostatné zvieratá dostávali pôvodnú kŕmnu zmes HŽB (kontrolná skupina K).

Klinické sledovanie všetkých zvierat sa počas overovania robilo pri pravidelných návštevách chovu (dvakrát mesačne) a na základe údajov veterinárnej a zootechnickej služby. Pre štúdium ukazovateľov vnútorného prostredia bolo z každej skupiny vybraných šesť zvierat, od ktorých sa odobrala krv z v. *jugularis* pred zahájením experimentu (február), v marci, apríli, júni a septembri (koniec experimentu). V krvi sa bežnými hematologickými metódami stanovil počet erytrocytov (Er), leukocyto (Lc), hematokritová hodnota (Hk) a koncentrácia hemoglobínu (Hb) – Slanina, Dvořák a kol. (1993). Aktivity sérových enzýmov aspartátaminotransferázy (AST – E.C.2.6.1.1.), alanínaminotransferázy (ALT – E.C.2.6.1.2.), gamaglutamyltranspeptidázy (GMT – E.C.2.3.2.1.) a alkalické fosfatázy (ALP – E.C.3.1.3.1.) bola determinovaná BioLa testom (Lachema Brno). Koncentrácia albumínu (ALB) bola v krvnom sére stanovená fluorometricky na prístroji Jasco FP 550, celkových bielkovín (CB) BioLa testom (Lachema Brno), celkových imunoglobulínov (IgC) turbidimetricky (McEwan a i., 1970) a celkového bilirubínu (C. bil.) fotometricky (Jendrasik a Grof, 1938).

Analýza krvného séra na obsah Ca, Mg, P, Fe, Cu a Zn bola robená atómovou absorpčnou spektrofotometriou na prístroji Perkin Elmer typ 306 a 1100 postupom podľa Bíreša (1986). Koncentrácia uvedených prvkov bola sledovaná aj v pečeni, obličkách, slezine, svalovine a semeníkoch 18 býkov (šesť zvierat z každej skupiny), ktorí boli odporazení na konci experimentu.

Priemerné denné hmotnostné prírastky sa získali individuálnym vážením zvierat v mesačných intervaloch s presnosťou ± 5 kg. Štatistické porovnanie výsledkov analýz medzi jednotlivými skupinami sa robilo Studentovým *t*-testom.

VÝSLEDKY

KLINICKÝ OBRAZ

V klinickom obraze dominoval výskyt miernych až profúzných hnačiek, ktoré boli striedavo charakteristické pre všetky skupiny zvierat v prvých dvoch mesiacoch experimentu. V ďalšom období sledovania sa objavovali len sporadicky a ich výskyt nebol jednoznačne ovplyvnený aplikáciou dikalciumfosfátu alebo tukového koncentrátu. Medzi ostatné klinické zmeny patrili kožné alopecie a dermatitis digitalis. Ich výskyt sa medzi komparovanými skupinami významne nelíšil. Príjem krmiva u sledovaných skupín bol taktiež rovnaký.

LABORATÓRNY NÁLEZ

Hodnoty hematologického profilu sú uvedené na obr. 1 až 4. Koncentrácia Hb bola v priebehu sledovania u všetkých zvierat na dolnej hranici referenčných hodnôt, pričom najnižší Hb sme zistili u všetkých troch skupín na začiatku experimentu (P1 – $7,8 \pm 0,4$; P2 – $7,8 \pm 0,8$; K – $8,6 \pm 0,9$ g/l). U všetkých sledovaných skupín boli hodnoty Er na začiatku experimentu na hladine indikujúcej anémiu (P1 – $4,6 \pm 0,23$; P2 – $4,69 \pm 0,47$; K – $5,1 \pm 0,5$ T/l). V ďalšom období sledovania počet Er u pokusných skupín a kontroly kolísal v rámci referenčného rozpätia ($5,1$ – $7,9$ T/l). Hodnoty Hk a Lc sa v priebehu pozorovania medzi sledovanými skupinami významne nelíšili a pohybovali sa vo fyziologických hraniciach.

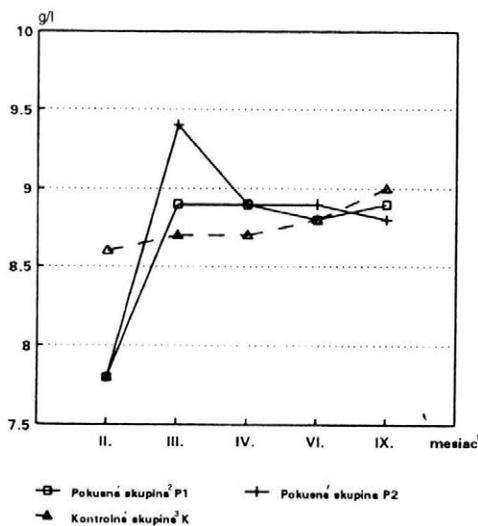
Aktivita sledovaných enzýmov a koncentrácia C. bil. v krvnom sére je znázornená na obr. 5 až 9. Hodnoty AST, ALT a GMT boli počas experimentu u všetkých zvierat vyrovnané a nevybočili z referenčného rozpätia. Signifikantné rozdiely v aktivite AST sme medzi kontrolnou skupinou a pokusnými zvieratami v P1, P2 zaznamenali pri aprílovom odbere ($P < 0,01$) a pri ALT na konci experimentu medzi K a P2 skupinou ($P < 0,01$). Hodnoty ALP dosahovali hornú fyziologickú hranicu od druhej tretiny sledovania u všetkých skupín výkrmových býkov, ale neštatisticky vyššie hladiny ALP sme pozorovali v porovnaní so skupinou P1 a P2 v krvnom sére kontrolných zvierat. Dynamika bilirubinémie mala u sledovaných zvierat vyrovnaný priebeh a počas trvania experimentu neprekročila fyziologické hranice.

Koncentrácia CB a ALB v krvnom sére býkov zo všetkých skupín bola v priebehu overovacieho pokusu

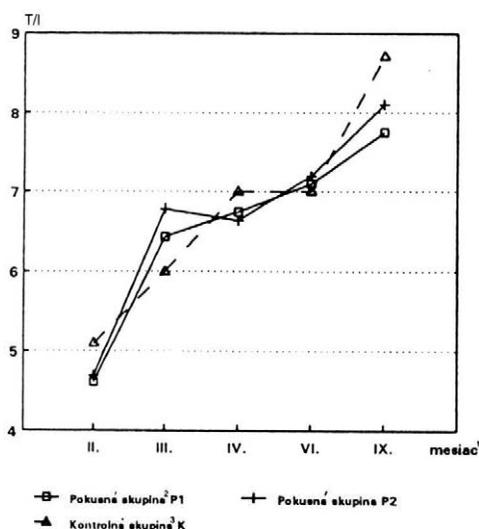
v referenčnom rozpätí a mala rovnaký priebeh (obr. 10, 11). Štatistické rozdiely v dynamike imunoglobulinémie sme pozorovali medzi kontrolnou skupinou a experimentálnymi P1 a P2 pri aprílovom odbere ($P < 0,01$, obr. 12).

Obsah Ca, Mg, P, Fe, Cu a Zn v krvnom sére vyšetovaných zvierat je uvedený na obr. 13 až 18. Hladina Ca v krvnom sére bola na začiatku pokusu u vyšetovaných zvierat všetkých skupín na dolnej fyziologickej hranici (P1 – $2,02 \pm 0,09$, P2 – $2,26 \pm 0,10$, K – $2,15 \pm 0,08$ mmol/l). Mierne zvýšenie sérového Ca sme zaznamenali u všetkých skupín pri marcovom odbere. Najvyšší obsah Ca v krvnom sére býkov kontrolnej a experimentálnych skupín bol na konci experimentu. Preukazne vyššie množstvo Ca v krvnom sére býkov v pokusnej skupine P1 bolo oproti kontrolným v júni ($P < 0,01$). Dynamika P v krvnom sére mala rovnaký priebeh u sledovaných skupín zvierat do piateho mesiaca experimentu (júnový odber). Na konci experimentu boli hladiny P u oboch pokusných skupín v porovnaní s kontrolnou významne vyššie ($P < 0,05$). Koncentrácia Mg bola v krvnom sére býkov zo sledovaných skupín pri zahájení experimentu vyrovnaná (P1 – $0,76 \pm 0,10$; P2 – $0,88 \pm 0,11$; K – $0,87 \pm 0,04$ mmol/l). Štatisticky nižší obsah Mg sme zistili v druhom mesiaci experimentu medzi pokusnou skupinou P1 a kontrolou ($P < 0,01$). Najvyšší sérový Mg sme pozorovali pri aprílovom odbere u zvierat v skupine P2 a K (P2 – $1,37 \pm 0,12$; K – $1,37 \pm 0,16$ mmol/l). V ďalšom období sledovanie množstva Mg v krvnom sére vyšetovaných býkov nebolo ovplyvnené fortifikáciou krmnej dávky dikalciumfosfátom alebo tukovou zložkou.

Hladiny Fe v krvnom sére mali u všetkých skupín zvierat počas pozorovania v porovnaní s východiskovo-

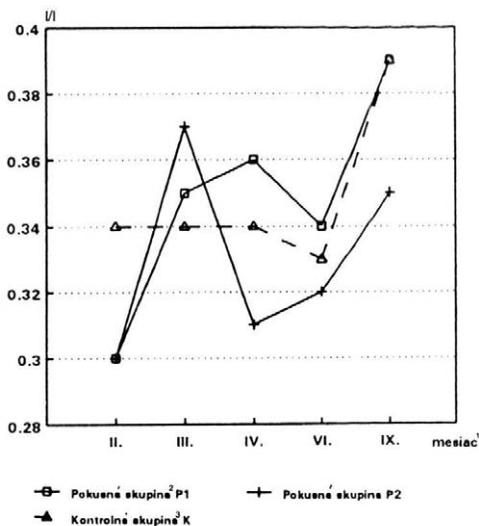


1. Koncentrácia hemoglobínu – Hemoglobin concentration

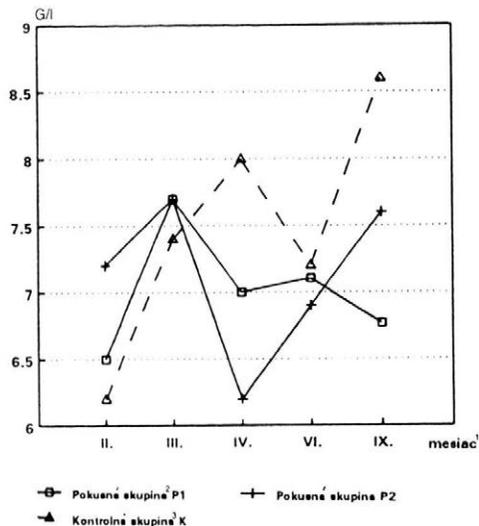


2. Počet erythrocytov – Erythrocyte counts

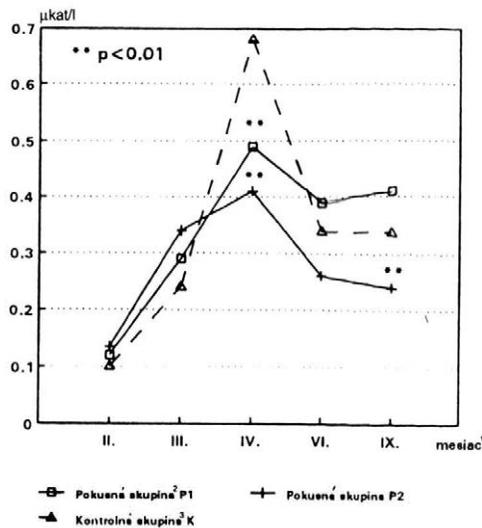
Vysvetlivky pro obr. 1–18 – Explanations for Figs. 1–18: ¹month, ²experimental group, ³control group



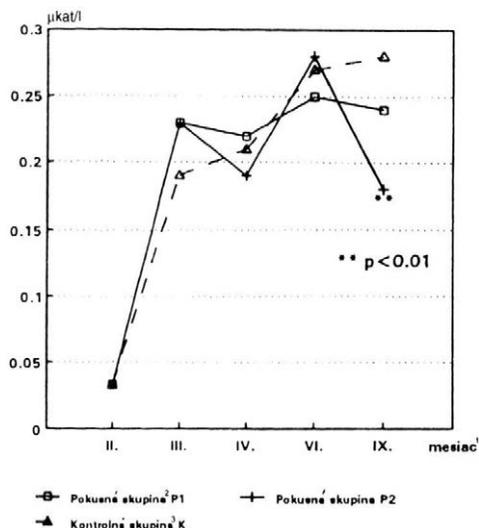
3. Hematokritová hodnota – Hematocrit value



4. Počet leukocytov – Leucocyte counts



5. Aktivita AST v krvnom sére býkov – AST activity in the blood serum of bulls

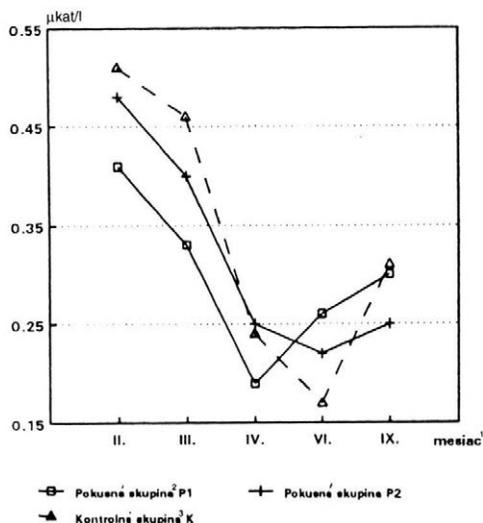


6. Aktivita ALT v krvnom sére býkov – ALT activity in the blood serum of bulls

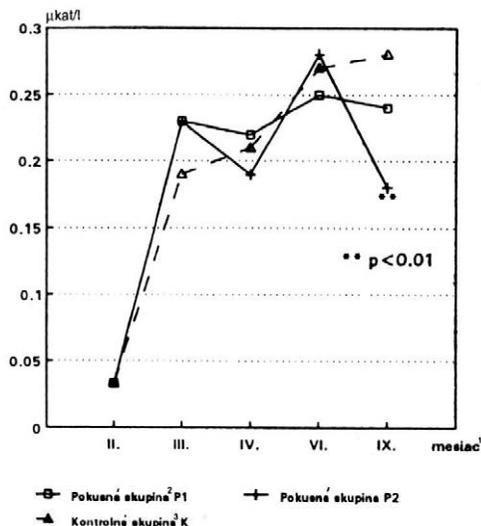
vými hodnotami klesajúci charakter. Preukazný rozdiel v obsahu Fe sme medzi kontrolnou skupinou a pokusnými potvrdili v júni ($P < 0,01$). Klesajúci trend kupremie bol od začiatku experimentu evidentný u všetkých sledovaných skupín. Signifikantne vyššie množstvo Cu sme pozorovali v krvnom sére zvierat oboch pokusných skupín oproti kontrole pri júnovom odbere ($P < 0,01$). Východisková zinkémia a hodnoty Zn v krvnom sére všetkých býkov na konci sledovania boli minimálne rozdielne. Rozdiel v koncentrácii sérového Zn na hladine významnosti $P < 0,01$ sme medzi pokusnou

skupinou P1 a kontrolnou potvrdili v piatom mesiaci experimentu (júnový odber).

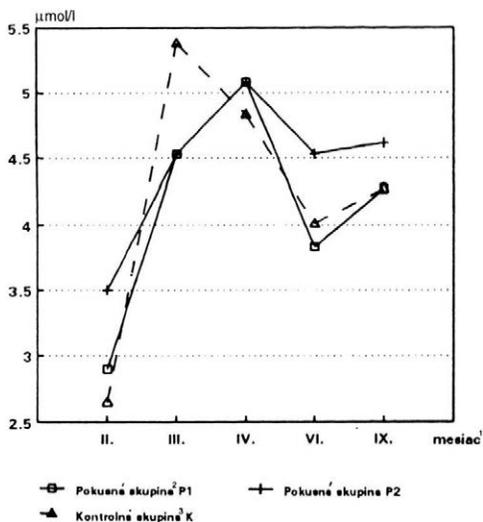
Najvyššie denné hmotnostné prírastky mali za obdobie experimentu zvieratá, ktoré dostávali kŕmnu dávku obohatenú tukovým koncentrátom (0,841 kg) a najnižšie v kontrolnej skupine (0,675 kg). Priemerné hmotnostné prírastky u býkov s kŕmnom dávkou fortifikovanou dikalciumfosfátom predstavovali počas sledovania 0,764 kg. Keď denný hmotnostný prírastok v kontrolnej skupine označíme indexom 100 %, potom u výkrmových býkov v P1 skupine bol vyšší o 13,2 % a v P2 skupine o 24,5 %.



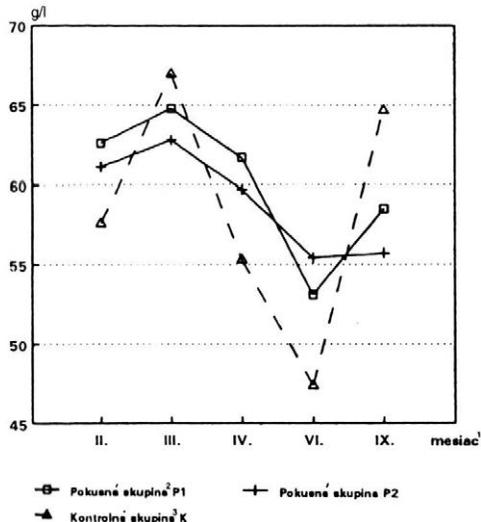
7. Aktivita GGT v krvnom sére býkov – GGT activity in the blood serum of bulls



8. Aktivita ALP v krvnom sére býkov – ALP activity in the blood serum of bulls



9. Koncentrácia C. bil. v krvnom sére býkov – C. bil. concentration in the blood serum of bulls

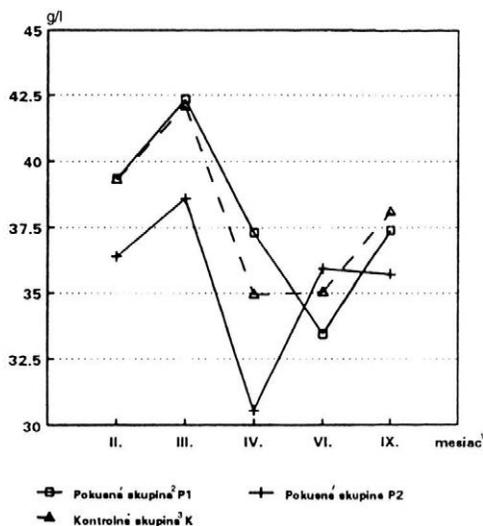


10. Koncentrácia CB v krvnom sére býkov – CB concentration in the blood serum of bulls

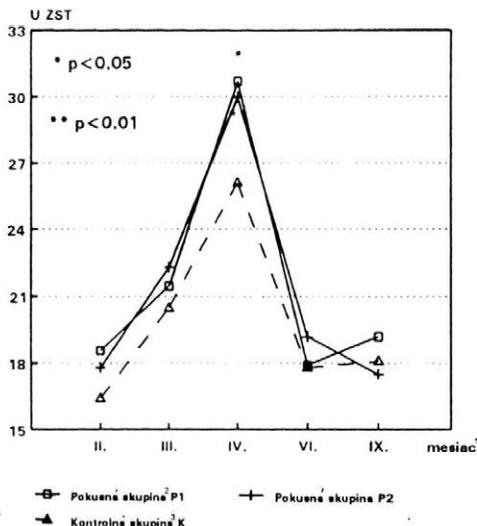
Obsah Ca, Mg, P, Fe, Cu a Zn v pečeni, obličkách, slezine, svalovine a semenníkoch uvádzame v tab. I až V. Tendencia vyššej kumulácie Ca bola okrem sleziny vo všetkých analyzovaných orgánoch u býkov s prídavkom dikalciumfosfátu. Signifikantný rozdiel medzi koncentraciou Ca sme medzi uvedenou skupinou zvierat a kontrolnými pozorovali v semenníkoch ($P < 0,01$). Vyššie množstvo sme vo vyšetrovaných orgánoch zvierat experimentálnej skupiny P1 zistili v porovnaní s pokusnou skupinou P2 a kontrolnou taktiež u fosforu. Preukazné rozdiely na hladine významnosti $P < 0,01$ sme

pozorovali medzi obsahom P v slezine u experimentálnych zvierat P1 a kontrolnými. Štatisticky nižšia koncentrácia P bola u zvierat v pokusnej skupine P2 oproti kontrolnej v pečeni a semenníkoch ($P < 0,05$; $P < 0,01$). Minimálne rozdiely sme zaznamenali medzi experimentálnymi skupinami a kontrolnými zvieratmi v kumulácii Mg vo všetkých sledovaných orgánoch. Najviac Mg kumulovala u všetkých vyšetovaných býkov svalovina.

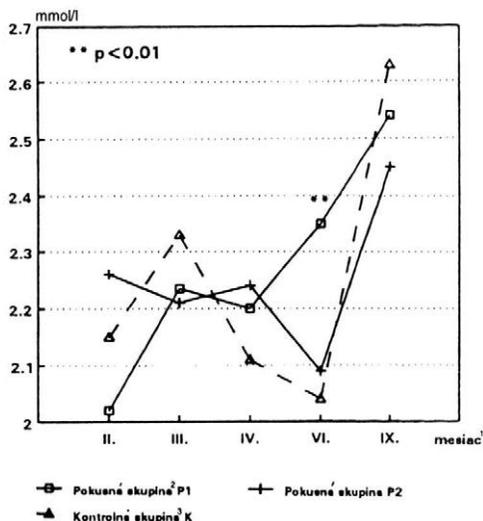
Hladiny Fe, Cu a Zn vo vyšetovaných orgánoch býkov boli minimálne závislé na suplementácii krmnej



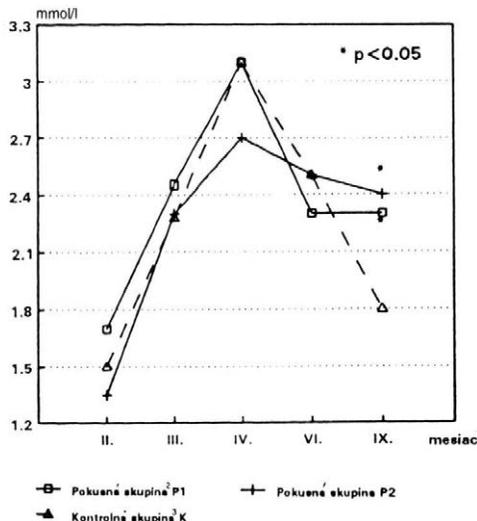
11. Koncentrácia ALB v krvnom sére býkov – ALB concentration in the blood serum of bulls



12. Koncentrácia IgG v krvnom sére býkov – IgG concentration in the blood serum of bulls



13. Koncentrácia Ca v krvnom sére býkov – Ca concentration in the blood serum of bulls



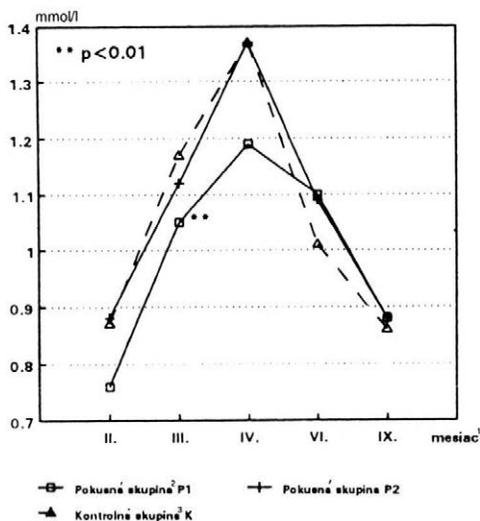
14. Koncentrácia P v krvnom sére býkov – P concentration in the blood serum of bulls

dávky dikalciumfosfátom alebo kukuričným koncentrátom. Signifikantné rozdiely sme evidovali pri kumulácii Fe v obličkách medzi P2 skupinou a kontrolnou ($P < 0,05$) a u Cu v slezine medzi pokusnými skupinami P1 a P2 a kontrolnou ($P < 0,05$) a v semenníkoch medzi P1 a K ($P < 0,01$).

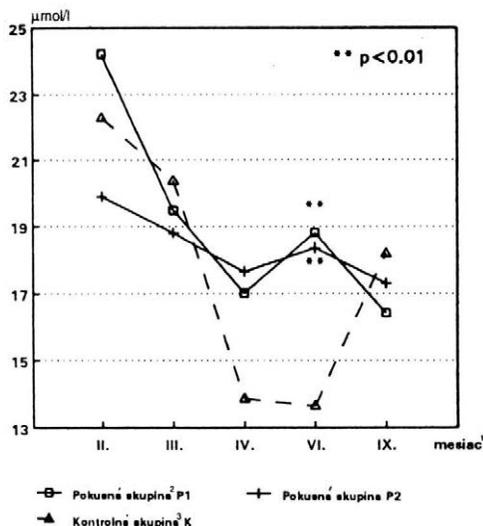
DISKUSIA

Suplementácia krmnej dávky soľami vápnika a fosforu sa zakladá na poznatkoch o vzájomnom ovplyvňo-

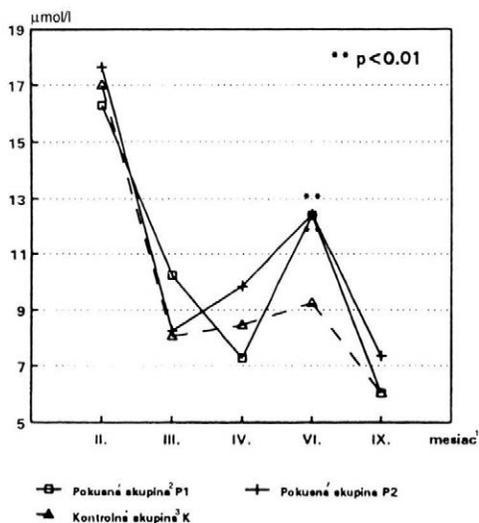
vaní metabolizmu Ca, P a Mg u prežúvavcov. Homeostatické mechanizmy interakcie Ca, P a Mg prebiehajú u prežúvavcov v procese využitia, intermediárneho metabolizmu a vylučovania a sú závislé na aktivite parathyroidného hormónu, kalcitonínu a 1,25-dihydroxyvitamínu D (Reinhardt a i., 1988; Roth a i., 1988). Aktivita uvedených hormónov sa mení podľa diétného príjmu Ca, P, Mg, telových zásob makroprvkov, produkčnej fázy a ich metabolickej potreby (Rayssiguier a i., 1977; Napoli a i., 1983). Pri stavoch nevyváženého príjmu Ca, Mg, P dochádza



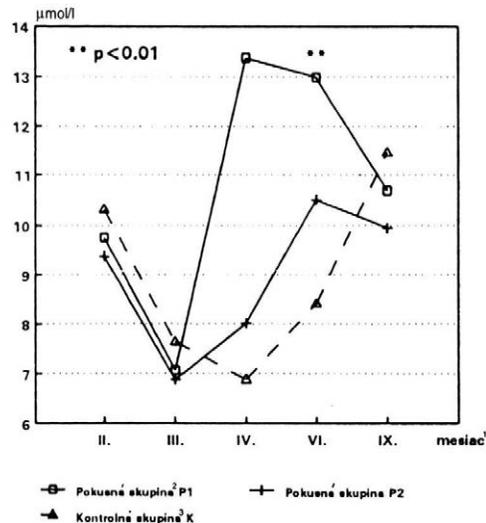
15. Koncentrácia Mg v krvnom sére býkov – Mg concentration in the blood serum of bulls



16. Koncentrácia Fe v krvnom sére býkov – Fe concentration in the blood serum of bulls



17. Koncentrácia Cu v krvnom sére býkov – Cu concentration in the blood serum of bulls



18. Koncentrácia Zn v krvnom sére býkov – Zn concentration in the blood serum of bulls

u prežúvavcov k zvýšenej činnosti regulačných mechanizmov, ktoré sa uplatňujú na rôznej úrovni organizmu (Vrzgula a i., 1990; Brink, 1992). Výsledkom je potom zníženie využitia daného prvku, metabolickej aktivity alebo zvýšená sekrécia z organizmu (Reynolds a i., 1991; Khorasani a Armstrong, 1992).

Fortifikácia krmnej dávky kukuričným koncentrátom v experimentálnej skupine P2 vychádza z negatívneho účinku tuku na absorpciu horčíkových iónov z tráviaceho traktu prežúvavcov (Georgievskij

a i., 1982). Zvýšením tukovej zložky v krmnej dávke sa súčasne zabezpečuje náhrada energetických strát hnačkujúcich zvierat vystavených magnezitovej záťaži (Bartko a i., 1991; Břeš, 1992, 1994).

Z pohľadu uplatnenia uvedených mechanizmov príjem dikalciumfosfátu a tukového koncentráту u experimentálnych býkov neovplyvnil výskyt perzistujúcich hnačiek hlavne v prvej fáze overovania v porovnaní s kontrolnými zvieratmi. Fortifikácia krmnej dávky uvedenými doplnkami sa taktiež neprejavila u pokusných zvierat oproti kontrolnej skupine na množstve pri-

I. Koncentrácia Ca, Mg, P, Fe, Cu a Zn v pečeni (mg/kg čerstvého tkaniva) – Concentrations of Ca, Mg, P, Fe, Cu and Zn in liver (mg/kg fresh tissue)

		Ca	Mg	P	Fe	Cu	Zn
P1	<i>x</i>	52,56	149,39	3 052	38,8	32,52	28,86
	<i>sd</i>	3,08	3,4	34,83	10,84	11,34	7,77
P2	<i>x</i>	44,31	142,75	2 779*	47,19	33,82	34,69
	<i>sd</i>	1,04	4,01	50,21	12,89	7,22	6,74
K	<i>x</i>	50,26	146,9	2 938	39,2	31,38	32,46
	<i>sd</i>	13,26	4,35	130,61	9,58	10,83	3,14

* = $p < 0,05$

Vysvetlivky pro tab. I až V – Explanatory notes to Tabs. I to V

pokusná skupina P1 – experimental group P1

pokusná skupina P2 – experimental group P2

kontrolná skupina – control group

II. Koncentrácia Ca, Mg, P, Fe, Cu a Zn v obličkách (mg/kg čerstvého tkaniva) – Concentrations of Ca, Mg, P, Fe, Cu and Zn in kidneys (mg/kg fresh tissue)

		Ca	Mg	P	Fe	Cu	Zn
P1	<i>x</i>	110,99	144,83	2 319	42,8	7,79	16,84
	<i>sd</i>	66,37	3,25	135,08	5,92	2,53	3,8
P2	<i>x</i>	87,84*	150	2 267	94,1	6,84	19,22
	<i>sd</i>	29,78	3,39	22,44	53,48	1,61	3,15
K	<i>x</i>	107,9	147	2 105	45,5	6,93	17,13
	<i>sd</i>	33,9	3,71	235,52	4,06	1,97	2,47

* = $p < 0,05$

III. Koncentrácia Ca, Mg, P, Fe, Cu a Zn v slezine (mg/kg čerstvého tkaniva) – Concentrations of Ca, Mg, P, Fe, Cu and Zn in spleen (mg/kg fresh tissue)

		Ca	Mg	P	Fe	Cu	Zn
P1	<i>x</i>	57,61	147,3	2 624**	174,9	3,4*	24,32
	<i>sd</i>	7,42	7,51	149,79	74,56	0,83	4,94
P2	<i>x</i>	61,8	145,9	2 413	238,19**	3,08*	28,29
	<i>sd</i>	2,69	1,51	294,24	98,33	0,8	3,25
K	<i>x</i>	61,9	149,6	2 384	183,3	5,06	24,67
	<i>sd</i>	10,31	4,56	75,35	79,2	1,71	3,57

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

jaťého krmiva. Zvýšenie hmotnostných prírastkov u býkov s prídavkom kukuričného koncentráту o 24,5 % v porovnaní s kontrolnými vysvetľujeme nárastom energetickej zložky krmiva. Suplementácia dikalciumfosfátom v množstve 100 g na kus a deň u zvierat v P1 skupine sa dosiahlo zvýšenie prírastkov oproti kontrolným býkom o 13,2 %. Vylepšenie produkčných vlastností krmiva pozorovali u prežúvavcov po obohatení krmnej dávky soľami Ca a P (Vrzgula a kol., 1990; Khorasani a Armstrong, 1992; McCaughan, 1992).

V našom prípade okrem zvýšenia produkčnej kvality krmnej dávky býkov chovaných v exponovanej oblasti magnezitových závodov sa prídavkom dikalciumfosfátu a tuku očakávala eliminácia negatívneho účinku nadbytočného príjmu Mg.

Príjem dikalciumfosfátu a kukuričného extrahovateľného tuku zásadne neovplyvnil u experimentálnych býkov pri porovnaní s kontrolnými dynamiku ukazovateľov hematologického profilu. Z parametrov hepatálneho profilu bola pozitívne ovplyvnená u obidvoch pokusných skupín oproti kontrolnej v treťom mesiaci overovania aktivita AST ($P < 0,01$) a ALT na konci pozorovania u P2 skupiny ($P < 0,01$). Dynamika bilirubinémie sa suplementáciou obidvoch doplnkov medzi sledovanými skupinami nemenila. Aktivita ALP si udržiavala u kontrolných zvierat v druhej polovici experimentu štatisticky nevýznamne vyššie hodnoty, čo je u tejto skupiny dôkazom narušenia minerálneho metabolizmu (Bíreš a Vrzgula, 1987; Fairbrother, 1994) a poukazuje u pokusných býkov na efektívnosť doplnku dikalciumfosfátu a tuku.

IV. Koncentrácia Ca, Mg, P, Fe, Cu a Zn v svalovine (mg/kg čerstvého tkaniva) – Concentrations of Ca, Mg, P, Fe, Cu and Zn in muscles (mg/kg fresh tissue)

		Ca	Mg	P	Fe	Cu	Zn
P1	x	40,42	161,68	1 769	12,39	5,27	3,4
	sd	1,48	10,73	297,25	3,33	1,8	0,49
P2	x	39,01	161,3	1 769	14,79	5,87	4,03
	sd	10,98	8,16	77,48	2,97	2,27	0,27
K	x	42,24	163,45	1 682	26,02	4,63	4,01
	sd	7,96	10	136,5	30,01	1,29	0,62

V. Koncentrácia Ca, Mg, P, Fe, Cu a Zn v semenníoch (mg/kg čerstvého tkaniva) – Concentrations of Ca, Mg, P, Fe, Cu and Zn in the testes (mg/kg fresh tissue)

		Ca	Mg	P	Fe	Cu	Zn
P1	x	82,47**	127,22	2 409	14,25	3,67**	15,57
	sd	5,78	2,4	449,67	1,48	0,37	1,67
P2	x	68,91	123	1 983**	11,19	4,7	16,23
	sd	4,12	2,87	423,8	0,88	0,46	0,84
K	x	72,24	127,7	2 408	21,68	4,9	17,14
	sd	5,49	5,6	213	19,13	0,83	0,93

** = $p < 0,01$

Keď berieme do úvahy zistenia Bíreša a i. (1994), že príjem magnezitového úletu vyvolal u jalovic hypoimmunoglobulinémiu, potom fortifikácia krmnej dávky dikalciumfosfátom a kukuričným extraktom u experimentálnych zvierat pozitívne vplývala na produkciu sérových IgC. Signifikantné rozdiely v hladinách IgC sme medzi kontrolnými a pokusnými skupinami potvrdili v treťom mesiaci experimentu ($P < 0,01$). Dynamika ALB a CB sa skrmovaním uvedených doplnkov u pokusných býkov oproti kontrolným významne nemenila.

Vplyv suplementácie krmnej dávky dikalciumfosfátom u pokusnej skupiny P1 a tukovým extraktom v P2 skupine sa v porovnaní s kontrolnými zvieratmi na hladinách sledovaných makroprvkov významnejšie prejavil vo vyšetrovaných orgánoch ako v krvnom sére. Tendencia vyššej kumulácie Ca bola okrem sleziny vo všetkých analyzovaných orgánoch u býkov s prídavkom dikalciumfosfátu. Obdobná závislosť na skrmovaní dikalciumfosfátu bola aj pri fosfore. Minimálne rozdiely sme však zaznamenali medzi experimentálnymi skupinami a kontrolnými zvieratmi v ukladaní Mg vo všetkých sledovaných orgánoch. Distribúcia P, Ca, Mg v analyzovaných mäkkých tkanivách pokusných a kontrolných býkov zodpovedá ich metabolickej aktivite a je v súlade s doterajšími poznatkami (Vrzgula a i., 1990; Brink, 1992). Odozva koncentrácie Fe, Cu a Zn v krvnom sére a vyšetrovaných orgánoch experimentálnych zvierat bola na podaný dikalciumfosfát a tukový extrakt minimálna a významné rozdiely, ktoré sme v priebehu overovania zaznamenali medzi pokusnými skupinami a kontrolnou neprejavili jednoznačnú závislosť. Zistené hladiny analyzovaných mikroprvkov v krvnom sére a orgánov všetkých býkov indikovali karenciu Fe, Cu a Zn (Underwood, 1977; Bíreš, 1991).

LITERATÚRA

- BARTKO, P. – BÍREŠ, J. – JENČÍK, F. – MICHNA, A. – PAULÍKOVÁ, I. – BENKOVÁ, E. – KOŠČOVÁ, E.: Nadbytočný príjem Mg u prežúvavcov a jeho vplyv na vybrané ukazovatele vnútorného prostredia. In: Zbor. Ref. Symp. o ekológii vo vybraných aglomeráciách Jelšavy-Lubenka a stredného Spiša. Hrádok, 1991: 50–52.
- BÍREŠ, J.: Riešenie deficiencie zinku pri prežúvavcoch a ošípaných. [Kandidátska dizertácia.] Košice 1986. 165 s. – Vysoká škola veterinárska.
- BÍREŠ, J.: Depotný prípravok na báze zinku v prevencii a terapii jeho karencie. [Habilitačná práca.] Košice 1991. 217 s. – Univerzita veterinárskeho lekárstva.
- BÍREŠ, J. – BARTKO, P. – JENČÍK, F. – JUHÁSOVÁ, Z. – BÍREŠOVÁ, M. – JESENSKÁ, M. – WEISSOVÁ, T.: Dynamika parametrov vnútorného prostredia výkrmových býkov v priebehu aplikácie špeciálnych antiodorčiek. In: Zbor. Ref. Symp. o ekológii vo vybraných aglomeráciách Jelšavy-Lubenka a stredného Spiša. Hrádok, 1992: 229–231.
- BÍREŠ, J. – BARTKO, P. – MICHNA, A. – WEISSOVÁ, T. – BÍREŠOVÁ, M. – JENČÍK, F.: Klinicko-biochemické aspekty záťaže jalovic magnezitovým úletom. Vet. Med. – Czech, 39, 1994: 355–356.
- BÍREŠ, J. – VRZGULA, L.: Diagnostický význam alkalickéj fosfatázy pri poruchách metabolizmu zinku oviec. Živoč. Vyr., 32, 1987: 407–413.
- BRINK, E. J.: Nutrition and magnesium absorption. Thesis, Wageningen, NIZO-Verslagen 1992. 137 s.
- DELAIGUE, R. – DUCHENE-MARULAZ, P.: The influence on magnesium deficiency on inflammatory reaction in rats. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys., 19, 1979: 999–1005.
- FAIRBROTHER, A.: Nondestructive biomarkers in vertebrates. In: FOSSI, M. C. – LEONZIO, C. (eds): Clinical

- Biochemistry. Chapter 3. Boca Reton Ann Arbor, London, Tokyo, Lewis Publisher 1994: 63–89.
- GDOVIN, T. – VRZGULA, L.: Zo štúdia vplyvu magnezitového poprašku na hovädzí dobytok a ovce. *Veter. Med. (Praha)*, 12, 1967: 375–382.
- GEORGIEVSKIJ, V. I. – ANNENKOV, B. N. – SAMOCHIN, V. T.: Minerálna výživa zvierat. Bratislava, Príroda 1982. 431 s.
- JENDRASSIK, J. – GROF, P.: Vereinfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Blutbilirubins. *Biochem. Z.*, 297, 1938: 6–13.
- KHORASANI, G. R. – ARMSTRONG, D. G.: Calcium, phosphorus, and magnesium absorption and secretion in the bovine digestive tract as influenced by dietary concentration of these elements. *Livestock. Prod. Sci.*, 31, 1992: 271–286.
- McCAUGHAN, CH. J.: Treatment of mineral disorders in cattle. *Veterinary Clinics of North America. Food Anim. Pract.*, 8, 1992: 107–145.
- McEWAN, A. D. – FISCHER, E. V. – SELMAN, J. E.: Observations on the immune globulin levels of neonatal and their relationship to disease. *J. Comp. Path.*, 80, 1970: 259–265.
- NAPOLI, J. L. – SOMMERFELDT, J. L. – PRAMANIK, P. C.: 19-Nor-10-ketovitamin D₃, vitamin D₂ and 25-hydroxyvitamin D₃. *Biochemistry*, 22, 1983: 2636–2641.
- RAYSSIGUIER, Y. – GAREL, J. M. – DAVICCO, M. J.: Plasma parathyroid hormone and calcitonin levels in hypocalcemic magnesium deficient calves. *Ann. Rech. Vet.*, 8, 1977: 267–273.
- REICHRTOVÁ, E.: Biologické účinky magnezitových imisí na živočíšny organizmus. *Biologické práce* 28, Bratislava, Veda 1982. 102 s.
- REICHRTOVÁ, E. – TAKÁČ, L. – ŠULIČOVÁ, L. – OBRUSNÍK, I. – KAHANEC, J.: Monitoring of magnesite emissions on laboratory and agricultural animals. *Ekológia (ČSSR)*, 3, 1984: 426–433.
- REINHARDT, T. A. – HORST, R. L. – GOFF, J. P.: Calcium, phosphorus, and magnesium homeostasis in ruminants. *Veterinary Clinics of North America. Food Anim. Pract.*, 4, 1988: 331–350.
- REYNOLDS, C. K. – HUNTINGTON, G. B. – TYRREL, H. F. – REYNOLDS, P. J.: Net absorption of macrominerals by portal-drained viscera of lactating Holstein cows and beef steers. *J. Dairy Sci.*, 74, 1991: 450–459.
- ROTH, F. X. – KREUZER, M. – KIRCHGESSNER, M.: Auswirkungen von freier Phosphorsäure als Zulage zu Alleinfuttermitteln für Ferkel und Mastschweine auf die Bilanzen an einigen Mineralstoffen (P, Ca, K, Na, Mg, Zn). *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.*, 59, 1988: 247–254.
- SLANINA, L. – DVOŘÁK, R. a kol.: Veterinárná klinická diagnostika vnútorných chorôb. Bratislava, Príroda 1993. 389 s.
- UNDERWOOD, E. J.: Trace Elements in Human and Animal Nutrition. New York, San Francisco, London, Academic Press 1977. 545 s.
- VRZGULA, L. a kol.: Poruchy látkového metabolizmu hospodárskych zvierat a ich prevencia. Bratislava, Príroda 1990. 495 s.
- WATERMAN, D. F. – SWENSON, T. S. – TUCKER, W. B. – HEMKEN, R. W.: Role of magnesium in the dietary cation-anion balance equation for ruminants. *J. Dairy Sci.*, 74, 1991: 1866–1873.

Došlo 21. 7. 1994

Kontaktná adresa:

Doc. MVDr. Jozef B í r e š, DrSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/321 11–15, fax 095/76 76 76

OCCURRENCE OF LEVAMISOLE- AND TETRAMISOLE-RESISTANT GASTROINTESTINAL (GI) NEMATODES IN SHEEP

NÁLEZ GASTROINTESTINÁLNYCH NEMATÓDOV U OVIEC REZISTENTNÝCH K LEVAMIZOLU A TETRAMIZOLU*

J. Praslička¹, P. Pilko², M. Várady¹, J. Čorba¹

¹*Institute of Parasitology, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic*

²*District Veterinary Administration, Trenčín, Slovak Republic*

ABSTRACT: Two experiments were carried out with sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes to evaluate efficacy of anthelmintics using *in vivo* faecal egg count reduction (FECR) test. In experiment 1 with 28 ewes, the following efficacy of anthelmintics given at recommended dose rates was observed: albendazole 99.4%, ivermectin 99.3% and levamisole 81.8%. In experiment 2 with 18 ewes, tetramisole exhibited 71.3 % efficacy. Suspected resistance to imidothiazole anthelmintics was confirmed by *in vitro* larval development test (LDT) – minimal inhibition concentration (MIC) values were estimated at 2.0 µg/ml. Infective larvae L3 cultivated from eggs produced by the population of resistant helminths were identified as *Ostertagia* and *Trichostrongylus* spp.

sheep; efficacy of anthelmintics; anthelmintic resistance; FECR test; LDT; levamisole; tetramisole; gastrointestinal nematodes

ABSTRAKT: V dvoch experimentoch u bahníc prirodzene infikovaných gastrointestinálnymi nematódmi sme *in vivo* testom redukcie počtu vajčiek vo faeces (FECR test) skúmali účinnosť vybraných antihelmintík. V prvom experimente na 28 zvieratách sme po aplikácii doporučených dávok zistili túto efektívnosť: albendazol 99,4 %, ivermektín 99,3 % a levamizol 81,8 %. V druhom experimente na 18 bahniaciach sme zistili len 71,3% účinnosť tetramizolu. Suspektnú rezistenciu gastrointestinálnych nematódov k imidotiazolovým antihelmintikám sme potvrdili aj *in vitro* testom vývinu lariev (LD test), keď hodnoty minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) boli až 2,0 µg/ml. Infekčné larvy získané z vajčiek rezistentnej populácie helmintov boli identifikované ako *Ostertagia* spp. a *Trichostrongylus* spp.

ovce; účinnosť antihelmintík; rezistencia voči antihelmintikám; FECR test; LDT; levamizol; tetramizol; gastrointestinálne nematódy

ÚVOD

Rezistencia voči antihelmintikám je rozšírená na všetkých kontinentoch a je dokumentovaná mnohými autormi. Prehľad správ o jej výskyte v chovoch oviec uvádza Várady (1994). Levamizolová rezistencia bola zistená v Austrálii, na Novom Zélande, v USA, v Juhoafrickej republike a v Keni. V Európe bola potvrdená zatiaľ len v Dánsku.

Vysokú aktuálnosť problematiky gastrointestinálnych nematódov oviec na Slovensku dokumentuje ich 100% prevalencia (Várady a Praslička, 1993). Infekcie vyvolané týmito parazitmi môžu zapríčiniť aj pri subklinických formách, ktoré sú v našich podmienkach najčastejšie, značné straty na úžitkovosti. Dôležitú úlohu preto zohrávajú účinné metódy boja proti týmto parazitózam. Najčastejšie sa používajú širokospektrálne antihelmintiká, najmä benzimidazoly (albendazol,

fenbendazol), imidotiazoly (levamizol, tetramizol), avermektíny a milbemycíny (ivermektín, doramektín a moxidektín).

V poslednom desaťročí bolo uverejnených mnoho správ o výskyte nematódov, ktoré sú voči týmto liečivám rezistentné. Na Slovensku boli zistené benzimidazol-rezistentné nematódy oviec (Praslička a i., 1994a). Táto problematika je aktuálna aj pri kozách, kde sme zistili polyrezistentné nematódy *Ostertagia* spp. (rezistentné voči albendazolu, levamizolu, tetramizolu a ivermektínu) v importovaných stádach (Várady a i., 1993; Várady a i., 1994). Definíciu a príčiny vzniku rezistencie v našej odbornej tlači opísali Veselý a i. (1992) a Praslička a Várady (1993).

V tomto príspevku uvádzame prvý nález gastrointestinálnych nematódov oviec na Slovensku rezistentných k imidotiazolovým antihelmintikám.

* Výsledky boli získané pri riešení vnútorného grantu SAV č. 163/1991–1993 a 2/1363/1994

MATERIÁL A METÓDY

Na zistenie účinnosti antihelmintík sme urobili dva experimenty. V prvom experimente sme použili dvadsaťosem pasúcich sa bahníc plemena zušľachtená valaška vo veku od jedného do dvoch rokov s prirodzenou infekciou gastrointestinálnych nematódov z čeľade *Trichostrongylidae*. Zvieratá boli označené a rozdelené do štyroch pokusných skupín, v ktorých sme vykonali *in vivo* test redukcie počtu vajčiek v truse (Faecal egg count reduction test – FECR test; *Coles a i.*, 1992). Po odbere rektálnych vzoriek fečes boli ovciam prvý deň experimentu aplikované jednotlivé antihelmintiká v doporučených terapeutických dávkach nasledovne: 1. skupina – albendazol (Aldifal susp. 2,5 %, MEVAK a. s., Nitra), 2. skupina – levamizol (Revlin, MEVAK a. s., Nitra), 3. skupina – ivermektín (Ivomec inj., MSD AGVET, USA) a štvrtá, kontrolná skupina ostala neliečená.

Vzorky fečes boli opäť individuálne odobrané 10 dní po podaní liečiv. Na stanovenie EPG (počet vajčiek v 1 g fečes) sme používali citlivú centrifugačno-flotačnú metódu (*Anon y m.*, 1986) v modifikácii podľa *V á r a d y h o* (1993). Na základe porovnania EPG vzoriek z oboch odberov sme potom stanovili účinnosť použitých antihelmintík.

V druhom experimente na 18 ovciach sme vykonali FECR test s tetramizolom (MEVAK a. s., Nitra). V liečenej skupine bolo 10 ks oviec a 8 ks v neliečenej kontrole. Zo vzoriek z prvého dňa experimentu sme získali vajčička a podrobili ich aj dvom *in vitro* testom: testu vývinu lariev (Larval development test – LDT; *Coles a i.*, 1988) s levamizolom a testu liahnutia lariev (Egg hatch assay – EH test; *Coles a i.*, 1992) s tiabendazolom.

Vajčička vylučované nematódmi, ktoré prežili terapiu tetramizolom, sme kultivovali do štádia L3 metódou

podľa *Roberts a O`Sullivan* (1950). Tieto infekčné larvy sme potom identifikovali podľa *Hu-línskej* (1969).

VÝSLEDKY

Výsledky *in vivo* FECR testu na detekciu rezistencie voči antihelmintikám sú uvedené v tab. I.

Po podaní albendazolu sme zistili 99,4% redukciu počtu vajčiek, po podaní levamizolu 81,8% redukciu a v skupine, kde sme ovciam podali ivermektín, bola redukcia počtu vajčiek 99,3%. Uvedené percentuálne hodnoty udávajú zároveň účinnosť liečiv.

Následne sme vykonali FECR test s tetramizolom, u ktorého sme zistili 71,3% účinnosť (tab. II). Súčasne sme vykonali *in vitro* test vývinu lariev, ktorým sme rezistenciu potvrdili. Minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) bola zistená medzi 1,0 a 2,0 µg/ml (hraničná hodnota je 1,0 µg/ml). Dobrá účinnosť benzimidazolového antihelmintika albendazol bola potvrdená *in vitro* testom liahnutia lariev, kde ED₅₀ mala hodnotu 0,04 µg/ml (hraničná hodnota je 0,1 µg/ml).

Identifikáciou infekčných lariev získaných z populácie, ktorá prežila terapiu tetramizolom, sme zistili prítomnosť len *Ostertagia* spp. (62 %) a *Trichostrongylus* spp. (38 %), kým pred terapiou sme zistili larvy rodov *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Haemonchus* a *Chabertia*.

DISKUSIA

Rezistencia helmintov voči antihelmintikám bola donedávna na našom území neznáma. Podobne ako v iných krajinách, aj u nás sa po zavedení širokospektrálnych antihelmintík tieto liečivá stali prakticky jedi-

I. Účinnosť rôznych antihelmintík proti prirodzenej infekcii trichostrongylidmi u oviec – Efficacy of various anthelmintics against natural trichostrongylid infection in sheep

Liečivo ¹	Dávka ² (mg/kg)	Počet zvierat v skupine ³	Priemer EPG ± SD (1. deň) ⁴	Priemer EPG ± SD (10. deň) ⁵	Redukcia počtu vajčiek ⁶ (%)
Albendazol	5,0 p. o.	7	47,7 ± 18,3	0,3 ± 0,7	99,4
Levamizol	7,5 p. o.	7	86,2 ± 61,3	15,7 ± 15,5	81,8
Ivermektín	0,2 s. c.	7	58,2 ± 23,8	0,4 ± 1,1	99,3
Kontrola ⁷	neliečená skupina ⁸	7	40,4 ± 26,1	36,3 ± 22,1	–

¹anthelmintic, ²dose, ³number of animals per group, ⁴mean EPG ± SD (day 1), ⁵mean EPG ± SD (day 10), ⁶reduction in egg number, ⁷control, ⁸untreated group

II. Účinnosť tetramizolu na prirodzenú infekciu trichostrongylidmi u oviec – Efficacy of tetramizole against natural trichostrongylid infection in sheep

Liečivo ¹	Dávka ² (mg/kg)	Počet zvierat v skupine ³	Priemer EPG ± SD (1. deň) ⁴	Priemer EPG ± SD (10. deň) ⁵	Redukcia počtu vajčiek ⁶ (%)
Tetramizol	15,0 p. o.	10	247,2 ± 111,0	71,2 ± 76,7	71,3
Kontrola ⁷	neliečená skupina ⁸	8	266,4 ± 121,9	249,0 ± 115,9	–

¹anthelmintic, ²dose, ³number of animals per group, ⁴mean EPG ± SD (day 1), ⁵mean EPG ± SD (day 10), ⁶reduction in egg number, ⁷control, ⁸untreated group

ným prostriedkom pre boj s helmintózami. Pri bežnom sortimente 2–3 prípravkov, ktoré boli na našom trhu v minulosti k dispozícii, nebolo možné ich systematické obmieňanie. Sústavné používanie napr. benzimidazolových antihelmintík vyústilo do postupného oslabovania ich účinnosti a do vývinu rezistencie u nematódov gastrointestinálneho traktu v niektorých chovoch oviec na Slovensku (Praslička a i., 1994b).

Levamisol (najmä v prípravkoch Helmisan, Nilverm) a tetramizol (v prípravku Revlin) sú imidiazoly-levamisol je L forma a tetramizol je racemickou zmesou D a L formy (Marriner a Bogan, 1986) a pôsobia ako cholinergní agonisti na neuromuskulárnych spojoch (Lewis a i., 1980). Aj podľa mechanizmu účinku patria do tej istej skupiny a existuje medzi nimi fenomén skríženej rezistencie (Coles, 1991 – osobná konzultácia). Levamisol a tetramizol patrili u nás, popri benzimidazolových liečivách, v posledných 20 rokoch k najpoužívanejším antihelmintikám. Výskyt rezistencie voči týmto liečivám v chovoch oviec sa preto dá očakávať. Predpokladáme, že pri rozsiahlejšom prieskume by boli levamisol-rezistentné nematódy zistené aj v ďalších chovoch oviec.

I napriek viacerým nálezom rezistentných nematódov na našom území situácia v ich výskyte a hladinách rezistencie tu zatiaľ nie je taká vážna, ako v niektorých iných krajinách s rozvinutým chovom oviec alebo kôz. Tam si epizootologická situácia vyžaduje vysokú frekvenciu aplikácie liečiv (niekedy aj v dvoj-trojtýždňových intervaloch; Coles, Wolmarans – osobné konzultácie) a rezistencia voči antihelmintiku sa môže vyvinúť už po jednom roku jeho používania (Barton, 1983). Výsledkom je potom vysoká prevalencia rezistentných nematódov. Aktuálne práce dokumentujú ich výskyt napr. v 44 % chovov oviec a v 65 % chovov kôz v juhozápadnom Anglicku a Walese (Hong a Hunt, 1993), alebo v 90 % ovčích fariem v Juhoafrickej republike (Van Wyk a Van Den Merve, 1993). Tiež v Austrálii je prevalencia rezistentných nematódov vysoká: z 1 139 vyšetrených chovov oviec bola zistená rezistencia voči benzimidazolom až v 85 % a voči levamisolu v 28 % chovov, kdežto rezistenciu voči ivermektínu zistili len v troch prípadoch (Rolfe, 1993).

Ťažisko boja proti vzniku rezistencie spočíva v prevencii. Najdôležitejšími opatreniami sú obmedzovanie používania antihelmintík na najnutnejšiu možnú mieru a neustále obmieňanie prípravkov s rôznymi mechanizmami účinku. Ďalšími zásadami sú: podávanie dostatočných dávok liečiv – podľa zásady radšej mierne predávkovať ako poddávkovať; nepoužívanie antihelmintík po expiračnej dobe, ktoré spôsobia nepľnohodnotný účinok liečiva a tým vlastne aj poddávkovanie; vhodné chovateľské a pastevné metódy ako aj opatrenia pri presunoch zvierat (Praslička, 1994).

Dôkaz prítomnosti rezistentných kmeňov nematódov na území Slovenskej republiky zdôrazňuje nevyhnutnosť pravidelného monitorovania výskytu rezisten-

cie. Sledovanie účinnosti antihelmintík by sa malo vykonávať aspoň raz ročne (Praslička, 1993).

LITERATÚRA

- ANONYM: Sensitive Centrifugal Flotation Technique. Manual of Veterinary Parasitological Techniques. Reference Book 418. Ed. by Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. London, HMSO 1986: 13.
- BARTON, N. J.: Development of anthelmintic resistance in nematodes from sheep in Australia subjected to different treatment frequencies. *Int. J. Parasitol.*, 13, 1983: 125–132.
- COLES, G. C. – TRITSCHLER, J. P. – GIORDANO, D. J. – LASTE, N. J. – SCHMIDT, A. L.: A larval development test for detection of anthelmintic resistant nematodes. *Res. Veter. Sci.*, 45, 1988: 50–53.
- COLES, G. C. – BAUER, C. – BORGSTEEDE, F. H. M. – GEERTS, S. – KLEI, T. R. – TAYLOR, M. A. – WALLER, P. J.: W.A.A.V.P. (World Association for Advancement of Veterinary Parasitology) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasit.*, 44, 1992: 35–44.
- HONG, C. – HUNT, K. R.: Nematode resistance to anthelmintics in sheep and goat farms. In: Abstracts of the 14th International Conference of WAAVP, Cambridge, UK, August 8–13, 1993: 70.
- HULÍNSKÁ, I.: Die determinationsmerkmale der invasionlarven bei schafdarmlinthen. Praha, Academia 1969.
- LEWIS, J. – WU, C. – LEVINE, J. – BERG, H.: Levamisole-resistant mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans* appear to lack pharmacological acetylcholine receptors. *Neuroscience*, 5, 1980: 967–989.
- MARRINER, S. – ARMOUR, J.: Nematode infection of domestic animals – Gastrointestinal infections. In: CAMPBELL, W. C. – REW, R. S. (eds.): *Chemotherapy of Parasitic Diseases*. New York, Plenum Press 1986: 287–304.
- PRASLIČKA, J.: Rezistencia gastrointestinálnych nematódov kôz voči antihelmintikám a možnosti jej tlmenia. [Kandidátska dizertácia.] Košice 1993. – Parazitologický ústav SAV.
- PRASLIČKA, J.: Širokospektrálne antihelmintiká pre malé prežúvavce: ako ich správne používať. *Slov. Vet. Čas.*, 19, 1994: 32–35.
- PRASLIČKA, J. – VÁRADY, M.: Rezistencia gastrointestinálnych nematódov oviec a kôz voči antihelmintikám. *Náš Chov (Praha)*, 53, 1993: 31.
- PRASLIČKA, J. – VÁRADY, M. – ČORBA, J.: Výskyt rezistentných nematódov v chovoch oviec a kôz na Slovensku. *Slov. Vet. Čas.*, 19, 1994a: 115–119.
- PRASLIČKA, J. – VÁRADY, M. – ČORBA, J. – VESELÝ, L.: A survey of anthelmintic resistance in sheep in Slovakia. *Vet. Parasitol.*, 52, 1994b: 169–171.
- ROBERTS, F. H. S. – O'SULLIVAN, P. J.: Methods for egg counts and larval cultures for Strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Austral. J. Agric. Res.*, 1, 1950: 99–102.
- ROLFE, P.: Anthelmintic resistance in Australia. In: Abstracts of the 14th International Conference of WAAVP, Cambridge, UK, August 8–13, 1993: 372.

- VAN WYK, J. A. – VAN DEN MERVE, J. S.: Anthelmintic resistance in South Africa: an update. In: Abstracts of the 14th International Conference of WAAVP, Cambridge, UK, August 8–13, 1993: 371.
- VÁRADY, M.: Porovnanie dvoch metód na počítanie vajčiek nematódov u oviec. *Veterinářství*, 43, 1993: 342–343.
- VÁRADY, M.: Rezistencia gastrointestinálních nematódov oviec a metódy jej detekcie. [Kandidátska dizertácia.] Košice 1994. – Parazitologický ústav SAV.
- VÁRADY, M. – PRASLIČKA, J.: Výskyt a druhové zastúpenie gastrointestinálních nematódov v chovoch oviec na Slovensku. *Veterinářství*, 43, 1993: 142–143.
- VÁRADY, M. – PRASLIČKA, J. – ČORBA, J.: Treatment of multiple resistant field strain of *Ostertagia* spp. in Cashmere and Angora goats. *Int. J. Parasit.*, 24, 1994: 335–340.
- VÁRADY, M. – PRASLIČKA, J. – ČORBA, J. – VESELÝ, L.: Multiple anthelmintic resistance of nematodes in imported goats. *Vet. Rec.*, 132, 1993: 387–388.
- VESELÝ, L. – PRASLIČKA, J. – VÁRADY, M. – ČORBA, J.: Rezistencia nematódov voči anthelmintikám. *Veterinářství*, 42, 1992: 54–55.

Došlo 17. 3. 1994

Kontaktná adresa:

MVDr. Ján P r a s l i č k a, CSc., Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/633 44 55, fax 095/633 14 14

THE EFFECT OF THE BENTAZONE HERBICIDE ON HEMATOLOGICAL PARAMETERS IN SHEEP IN THE CONDITIONS OF ACUTE AND SUBCHRONIC INTOXICATION

VPLYV HERBICÍDU BENTAZÓN TP NA HEMATOLOGICKÉ UKAZOVATELE U OVIEC V PODMIENKACH AKÚTNEJ A SUBCHRONICKEJ INTOXIKÁCIE

J. Šály, P. Kačmár, J. Neuschl, J. Jantošovič

University Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: Hematological changes at poisoning with the bentazone herbicide manufactured by the Research Institute of Chemical Technology in Bratislava were investigated in sheep of the Slovak Merino breed. Acute intoxication in seven head of sheep was induced by a single application of bentazone with cannula at a sublethal dose of 1,450 mg/kg live weight. Bentazone was diluted with sunflower oil at a ratio 1 : 5. Subchronic intoxication was induced by an administration of bentazone in feed to the sheep for 84 days: a dose of 175 mg/kg live weight (1/10 of LD₅₀) for the first experimental group (six head), and a dose of 97.5 mg/kg live weight (1/12 of LD₅₀) for the second experimental group (six head). The control group did not receive any dietary bentazone. Acute intoxication with herbicide did not cause any statistically significant changes in hemoglobin, erythrocyte and leucocyte counts in the sheep within 120 hours after application. In comparison with the physiological standard, a slight increase in the percentage of neutrophils and a decrease in the lymphocyte percentage were observed. The values of eosinophils, basophils and monocytes remained unchanged. Observation of subchronic intoxication did not reveal any significant negative effect of the two doses of the herbicide within 84 days on the hematological parameters. Our experiments demonstrate that bentazone does not negatively influence blood formation.

sheep; bentazone herbicide; hematological changes

ABSTRAKT: Sledovali sme hematologické zmeny pri akútnej a subchronickej otrave oviec herbicídrom bentazón, ktorého výrobcom je Výskumný ústav chemickej technológie v Bratislave. Pri štúdiu akútnej intoxikácie bol bentazón podaný ovciam jednorázovo sondou v subletálnej dávke 1 450 mg/kg živej hmotnosti. V obsahu hemoglobínu, v počte erytrocytov, leukocytov, ako aj v percentuálnom zastúpení jednotlivých druhov leukocytov neboli zistené štatisticky preukazné zmeny do 120 hodín od aplikácie tohto herbicídu. V porovnaní s fyziologickou normou sme zistili mierne zvýšenie percentuálneho zastúpenia neutrofilov a zníženie podielu lymfocytov. Hodnoty eozinofilov, bazofilov a monocytov neboli zmenené. Keď bol ovciam podávaný herbicíd v krmive v dávke 175 mg a 97,5 mg/kg živej hmotnosti nezaznamenali sme počas 84 dní jeho negatívny vplyv na hematologické ukazovatele. Dosiahnuté výsledky poukazujú, že bentazón nemá negatívny vplyv na krvotvorbu.

ovce; herbicíd bentazón; hematologické zmeny

ÚVOD

Problematika možných negatívnych účinkov novozavádzaných pesticídov u hospodárskych a voľne žijúcich zvierat nastoľuje požiadavku získať čo najkomplexnejšie poznatky o miere ich toxikologického rizika. Pre objektivizáciu ich negatívnych biologických účinkov je nevyhnutné sledovať aj hematologické parametre.

Krv ako dôležitý článok humorálnej regulácie poskytuje dobré možnosti sledovania toxického pôsobenia rôznych chemických látok na organizmus zvierat. Tieto môžu nepriaznivo pôsobiť na krvotvorné orgány, samotnú krv alebo môžu ovplyvniť biochemizmus tvor-

by krvi (Ch i a i., 1977). Na toxické pôsobenie sú zvlášť citlivé erytrocyty (J a n t o š o v i č, 1971). Zníženie počtu leukocytov môže mať nepriaznivý vplyv na obrannú schopnosť organizmu (D o r n, 1964). Pri niektorých intoxikáciách dochádza k zmenám neutrofilných granulocytov (S l a n i n a a i., 1985). Hemopoetický systém má tiež dôležitú úlohu pri adaptácii organizmu na rôzne záťaž (C h y l a a i., 1975).

Z hľadiska chemickej štruktúry patrí bentazón do širokej skupiny heterocyklických zlúčenín – k diazínom. Ide o 3-izopropyl-1 hydro-2, 1,3 benztiadiazín-4-on-2, 2-dioxid s mernou hmotnosťou 240,3.

Prakticky je nerozpustný vo vode, dobre rozpustný v organických rozpúšťadlách a v rastlinných olejoch

(Sedokur, 1986). Používa sa ako kontaktný selektívny herbicíd. Má účinok proti širokému okruhu burín – vo fazuli, sóje, hrachu, kukurici, zemiakoch, obilí a ryži (Jowers a i., 1985). Toxický účinok bentazónu na rastliny sa prejavuje cestou inhibície fotosyntézy (Corbert, 1984).

Bentazón domácej proveniencie (Bentazón TP) sa líši od bentazónu vyrábaného v zahraničí (Nemecko) tým, že je syntetizovaný z iných východných látok, a preto môže obsahovať iné vedľajšie produkty syntézy. Z hľadiska miery akútnej toxicity bola pozorovaná určitá druhová závislosť citlivosti zvierat na bentazón (Neuschl a Kačmar, 1992).

Z dostupných prameňov toxikologických štúdií herbicídu bentazón domácej proveniencie (Bentazón TP) chýbajú údaje o hematologických zmenách. Doterajšie práce o toxickom pôsobení tohto herbicídu boli zamerané na získanie klinickej symptomatológie pri akútnej orálnej toxicite u laboratórnych zvierat (Sedokur, 1986; Melnikov a i., 1980), oviec (Neuschl a Kačmar, 1992), králikov a bažantov (Neuschl a Kačmar, 1993). Klinické zmeny pri chronickej otrave Bentazónom TP popísali Neuschl a i. (1992). Vzhľadom na uvedené sme sledovali aj subchronickú intoxikáciu oviec herbicídom Bentazón TP so zameraním na hematologické ukazovatele, ktoré sú dôležité pre komplexnú toxikologickú testáciu.

MATERIÁL A METÓDY

AKÚTNA INTOXIKÁCIA

Pozorovania sme robili na siedmich jarkách plemena slovenské merino o hmotnosti 26–29 kg. Ovce boli počas pokusu kŕmené zbilancovanou kŕmnom dávkou (ČSN 46 7070), ktorá obsahovala 1 kg sena lúčneho a melasové krmivo M v dávke 10 g/kg hmotnosti. Ovce mali vodu k dispozícii *ad libitum*.

Bentazón TP bol dodaný jeho výrobcom (Výskumný ústav chemickej technológie, Bratislava) a podával sa ovciam jednorázovo v subletálnej dávke 1 450 mg/kg živej hmotnosti, a to sondou rozpustený v slnečnicovom oleji v pomere 1 : 5. Krv bola na hematologické vyšetrenie odobieraná z *vena jugularis* pred podaním bentazónu a 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96 a 120 hodín po jeho aplikácii.

SUBCHRONICKÁ INTOXIKÁCIA

V pokuse sme použili jarky plemena slovenské merino s hmotnosťou 32,8–44,5 kg vo veku 14–15 mesiacov. Zvierata boli rozdelené do troch skupín.

Prvá pokusná skupina pozostávala z troch škopov a z troch bahnic. Bentazón TP bol ovciam pridávaný do melasového krmiva M po jeho predchádzajúcom rozpustení v rastlinnom oleji a to denne v dávke 195 mg/kg živej hmotnosti, t. j. 1/10 z LD₅₀. V druhej

pokusnej skupine boli tri bahnice a tri škopy. Bentazón dostávali ovce denne s melasovým kŕmivom v dávke 97,5 mg/kg živej hmotnosti, t. j. 1/20 z LD₅₀. Tretia skupina bola kontrolná a boli v nej dva škopy a tri bahnice.

Všetky tri skupiny oviec boli kŕmené: 1 kg lúčneho sena, 0,46 kg melasového krmiva M obsahujúceho melasu, mačkaný ovos, pšeničnú múku, rôzne otruby a minerálnu kŕmnu prísadu. Po šiestich týždňoch pokusu bola dávka sena zvýšená na 1,5 kg. K vode mali zvieratá neobmedzený prístup. Melasové krmivo, do ktorého bol pokusným zvieratám prímiešaný bentazón, bolo podávané vždy v ranných hodinách.

Zvieratá boli ustajnené v individuálnych kotercoch a pred pokusom boli vyšetrené klinicky a koprologicky. S podávaním bentazónu sa začalo po 12-dňovej adaptácii zvierat.

Krv bola ovciam odobieraná z *vena jugularis*, a to pred podaním bentazónu a v priebehu jeho podávania na 14., 28., 42., 56., 70. a 84. deň.

V oboch pokusoch sme použili hematologické metódy ako ich uvádza Slanina a i. (1985). Výsledky boli štatisticky vyhodnotené Studentovým *t*-testom.

VÝSLEDKY

AKÚTNA INTOXIKÁCIA

V obsahu hemoglobínu nedošlo v podmienkach akútnej intoxikácie k preukazným zmenám. Jeho hodnoty sa pohybovali vo fyziologických hraniciach v rozpätí od 127,2 g/l (12 hodín po aplikácii) do 100,8 g/l (72 hodín po podaní).

Zhodný priebeh bol zistený aj v počte erytrocytov. Najvyšší počet erytrocytov sme zistili po 12. hodine (12,5 T/l) a najnižší po 72. hodine (7,9 T/l) od začiatku aplikácie bentazónu. Vo všetkých sledovaných časových intervaloch sa počet červených krviniek pohyboval vo fyziologických hraniciach a neboli významné zmeny medzi jednotlivými vyšetreniami.

Počet leukocytov pred podaním bentazónu bol 8,4 G/l. Na šiestu hodinu po jeho aplikácii ich počet stúpol na 11,2 G/l a v ďalších časových intervaloch došlo k miernemu poklesu na 6,6 G/l po 120. hodine po aplikácii bentazónu. Zmeny však neboli významné a hodnoty vo všetkých časových intervaloch boli v norme.

Pri vyšetrení diferenciálneho krvného obrazu sme zistili po podaní bentazónu v porovnaní s fyziologickou normou zvýšenie neutrofilov po šiestich hodinách od aplikácie (61 %), 24 hodinách (62 %), 36 hodinách (59 %), 48 hodinách (60 %) a 72 hodinách (73 %). Aj v ostatných časových intervaloch sa ich hodnoty pohybovali na hornej hranici fyziologickej normy. Percentuálne zastúpenie lymfocytov bolo pod spodnou hranicou na šiestu hodinu po aplikácii (36 %), 24. hodinu (35 %), 36.–48. hodinu (36 %) a na 72. hodinu (26 %).

Hodnoty eozinofilov, bazofilov a monocytov boli vo všetkých časových intervaloch vo fyziologických hraniciach.

SUBCHRONICKÁ INTOXIKÁCIA

Priemerný obsah hemoglobínu pred pokusom sa u kontrolnej skupiny (96,9 g/l) a druhej pokusnej skupiny (100,8 g/l) pohyboval pri dolnej fyziologickej hranici. U prvej pokusnej skupiny oviec bol obsah hemoglobínu 116,2 g/l. V prvom týždni pokusu poklesol obsah hemoglobínu u všetkých troch skupín oviec pod fyziologickú normu. Pokles pokračoval až do ukončenia pokusu. Rozdiely medzi pokusnými skupinami a kontrolnou skupinou oviec neboli štatisticky významné ani v jednom časovom intervale.

Počet erytrocytov sa u kontrolnej a prvej pokusnej skupiny pohyboval v priebehu celého pokusu v rozpätí fyziologických hodnôt. V druhej pokusnej skupine sme zaznamenali zníženie počtu erytrocytov pod fyziologickú hranicu na 56. deň (7,75 T/l) a na 84. deň (7,11 T/l). Rozdiely v počte erytrocytov medzi kontrolnou a pokusnými skupinami však neboli štatisticky významné.

Počet bielych krviniek sa u kontrolnej a oboch pokusných skupín pohyboval vo všetkých prípadoch v širšom rozpätí fyziologických hraniciach a neboli zistené štatisticky významné rozdiely medzi jednotlivými skupinami oviec. Takisto neboli zistené preukazné rozdiely v percentuálnom zastúpení jednotlivých druhov bielych krviniek (neutrofily, lymfocyty, monocyty, eozinofily, bazofily) medzi kontrolnou a pokusnými skupinami zvierat.

DISKUSIA

O hematologických zmenách pri rôznych intoxikáciách referujú mnohí autori (Dorn, 1964; Fried a Jantošovič, 1968; Jantošovič, 1971; Lanza a i., 1980 a inf). Z uvedených štúdií vyplýva, že pri otravách dochádza najčastejšie k poklesu v počte erytrocytov, obsahu hemoglobínu, k leukopenii, trombopenii, eozonofílii, a to v závislosti od koncentrácie sledovaných toxických látok.

Naše výsledky v hematologických štúdiách akútnej intoxikácie herbicídmi bentazón nemôžeme porovnať s výsledkami iných autorov, nakoľko nebol ešte v tomto smere overovaný na hospodárskych zvieratách. Výsledky štúdie po 90 dňovej aplikácii bentazónu v dávke 101 mg/kg u potkanov (Inczinger, 1987) sú zhodné s našimi zisteniami.

Aj keď sa pri štúdiu subchronickej toxicity pohyboval obsah hemoglobínu pri niektorých vyšetreniach pod dolnou hranicou fyziologickej normy, nebol tento pokles spôsobený týmto herbicídmi, nakoľko zmeny boli zistené aj u kontrolnej skupiny oviec. Podobnú dynamiku zmien sme zaznamenali aj v počte červených krviniek.

Výsledky klinických a biochemických štúdií intoxikácie u oviec, králikov a bažantov (Kačmár a i., 1988; Neuschl a Kačmár, 1992, 1993) preukázali, že bentazón má nízku orálnu toxicitu. Aj naše výsledky hematologických parametrov u oviec, ktoré sme získali v podmienkach akútnej a subchronickej intoxikácie potvrdzujú, že sledovaný bentazón sa javí ako bezpečný herbicíd.

LITERATÚRA

- CORBERT, J. R. – WRIGHT, K. – BAILLIE, A. C.: The Biochemical Mode of Action of Pesticides. London, Acad. Pres. Inc., Ltd. 1984: 63–80.
- DORN, P.: Sulfonamide und Hämorrhagisches Syndrom beim Huhn. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 77, 1964: 442–445.
- FRIED, K. – JANTOŠOVIČ, J.: Krvný obraz pri hemoragickom syndróme kurčiat. Poľnohospodárstvo, 14, 1968: 946–953.
- CHI, M. S. – MIROCHA, C. J. – KURTZ, H. J.: Acute toxicity of T-2 toxin in broiler chicks and laying hens. Poultry Sci., 56, 1977: 103–116.
- CHYLA, M. – VRZGULA, L. – MIKLUŠIČÁK, R. – SKALKA, J.: Hematologické štúdium u mladých oviec v priebehu dvoch rokov. Folia Vet., 19, 1975: 379–391.
- INCZINGER, F.: 13-týždňová chemická perorálna toxicita Bentazónu u potkanov kmeňa Wistar. [Záverčná správa.] Bratislava, Farmaceutická fakulta UK, Katedra farmakodynamiky a toxikológie 1987.
- JANTOŠOVIČ, J.: Štúdium niektorých ukazovateľov krvi u zdravej hydiny a pri niektorých chorobách z hľadiska diagnostiky. [Habilitačná práca.] Košice 1971. – Vysoká škola veterinárska.
- JOWERS, M. E. – BRAMAN, J. W. – PLETCHER, J. W.: Effect of several herbicide treatments on wild pousettia (*Euphorbia heterophylla*, L.) control in soybean. Soil and Science Society of Florida. Proceedings, 45, 1985: 115–117.
- KAČMÁR, P. – NEUSCHL, J. – VRZGULA, L. – KONRÁD, V. – JANTOŠOVIČ, J. – MIKULA, J. – ORIŇÁK, A. – BALÁŽ, J. – SITKO, M.: Toxikologická testácia pesticídov bentazónu u oviec v podmienkach subchronickej intoxikácie. [Záverčná správa.] Košice, Vysoká škola veterinárska 1988.
- LANZA, G. M. – WASHBURU, K. W. – WYATT, R. D.: Strain variation in haematological response of broilers to dietary aflatoxin. Poultry Sci., 59, 1980: 2866–2891.
- MELNIKOV, N. N. – NOVOŽILOV, K. V. – PYLOVA, T. N.: Chimičeskije sredstva zaščity rostenij. Spravočnik. Moskva, Izd. Chimija 1980. 30 s.
- NEUSCHL, J. – KAČMÁR, P.: Akútna orálna toxicita čsl. vývojového herbicídu bentazónu u oviec a klinická symptomatológia otravy. Veterinářství, 42, 1992: 215–216.
- NEUSCHL, J. – KAČMÁR, P.: Akútna toxicita československého vývojového herbicídu bentazónu u bažantov a králikov a klinická symptomatológia otravy. Vet. Med. – Czech., 38, 1993: 115–121.
- NEUSCHL, J. – KAČMÁR, P. – LEGATH, J. – TOMÁŠ, J.: Vplyv československého vývojového herbicídu bentazónu na

niektoré ukazovatele zdravotného stavu oviec v podmienkach subchronickej intoxikácie. Veter. Med. (Praha), 37, 1992: 161–167.

SEDOKUR, L. K.: Spravočník po pesticidam. Kijev, Izd. Urožaj 1986. 218 s.

SLANINA, L. – BARTKO, P. – ČANECKÝ, P. – FRIED, K. – HANÁK, J. – KOČÍ, J.: Klinická diagnostika vnútorných chorôb hospodárskych zvierat. Bratislava, Príroda 1985.

Došlo 18. 4. 1994

Kontaktná adresa:

Doc. MVDr. Ján Šálý, CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/321 11–15, fax 095/76 76 75

QUANTIFICATION OF RESIDUAL VIRULENCE OF THE VNUKOVO-32/107 RABIES VIRUS VACCINATION STRAIN

KVANTIFIKÁCIA ZBYTKOVEJ VIRULENCIE VAKCINAČNÉHO KMEŇA VÍRUSU BESNOTY VNUKOVO-32/107

Š. Švrček¹, R. Ondrejka¹, Z. Beníšek¹, O. J. Vrtiak¹, M. A. Selimov², J. Zavadová¹, A. Ďurove¹, J. Süliová¹, M. Maďar¹

¹*Rabiological Laboratory of the University of Veterinary Medicine and the Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic*

²*WHO Reference Centre for Rabies, Moscow, Russia*

ABSTRACT: The present work summarizes the results of 11 groups of experiments carried out with the aim to complexly quantify the residual virulence of a cold mutant of the Vnukovo-32/107 rabies virus vaccination strain intended for the preparation of an oral rabies vaccine (Kamark) for the immunization of free-living carnivores. According to WHO prescriptions, residual virulence was quantified in experiments on carnivores, mainly red foxes (*Vulpes vulpes*) – the presumed target species, and farm-bred polar foxes (*Alopex lagopus*) – a related species. Further experiments were carried out in cats, dogs, non-target autochthonous micromammals, predatory birds (*Microtus arvalis*, *Apodemus flavicollis*, *Falco tinnunculus*) and in a large number of laboratory animals – white mice. At oral administration (including extremely high doses) the strain Vnukovo-32/107 proved to be apathogenic to the target carnivores – *Vulpes vulpes* and *Alopex lagopus* as well as cats, dogs and the autochthonous micromammals. For *Falco tinnunculus* the strain proved to be apathogenic even at intramuscular and intracerebral administration. The residual virulence of the Vnukovo-32/107 vaccination strain, also quantified by comprehensive model experiments on white mice of different weight categories that had been infected orally, subcutaneously, intramuscularly, intracerebrally, by contact, with ingestion of rabid material or by modelled immune suppression, proved to be extremely low-levelled. The strain under investigation revealed a high level of attenuation and a low level of residual virulence and proved to be suitable for the preparation of non-reactogenic oral vaccine intended for foxes, an extremely susceptible target species.

rabies; immune prophylaxis of rabies; oral rabies vaccine; vaccine reactogenicity; Vnukovo-32/107 vaccination strain; residual virulence; target and non-target animal species

ABSTRAKT: V práci sú sumarizované výsledky súboru 11 skupín rozsiahlych pokusov zameraných na komplexnú kvantifikáciu zbytkovej virulencie chladového mutantu vakcinačného kmeňa vírusu besnoty Vnukovo-32/107 určeného *o. i.* pre prípravu živej orálnej vakcíny Kamark pre imunizáciu voľne žijúcich karnivorov. Podľa doporučení WHO zbytková virulencia vakcinačného kmeňa bola kvantifikovaná predovšetkým v pokusoch vykonaných na karnivoroch: zvlášť predpokladanom cieľovom druhu – líškach obyčajných (*Vulpes vulpes*) a tiež príbuznom druhu – farmových líškach polárnych (*Alopex lagopus*). Ďalšie pokusy boli vykonané tiež na mačkách a psoch domácich. Pokusy na necieľových druhoch autochtónnych mikromamalií a pernatých dravcov boli vykonané v obmedzenom rozsahu; na ryšavke žltohrdlej (*Apodemus flavicollis*), hrabošovi poľnom (*Microtus arvalis*) a sokoloch myšiakoch (*Falco tinnunculus*). Časť pokusov bola vykonaná ako modelové na veľkom počte laboratórnych zvierat – bielych myšiach. Testovaný kmeň pri orálnej aplikácii (vrátane extrémne vysokých dávok) je pre cieľové karnivory – líšky obyčajné, tiež líšky polárne, mačky domáce, psy domáce a do pokusov zahrnutých dvoch druhov autochtónnych hlodavcov apatogénny. Pre sokoly myšiaky je apatogénny aj pri intramuskulárnej a intracerebrálnej aplikácii. Zbytková virulencia vakcinačného kmeňa Vnukovo-32/107 – kvantifikovaná tiež v rozsiahlych porovnávacích modelových pokusoch na bielych myšiach rôznych hmotnostných kategórií, infikovaných orálne, subkutánne, intramuskulárne a intracerebrálne, tiež kontaktom a ingesciou rabického materiálu, modelovaním imunosupresie, je mimoriadne nízka. Z výsledkov pokusov vyplýva vysoký stupeň atenuácie, resp. nízka zbytková virulencia vakcinačného kmeňa Vnukovo-32/107, jeho vhodnosť pre prípravu areaktogénnej orálnej vakcíny určenej pre extrémne vnímavý cieľový druh zvierat – líšky obyčajné.

besnota; imunoprofylaxia besnoty; orálna antirabická vakcína; reaktogenita vakcíny; vakcinačný kmeň Vnukovo-32/107; zbytková virulencia; cieľové a necieľové druhy zvierat

INTRODUCTION

Selection of a suitable vaccination strain presents one of the most important problems in the development of vaccination baits used in the oral rabies immunization of free-living carnivores (under European conditions mainly red foxes). Since so far only live oral vaccines have been supposed to be used, it is important that vaccination strains are not only highly immunogenic but also highly attenuated. That means that their residual virulence for target and non-target animals is low and quantitatively defined. Details were summarized and explained by W a n d e l e r (1991).

On the basis of comparative studies the 107th serial cell passage of the strain Vnukovo-32 was selected for the development of vaccination baits for oral rabies immunization of free-living foxes (Š v r ě k e t a l . , 1980b, 1982). Details of the results achieved in the development of vaccination baits are summarized in our recent publications (Š v r ě k e t a l . , 1993, 1994).

There are two variants of the Vnukovo vaccination strain – 32 and 37 (N i k i t i n a and S e l i m o v , 1969). Since according to the results of our experiments variant 32 of the strain seems to be more suitable for the aims of oral immunization (Š v r ě k e t a l . , 1980b, 1982), it will be given a more detailed description. A survey of other vaccination strains – variants of SAD-strain, recently used for oral rabies vaccines is also included.

The Street Alabama Dufferin (SAD) strain was isolated from a rabid dog in Alabama in 1935 (F e n j e , 1960) and originally designated Street Alabama (SA); the label Dufferin was added after the strain had been stored in the Connaught Laboratories. This strain passed 130 serial intracerebral mice passages before F e n j e (1960) adapted it to culturing on cell cultures using the method of 25 interchanging passages on primary kidney cell culture of Syrian hamsters (PKCCSH) and mice brain.

Later variants were derived from the SAD strain that were suitable for the preparation of oral vaccines, namely, SAD Bern, SAD-B19, ERA, Vnukovo-32.

The standard SAD strain (also designed SAD Bern or SAD Swiss) had been originally obtained from the USA and successfully used for oral rabies vaccination of red foxes in Switzerland (S t e c k e t a l . , 1982). This strain has been used for preparation of oral rabies vaccines by Bioveta Ivanovice in the Czech Republic since 1992 (D e d e k e t a l . , 1993).

The variant SAD-B19 was derived from the original SAD strain in Germany (Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen) and it was subjected to serial passage on one of the variants of the BHK-21 cell line. It was largely used for the preparation of an oral rabies vaccine that had also been distributed outside Germany (S c h n e i d e r , 1985; S c h n e i d e r e t a l . , 1988; M a t o u c h e t a l . , 1988; M a t o u c h and J a r o š , 1992; M o e s á r i and K e r e k e s , 1992; S t ö h r and M e s l i n , 1993;

V r z a l e t a l . , 1993; M o e s á r i e t a l . , 1994; S t ö h r , 1994).

In the former German Democratic Republic, the SAD/Potsdam 5/88 strain was used to prepare baits for oral rabies immunization of free-living foxes; this strain was derived from the SAD-Bern by adaptation to culturing on the BHK-21/Potsdam clone 5 cell line (S i n n e c k e r e t a l . , 1990).

In model experiments the above-mentioned SAD variants were tested for residual virulence – pathogenicity in conventional laboratory animals (white mice, white rats), in free-living European micromammals (*Apodemus sylvaticus*, *Clethrionomys glareolus*, *Ondatra zibethicus*, *Microtus arvalis*) and in *Sigmodon hispidus* in the USA. These data about experiments carried out in several radiologic laboratories were published by A r t o i s e t a l . (1992). The above-mentioned vaccination strains (or their variants) comply with the respective WHO criteria (1989).

The strain Vnukovo-32 [a detailed description how the variant was obtained and of its biological properties is given in the studies published by prof. M. A. S e l i m o v , the head of the team (N i k i t i n a and S e l i m o v , 1969; S e l i m o v , 1978, 1985, 1987)] was originally derived from the above-mentioned SAD strain (F e n j e , 1961). In the first period 10 interchanging passages were carried out at 37 °C; later only serial passage on PKCCSH was employed at different temperatures.

After 15 serial passages at 26–28 °C the strain obtained $rect_{40}$ minus marker; it, however, slightly interfered with other strains, proved to be rather thermolabile and lost its immunogenic activity (N i k i t i n o v a and S e l i m o v , 1969). Thus further work aiming at preparation of a highly attenuated vaccination strain with good immunogenic activity made use of other heat regimes at serial passaging – 37 and 32 °C. The obtained variants were later correspondingly designated Vnukovo-37 and Vnukovo-32, and labelled with the respective number of serial passages.

The degree of attenuation, in addition to others determined by the $rect_{40}$ plus, or plus-minus, or minus ($rect_{40+}$, $rect_{40\pm}$, $rect_{40-}$) marker was changed by the number of passages at the given temperature. For instance, the Vnukovo-32-35 variant (25 passages in PKCCSH at 32 °C) had an $rect_{40\pm}$ marker whereas the Vnukovo-32/62 an $rect_{40-}$ marker. For comparison, the Vnukovo-37/83, ERA, Pasteur and CVS-11 had an $rect_{40+}$ marker.

It has been unambiguously proved that the $rect_{40-}$ marker correlates with the degree of virulence. For instance the original SAD strain had pathogenic effects on Syrian hamsters at both subcutaneous and intramuscular administration; Vnukovo-32/63 retained its pathogenicity at intramuscular application and the Vnukovo-32/107 was apathogenic with both methods of extraneural administration.

In further experiments SAD, Vnukovo-37/91, ERA, Pasteur and CVS-11 proved to be pathogenic when administered to mice weighing 11–12 grams subcutane-

ously, intraperitoneally and intramuscularly whereas Vnukovo-32/91 had pathogenic effects only in part of the intramuscularly infected animals, and Vnukovo-32/107 was apathogenic even at intramuscular application.

During passage at decreased temperatures, depending on the species, weight and age of the animals the Vnukovo strain also loses its pathogenicity at intracerebral administration. Details are presented in the comprehensive publications cited (Nikitina and Selimov, 1969; Selimov, 1978, 1985, 1987).

For the purposes of differentiation between street and vaccination strains of rabies virus at first (as an unseparable part of control examinations in zones of oral rabies vaccination) monoclonal antinucleoprotein antibodies are used. According to Selimov (1987) the MCA 187-5.10 monoclonal antibodies do not react with the SAD, SAD-B19, ERA and Vnukovo-32 vaccination strains but they react with the street strains. For the purposes of control the MCA 239-17.3 monoclonal antibodies are suggested that react with all street strains and the above-mentioned vaccination strains.

Strain-specific monoclonal antibodies have been recently prepared for detail antigen structure determination of strain Vnukovo-32; against the nucleocapsid complex (Gribenča et al., 1991) and against the glycoprotein antigen (Mačiková et al., 1992). There was defined a genome, and/or there was estimated a sequence of glycoprotein gene of virus Vnukovo-32 and deduced a protein sequence. This one was analysed and compared with further vaccination and street strains of rabies virus (Fodor et al., 1994). These new, especially actual knowledge and methodic assays allowed the exact characterization of vaccination strain Vnukovo-32 at molecular level.

In this publication a part of our experiments is summarized, which, according to the WHO recommendations concerning the strains suitable for live oral vaccine production (WHO 1989, 1992), are focused on characterization of the strain Vnukovo-32/107. Further results are reported in other publications of ours cited herein.

MATERIAL AND METHODS

EXPERIMENTAL ANIMALS

In the experiments mainly carnivores – the target animal species – common fox (*Vulpes vulpes*) and related farm-bred polar fox (*Alopex lagopus*) were used. According to the WHO recommendations domestic cat (*Felis silvestris lybica* v. *domestica*), domestic dog (*Canis familiaris*) and predatory birds – Euroasian kestrels (*Falco tinnunculus*) were also included. In our work, model experiments on laboratory animals (white mice) were carried out. Experiments on non-target species

(autochthonal micromammals) were carried out only to a limited extent and involved yellow-necked mouse – *Apodemus flavicollis* (*Muridae*) and common vole – *Microtus arvalis* (*Microtidae*).

VIRUSES USED

In the experiments the vaccination strain Vnukovo-32 was used on the level of the 107th serial cell passage. The virus was cultured on the BHK-21 cell line. Preliminary virus titration was carried out *in vivo* by intracerebral inoculation test (MIT) on white SPF mice weighing 6.0 g (Koprowski, 1973) and *in vitro*, by rapid tissue culture inoculation test (RTCIT) on cell line BHK-21 (Rudd and Trimarchi, 1987; Závadová et al., 1993). The virus suspensions at a suitable titre were stored at -70°C until utilization in the experiments, control titrations were done.

For comparison, further strains of the rabies virus were used: The reference strain CVS, multiplied by intracerebral inoculation of white mice or guinea-pigs. Autochthonal street strains were also used, namely LB-1 (isolated from *gl. submandibularis* of a common fox), and also PKM-77, K-81, P-1975 (isolated from brain and *gl. submandibularis* of non-vaccinated dogs). These strains were multiplied in the same way as the CVS strain. Titration (only by the intracerebral inoculation test) and storage were analogous to those of the strain Vnukovo-32/107.

INFECTION (IMMUNIZATION) AND OBSERVATION OF ANIMALS

Infection (immunization) and observation periods of animals were different in the particular 11 experiments (or group of experiments), so the details are given separately. After termination of the observation (or during the observation at decease of an animal), partial necropsy was carried out, the brain was taken out, in carnivores also submandibular salivary glands and in birds also other organs and tissues. Control examinations for the detection of the virus were carried out by means of direct immunofluorescence test (DIFT) in impression smears, possibly in cryostatic sections (Dean and Ableseth, 1973), too. In the case of carnivores *in vivo* isolation of the virus was also carried out by the intracerebral MIT on suckling white mice (Koprowski, 1973).

Experiment 1: Verification of the apathogenicity of the vaccination strain Vnukovo-32/107 on common foxes and polar foxes immunized orally with the expected vaccination dose.

Altogether 25 young, 7–8-month-old free-living common foxes were caught and observed in our laboratory approx. 3 months prior to the experiments. Prior to the experiment they were examined for the presence of antirabies antibodies by a virus neutralization test

(VNT) *in vivo* on mice (Atanasiu, 1973). The results were negative.

The strain was also verified in experiments on 45 farm-bred polar foxes of similar age like the free-living ones that had not been vaccinated against rabies before.

The animals were orally immunized (infected) with a native cell vaccine prepared from the strain Vnukovo-32/107 by dropping the virus suspension onto the root of the tongue; the titre of the virus was $10^{5.7}$ or $10^{5.8}$ MICLD₅₀/0.03 ml, the volume of the inoculum being 3.0 ml. Clinical observation of the foxes lasted 180 days.

Experiment 2: Verification of the apathogenicity of the vaccination strain Vnukovo-32/107 on common foxes; immunized with a tenfold of the expected immunization dose.

Altogether 10 young, 8–9-month-old common foxes were caught, and observed like the foxes of experiment 1.

The animals were orally immunized (infected) with a cell vaccine prepared from strain Vnukovo-32/107 that had been concentrated by ultrafiltration of the native virus suspension. The vaccine was dropped onto the root of the tongue. The actual titre was $10^{7.2}$ or $10^{7.3}$ MICLD₅₀/0.03 ml, the volume of the inoculum being 3.0 ml. Clinical observation of the foxes lasted 180 days. After termination of the experiment, partial necropsy and virus detection were carried out (rabies antigen detection by DIFT, virus detection by MIT) as described above.

Experiment 3: Verification of the apathogenicity of the vaccination strain Vnukovo-32/107 on domestic cats immunized with the expected vaccination dose.

Altogether 10 young, 6–9-month-old domestic cats were included that had not been vaccinated against rabies before. Before being included in the experiment the animals had been reared and observed in our laboratory for 30 days. They were examined in the same way as foxes of experiment 1.

Immunization (infection) was carried out orally with a native cell vaccine prepared from the strain Vnukovo-32/107; the vaccine was dropped onto the root of the tongue. The actual virus titre was $10^{5.7}$ or $10^{5.8}$ MICLD₅₀/0.03 ml, the volume of the inoculum being 3.0 ml. Clinical observation of the cats lasted 180 days. The cats were examined in the same way as foxes of experiment 1.

Experiment 4: Verification of the apathogenicity of the vaccination strain Vnukovo-32/107 on domestic cats immunized with a tenfold of the expected vaccination dose.

In this experiment altogether 10 young, 6–9-month-old domestic cats were included that had not been vaccinated against rabies before. Before being included in the experiment the animals had been reared and observed like those in experiment 3.

The animals were immunized (infected) orally by dropping the vaccine onto the root of the tongue. The vaccine prepared from the strain Vnukovo-32/107 was

concentrated by ultrafiltration; its actual virus titre was $10^{7.3}$ and $10^{7.4}$ MICLD₅₀/0.03 ml, the volume of the inoculum being 3.0 ml. Clinical observations of the cats lasted 180 days. Subsequently partial necropsy and virus detection were carried out like in experiment 2.

Experiment 5: Verification of the apathogenicity of the vaccination strain Vnukovo-32/107 on domestic dogs orally immunized with the expected vaccination dose.

In the experiment altogether 5 young, 3–4-month-old domestic dogs were included that had not been vaccinated against rabies before. Before being included in the experiment the animals had been examined in the same way as foxes of experiment 1.

The animals were immunized (infected) orally with a native cell vaccine prepared from the strain Vnukovo-32/107; the vaccine was dropped onto the root of the tongue. The actual virus titre was $10^{5.8}$ MICLD₅₀/0.03 ml, the volume of the inoculum being 3.0 ml. The clinical observation of the dogs lasted 30 days.

Experiment 6: Verification of the apathogenicity of the vaccination strain Vnukovo-32/107 on domestic dogs immunized orally with a tenfold of the expected vaccination dose.

In the experiment altogether 5 young, 3–4-month-old dogs were included that had not been vaccinated against rabies before. Before being included in the experiment, they had been examined in the same way as foxes of experiment 1.

The animals were immunized (infected) orally with a native cell vaccine from the strain Vnukovo-32/107. The vaccine was dropped onto the root of the tongue; the actual virus titre was $10^{7.4}$ MICLD₅₀/0.03 ml, the volume of inoculum being 3.0 ml. The clinical observation of the dogs lasted 30 days.

Experiment 7: Verification of the apathogenicity of the vaccination strain Vnukovo-32/107 on white laboratory mice with different body weights and at different methods of application.

A total of 180 SPF white mice were included in the experiment: mice weighing 6–8 g, 12 g and 18 g, respectively. The animals were obtained from VELAZ, Praha.

The animals were infected (immunized) orally, intramuscularly, or subcutaneously (per 20 animals in each group) with a native virus suspension from the strain Vnukovo-32/107; the actual virus titre was $10^{5.7}$ MICLD₅₀/0.03 ml, the volume of the inoculum being 0.1 ml, or 0.2 ml. The scheme of experiment 7 is given in Tab. IV. The clinical observation of mice lasted 45 days. Partial necropsy was carried out on animals deceased during this time. The impression smears from the transversal brain section were used for the detection of the rabies antigen by DIFT.

Experiment 8: Verification of the apathogenicity of the vaccination strain Vnukovo-32/107 on free-living micromammals at different methods of application.

A total of 60 autochthonous micromammals were used, 30 individuals of each species (*Apodemus flavicollis* and *Microtus arvalis*). The animals were reared in our laboratory.

The scheme of experiment 8 is given in Tab. V. The animals were immunized in the same way as white mice in experiment 7; each group consisted of 10 animals of the two species mentioned above. After termination of the observation (45 days), examinations similar to experiment 7 were also carried out in animals which fell ill during the observation.

Experiment 9: Comparison of the virulence of the vaccination strain Vnukovo-32/107, the strain CVS and autochthonal street strains; titration experiments on mice.

In the experiment SPF mice were included: suckling mice weighing 2–3 g and mice weighing 6–8, 12 and 18 g, respectively. The animals were obtained from VELAZ, Praha.

The scheme of the experiment is given in Tab. VI. The following strains were used for titration experiments:

- the vaccination strain Vnukovo-32/107 in the form of infectious tissue culture medium;
- the strain CVS; the street strains PKM-77 and LB-1 in the form of brain suspension supernatant of guinea-pigs.

Mice were infected intracerebrally (the volume of inoculum – for suckling mice 0.01 ml, for mice weighing 6, 12 and 18 g, respectively, the volume of inoculum being 0.03 ml), intramuscularly (the volume of inoculum for suckling mice was 0.05 ml, for mice weighing 6, 12 and 18 g, respectively, the volume of inoculum being 0.1 ml), subcutaneously or orally, the volume of inoculum being the same as at the intramuscular administration. In all cases the dilution was tenfold; 5 mice were infected with each dilution. The observation of the mice lasted 28 days. The results were worked up according to the cumulative method of Reed and Muench (1938) and they were expressed as $\log \text{MICLD}_{50}$, MSCLD_{50} , and MIMLD_{50} , MPOLD_{50} , respectively, in the reference volume and for the respective category of mice.

Experiment 10: Verification of the apathogenicity of the vaccination strain Vnukovo-32/107 on white laboratory mice. The possibilities of natural transmission (contactus, ingestion) of the rabies infection from subcutaneously experimentally infected donors.

In the experiment altogether 540 SPF white mice were included as follows: the suckling mice weighing 2–3 g (360 animals) and mice weighing 6–8 g (180 animals). The animals were obtained from VELAZ, Praha.

The scheme of the experiment is given in Tab. VII. The donors (suckling mice) were infected subcutaneously. The recipients (suckling mice and mice weighing 6–8 g) were exposed to the contact with donors or they were infected by ingestion of the brains of donor mice. In experiments signed 8/1/a–8/2/c (aimed at the verification of transmission – possibility of the rabies by contact); the suckling mice were used as donors as well as recipients. In experiments signed 8/3/a–8/4/c (aimed at verification of transmission – possibility of rabies by ingestion of rabies material); suckling mice

were used as donors, mice weighing 6–8 g were used as recipients.

The following virus suspensions were used for the infection of mice (experimental donors and potential recipients):

- the native suspension of the vaccination strain Vnukovo-32/107;
- the native brain suspension of the dog's street strain signed K-81;
- the native brain suspension of the standard strains CVS.

In all cases (for experiments 8/1/a–8/4/c) the suckling mice (experimental donors) were uniformly infected with the strains mentioned above – subcutaneously into the upper lip, with a dose which ensured 100% mortality; the volume of the inoculum being 0.05 ml.

In potential recipients, the transmission possibilities of the rabies infection were also modulated with the use of cyclophosphamide immunosuppression (Cyclophosphamide 200, Jenapharm, Jena, the former DDR), in a dose of 200 mg/kg of live weight of mice. Cyclophosphamide was administered subcutaneously, immediately prior to the exposition.

The potential recipients for the testing of the transmission possibility of the rabies infection by contact (suckling mice) were reared in one nest (5 animals) with experimentally (subcutaneously) infected siblings and fed by one mother. The rabies brains of subcutaneously infected suckling mice (the donors killed in the stage of prostration) were fed to the potential recipients for the testing of the possibility of rabies transmission by ingestion (mice weighing 6.0–8.0 g), individually per one brain, fasting.

The clinical observation of the mice after infection lasted 45 days. Partial necropsy was carried out on animals which deceased during the observation time; the impression smears from the brain section were used for the detection of rabies antigen by DIFT.

Experiment 11: Residual virulence of the vaccination strain Vnukovo-32/107. Experiments on Euroasian kestrels infected orally, intramuscularly or intracerebrally.

Altogether 10 young Euroasian kestrels were included in the experiment. The animals were obtained from ÚEF SAV, Bratislava. Before the experiments, the animals were examined in the same way as foxes in experiment 1; the result was negative.

Two strains of the rabies virus were used for the experimental infection; the vaccination strain Vnukovo-32/107 and autochthonal dog's street strain P-1975.

The scheme of the experiment is given in Tab. VIII. Animals No. 1–3 (group 9/1/a) were infected orally – by feeding the whole cadavers of deceased suckling mice experimentally intracerebrally infected with the strain Vnukovo-32/107. Three mice were fed to each kestrel. Kestrel No. 4 (9/1/b) was infected with the strain Vnukovo-32/107 intramuscularly into pectoral

muscles at a dose of 5×10^6 MICKD₅₀. Analogically, kestrel No. 5 (9/1/c) was infected intracerebrally with a dose of 10^6 MICKD₅₀. Animals No. 6–8 (group 9/2/a) were infected orally – by feeding the whole cadavers of deceased suckling mice infected with the street strain P-1975. Three mice were fed to each kestrel. Kestrel No. 9 (9/2/b) was infected with the strain P-1975 intramuscularly into pectoral muscles at a dose of 10^5 MICKD₅₀. Analogically, kestrel No. 10 (9/2/c) was infected intracerebrally with a dose of 10^4 MICKD₅₀.

The observation of the infected kestrels lasted 75 days. The aimed clinical examinations were carried out twice a day. In the intervals of 7 days, the swab smears of the oral cavity and corneal impressions were taken from the infected animals for the detection of rabies antigen by DIFT.

Kestrel No. 10 (9/2/c, intracerebrally infected with the street strain P-1975), has clinically fallen ill for rabies on day 30. On day 5 of the disease the animal was euthanatized by ether. At partial necropsy, the following tissues and organs were taken out: brain, medulla oblongata, cervical medulla, liver, lungs, pectoral muscles, heart, spleen, kidneys, ischial nerve, tongue, glandular stomach, trachea, eyes, bursa Fabricii; for postmortal detection of rabies antigen by DIFT; parallelly by the method of impression smears and cryostatic sections. The samples of CNS were also examined by intracerebral MIT on suckling mice.

On day 60 after infection, animals No. 1–9 (infected orally, intramuscularly with both strains of the rabic virus mentioned above, or intracerebrally with the strain Vnukovo-32/107 – animal No. 5) were intramuscularly administered with hydrocortison sol. Spofa at a dose of 25 mg, daily, during 10 days. On day 75, these animals were euthanatized by ether, too; the partial necropsy was carried out, the organs and tissues were taken out in the same way as in kestrel No. 10 and the examinations were carried out by means of the methods mentioned above.

RESULTS

The results of partly comparative group of experiments (No. 1–11) are summarized in Tabs. (I–VIII). With respect to the extent and heterogeneity, they are

further divided and/or summarized in the form of the groups of experiments and groups of animals.

In experiment 1, which was carried out on common foxes, orally immunized (infected) with a presumed dose of the vaccination strain Vnukovo-32/107, its apathogenicity was confirmed (Tab. I). The vaccination strain with a titre of $10^{5.7}$ (the group of 15 foxes – 1/a) and $10^{5.8}$ (the group of 10 foxes – 1/b), MICKD₅₀/0.03 ml, respectively, in the volume of 3.0 ml; hence the animals were given 5×10^7 and 6.3×10^7 MICKD₅₀, respectively. Analogically, in group 1/c – 45 head of young polar foxes were immunized with the strain Vnukovo-32/107 virus suspension at the individual dose of 6.3×10^7 MICKD₅₀. In the course of the observation, the animals did not show any behavioral changes. During the observation time, as a consequence of a trauma, two animals have fallen ill and then deceased in the group signed 1/a; in the group of common foxes signed 1/b – one animal and two animals from the group of polar foxes. In all five cases of decease of common foxes, the partial necropsy was carried out; the detection of the rabies antigen by DIFT in the brain and in the submandibular salivary glands; also the intracerebral MIT on suckling mice. The results of the above-mentioned control examinations for rabies were negative.

Experiment 2, carried out on young common foxes, was aimed at the verification of the apathogenicity of the vaccination strain Vnukovo-32/107 when the animals were orally immunized (infected) with a dose at least ten times exceeding the presumed vaccination dose. The animals were given individual doses of 1.585×10^9 and 1.995×10^9 MICKD₅₀, respectively. In the course of the observation, the animals did not show any behavioral changes. The results given in Tab. I indicate that none of 10 animals deceased. On day 180 of the observation, the animals were killed. After the partial necropsy the rabies antigen was detected by DIFT in the brain and in submandibular salivary glands, as well as by intracerebral MIT on suckling mice; the results were negative.

Analogical results like in experiments 1 and 2 (carried out on foxes) were obtained from experiments 3–6, carried out on other carnivores – domestic cats and dogs. The experimental animals were orally immunized (infected) with the strain Vnukovo-32/107 at a dose which is presumed in vaccination, and/or it is at least

I. Residual virulence of the Vnukovo-32/107. Vaccination strain for red fox and polar fox in oral route of administration

Species tested	Group of animals	Number of inoculated animals	Vaccine strain titer log. MICKD ₅₀ /0.03	Volume of dose (ml)	Deaths	Detection of rabies antigen in brain	Rabies virus isolated		Rabies positive
							brain	salivary gland	
Red fox	1/a	15	5.7	3.0	2	0	0	0	0/15
	1/b	10	5.8	3.0	1	0	0	0	0/10
Polar fox	1/c	45	5.8	3.0	2	0	0	0	0/45
Red fox	2/a	5	7.2	3.0	0	0	0	0	0/5

ten times higher. The results are given in Tabs. II and III. In the course of the observation (180 days in cats, only 30 days in dogs for technical reasons), no behavioral changes in animals were seen. Three cats have deceased as a consequence of trauma. The control laboratory examinations for rabies which were carried out in dead animals and/or in the groups of cats 4/a, 4/b after finishing of the observation were negative. In dogs orally infected (immunized) with a high dose of the strain Vnukovo-32/107, after finishing of the observation (30 days), no control examinations for rabies were done. These animals were not killed.

Model experiment 7 was carried out on white mice of different body weights, infected (immunized) orally, and/or intramuscularly or subcutaneously with a native undiluted suspension of the vaccination strain Vnukovo-32/107 (at the actual titre of $10^{5.7}$ MICLD₅₀/0.03 ml). The results of the experiment are summarized in Tab. IV, they indicate the possibility of quantification of residual virulence of the tested strain. These confirm the degree of attenuation of the vaccination strain: it is apathogenic for 18-grams-mice in each of 3 peripheral ways of application; in 12-grams-mice the low-percentage mortality was seen only at subcutaneous and intramuscular applications (5 and 10%, respectively); in 6-grams-mice the mortality at subcutaneous and intra-

muscular applications was 10% and 15%, respectively. When administered orally, the vaccination strain Vnukovo-32/107 causes the disease in no weight category of the mice mentioned above.

The experiments on non-target species of autochthonal micromammals were carried out to a limited extent (experiment 8, the results are given in Tab. V). The experiment was carried out on 30 individuals of the species *Apodemus flavicolis* and *Microtus arvalis*. For the infection (immunization) of animals, the native undiluted suspension of the vaccination strain Vnukovo-32/107 (at the actual titre of $10^{5.8}$ MICLD₅₀/0.03 ml) was applied orally, subcutaneously or intramuscularly. The results of the experiments indicate that the vaccination strain Vnukovo-32/107 caused the disease sporadically (10%) only when administered intramuscularly. Other ways of application are safe (the virus is apathogenic).

The comparative titration experiments (experiment 9) were carried out on mice of different weight categories. For comparison, two virulent autochthonal street strains were used; as well as the laboratory strain CVS. The results given in Tab. VI indicate the following: The vaccination strain Vnukovo-32/107 is characterized by a relatively low peripheral activity. When administered orally to 18-, 12- and 6-grams-mice, it is

II. Residual virulence of the Vnukovo-32/107. Vaccination strain for domestic cat in oral route of administration

Group of animals	Number of inoculated animals	Vaccine strain titer log MICLD ₅₀ /0.03	Volume of dose (ml)	Observed period (days)	Deaths	Detection of rabies antigen in brain	Rabies virus isolated		Rabies positive
							brain	salivary glands	
3/a	5	5.7	3.0	180	1	0	0	0	0/5
3/b	5	5.8	3.0	180	1	0	0	0	0/5
4/a	5	7.3	3.0	180	0	0	0	0	0/5
4/b	5	7.4	3.0	180	1	0	0	0	0/5

III. Residual virulence of the Vnukovo-32/107. Vaccination strain for domestic dog in oral route of administration

Group of animals	Number of inoculations	Vaccine strain titer log MICLD ₅₀ /0.03	Volume of dose (ml)	Observed period (days)	Alternation of behaviour	Deaths
5	5	5.8	3	30	-	-
6	5	7.4	3	30	-	-

IV. Residual virulence of the Vnukovo-32/107. Vaccination strain for the white laboratory mice

Species tested	Group of animals	Number of inoculations	Weight of animals	Vaccine strain titer log MICLD ₅₀ /0.03	Volume of dose (ml)	Route of inoculation	Observed period (days)	Deaths	Detection of rabies antigen in brain	Rabies positive
Laboratory mouse	5/a	20	6-8	5.7	0.1	<i>p.o.</i>	45	0	0	0/20
	5/b	20	6-8	5.7	0.2	<i>s.c.</i>	45	2	2	2/20
	5/c	20	6-8	5.7	0.2	<i>i.m.</i>	45	3	3	3/20
	5/d	20	12	5.7	0.1	<i>p.o.</i>	45	0	0	0/20
	5/e	20	12	5.7	0.2	<i>s.c.</i>	45	1	1	1/20
	5/f	20	12	5.7	0.2	<i>i.m.</i>	45	2	2	2/20
	5/g	20	18	5.7	0.1	<i>p.o.</i>	45	1	0	0/20
	5/h	20	18	5.7	0.2	<i>s.c.</i>	45	2	0	0/20
	5/i	20	18	5.7	0.2	<i>i.m.</i>	45	1	0	0/20

apathogenic; in suckling (2–3-grams) mice it causes the disease only sporadically. In 18-grams-mice, the strain Vnukovo-32/107 is apathogenic both when administered subcutaneously and intramuscularly.

The possibilities of the transmission of rabies infection caused by vaccination strain Vnukovo-32/107 (by contact, and/or by ingestion) were experimentally verified in a model experiment on mice (experiment 10). The subcutaneously infected suckling mice were used as donors. For comparison, the street strain K-81 and the standard strain CVS were used. Susceptibility of potential recipients was also modulated by immunosuppression with cyclophosphamide.

The results given in Tab. VII indicate the vaccination strain Vnukovo-32/107 does not spread by contact. At the same time, we did not find out any possibility of this strain transmission by ingestion of rabies material. In rabies strains used for comparison (the street strain K-81, the laboratory strain CVS) after ingestion of rabies material, the possibility of the infection transmission was observed; it was partially potentiated by the immunosuppression of recipients. We did not observe any possibility of the transmission of the rabies

infection by contact with the street strain and/or with CVS either.

Experiment 11 was carried out on young falcons - Euroasian kestrels. For experimental infection, in addition to the strain Vnukovo-32/107 the autochthonal street strain P-1975 was used. The birds were infected orally (by feeding of cadavers of experimentally infected mice), intramuscularly and/or intracerebrally. The results of the group of experiments No. 11 are given in Tab. VIII.

The results confirm the following: The periodical intravital examinations (the swab smears of the mucosa of oral cavity and corneal impressions), aimed at the detection of rabies antigen by DIFT and isolation of the virus by intracerebral MIT were negative. During 75 days of the clinical observation of animals, in 9 experimentally infected falcons (No. 1–9), no clinical signs of rabies were observed. On falcon No. 10 (9/2/c), intracerebrally infected with the street strain, on day 30 after inoculation the clinical signs of rabies have appeared, like bristling feather, apathy, inappetence, static and locomotory ataxy, paralysis. On day 5 of the disease, it was euthanatized. At partial necropsy of fal-

V. Residual virulence of the Vnukovo-32/107. Vaccination strain for the free living autochthonous micromammals

Species tested	Group of animals	Number of inoculated animals	Weight of animals	Vaccine strain titer log M ₁ CLD ₅₀ /0.03	Volume of dose (ml)	Route of inoculation	Observed period (days)	Deaths	Detection of rabies antigen in brain	Rabies positive
<i>Apodemus flavicollis</i>	6/a	10	20–30	5.8	0.1	<i>p.o.</i>	45	2	0	0/10
	6/b	10	20–30	5.8	0.2	<i>s.c.</i>	45	2	0	0/10
	6/c	10	20–30	5.8	0.2	<i>i.m.</i>	45	2	1	1/10
<i>Microtus arvalis</i>	6/d	10	20–30	5.8	0.1	<i>p.o.</i>	45	2	0	0/10
	6/e	10	20–30	5.8	0.2	<i>s.c.</i>	45	1	0	0/10
	6/f	10	20–30	5.8	0.2	<i>i.m.</i>	45	2	1	1/10

VI. Virulence comparison of the Vnukovo-32/107. Vaccination strain, CVS strain and autochthonous street strains of rabies virus. Titration experiments in mice

Virus	Virus strain	Route of inoculation	Titer of virus – log MLD ₅₀			
			suckling mice	6-gram weight	12-gram weight	18-gram weight
Fixed/reference	CVS	<i>i.c.</i>	6.8	6.2	5.7	NT
		<i>i.m.</i>	3.2	2.9	2.7	NT
		<i>s.c.</i>	2.4	2.3	2.0	NT
		<i>p.o.</i>	1.2	<1	<1	NT
Street strain	PKM-77	<i>i.c.</i>	5.8	5.0	4.6	NT
		<i>i.m.</i>	3.2	3.0	2.9	NT
		<i>s.c.</i>	2.3	2.2	1.9	NT
		<i>p.o.</i>	1.2	<1	<1	NT
	LB-1	<i>i.c.</i>	5.2	4.9	4.3	NT
		<i>i.m.</i>	3.1	3.0	2.8	NT
		<i>s.c.</i>	2.4	2.3	2.0	NT
		<i>p.o.</i>	<1	<1	<1	NT
Vaccination strain	Vnukovo-32/107	<i>i.c.</i>	6.2	5.7	2.4	1.4
		<i>i.m.</i>	3.1	<1	<1	0
		<i>s.c.</i>	2.3	<1	<1	0
		<i>p.o.</i>	<1	0	0	0

con No. 9 the taken tissues and organs (Tab. VIII) were examined by DIFT (parallelly impression smears and cryostatic sections), the samples of CNS also by intracerebral MIT on suckling mice. The rabies antigen by DIFT was detected only in the parts of CNS mentioned above; the result of MIT was negative.

On day 60 after infection, hydrocortisone was applied to falcons, after the application no clinical signs of rabies were seen in the suppressed animals either. On day 75 after infection, the animals were also euthanized, the partial necropsy was carried out, the organs and tissues were taken out like in the case of falcon No. 9 and they were examined by the methods men-

tioned above. The results of the examinations were negative.

The results of the experiments in group 11 indicate the vaccination strain Vnukovo-32/107 is, unlike the street strain, apathogenic to falcons also when applied intracerebrally.

DISCUSSION

The definition of the residual virulence of vaccine strains for live vaccine production in general and especially for oral rabies vaccine for wild carnivores is an

VII. Residual virulence of the Vnukovo-32/107. Vaccination strain for laboratory mice. Possibilities of the rabies infection natural transmission (contactus, ingestio) from subcutaneously experimentally infected donors

Experiment No.	Mice									
	donors				recipients					
	category of animals	number of animals	virus strain	route of inoculation	category of animals	immuno-suppression	number of animals	mode of infection	deaths	detection of rabies antigen in brain
8/1/a	suckling mice	15	Vn.-32/107	s.c.	suckling mice	-	15	contactus	3	0
8/1/b	suckling mice	15	K-81	s.c.	suckling mice	-	15	contactus	1	0
8/1/c	suckling mice	15	CVS	s.c.	suckling mice	-	15	contactus	1	0
8/2/a	suckling mice	15	Vn.-32/107	s.c.	suckling mice	+	15	contactus	1	0
8/2/b	suckling mice	15	K-81	s.c.	suckling mice	+	15	contactus	2	0
8/2/c	suckling mice	15	CVS	s.c.	suckling mice	+	15	contactus	1	0
8/3/a	suckling mice	30	Vn.-32/107	s.c.	6-8 g	-	30	ingestion	0	0
8/3/b	suckling mice	30	K-81	s.c.	6-8 g	-	30	ingestion	1	1
8/3/c	suckling mice	30	CVS	s.c.	6-8 g	-	30	ingestion	2	2
8/4/a	suckling mice	30	Vn.-32/107	s.c.	6-8 g	+	30	ingestion	0	0
8/4/b	suckling mice	30	K-81	s.c.	6-8 g	+	30	ingestion	2	2
8/4/c	suckling mice	30	CVS	s.c.	6-8 g	+	30	ingestion	3	3

VIII. Residual virulence of the Vnukovo-32/107. Vaccination strain, Experiments in Euroasian kestrels (*Falco tinnunculus*), infected in oral, intramuscular and intracerebral route. results of the direct immunofluorescence (DMIF) postmortal detection of rabies antigen*

Group of animals	Virus strain	Route of inoculation	Number of animals	Detection of rabies antigen - DMIF														
				brain	medulla oblongata	medulla cervicalis	nervus ischiadicus	liver	lung	musculus pectoralis	spleen	kidney	tongue	stomach	trachea	eyes	bursa Fabricii	
9/1/a	Vn.-32/107	p.o.	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		p.o.	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		p.o.	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9/1/b	Vn.-32/107	i.m.	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9/1/c	Vn.-32/107	i.c.	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9/2/a	P-1975	p.o.	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		p.o.	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		p.o.	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9/2/b	P-1975	i.m.	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9/2/c	P-1975	i.c.	10	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Note: * = parallelly in impression smears and cryostatic cuts; in the case of positive result - mouse inoculation test

extremely topical problem. It is a part of standards for evaluation of oral rabies vaccines in accordance with WHO recommendations (1989, 1990, 1992). The standards together with the evaluation of up-to-date vaccine strains, are discussed in detail by W a n d e l e r (1991) and A r t o i s et al. (1992).

Another indivisible part of evaluation of vaccine strains for preparation of oral vaccines – determination of immunogene and antigene activity (in accordance with the mentioned standards) has been an object of our study; the results are published in parallel (Š v r č e k et al., 1995).

Comparative studies of the development of vaccine baits carried out in our laboratory served as a basis for selection of the strain Vnukovo-32/107 for oral antirabic immunization of free-living foxes (Š v r č e k et al., 1980b, 1982). The origin of the strain, the ways of attenuation and its properties are described in detail by the authors of the strain (N i k i t i n a and S e l i m o v, 1969; S e l i m o v, 1978, 1985, 1987). Recently the characterization of the strain Vnukovo-32 has been supplemented with new information – preparation of strain – specific monoclonal antibodies (G r i b e n č a et al., 1991; M a č i k o v á et al., 1992), and with the definition of the part of a genome (F o d o r et al., 1994).

We summarize the results of the extensive set of 11 groups of experiments, aimed at complex quantification of residual virulence (grade of attenuation) of the cold mutant of the vaccine strain of rabies virus Vnukovo-32/107 intended for the preparation of an oral rabies vaccine (registered under the trade name Kamark) for immunization of free-living carnivores.

In accordance with WHO standards we tested (quantitatively) the residual virulence in experiments on carnivores, especially on the supposed target (extremely sensitive) species – common fox and related species farm-bred polar fox. Additional experiments have made on domestic cats and dogs, and on non-target species of autochthonous micromammals (yellow-necked mouse and common vole). Besides that predatory birds (Euroasian kestrels) have been included in the experiment. Part of experiments carried out on common laboratory animals – white mice – were model experiments.

Despite the fact that we consider the requirement of WHO (1989, 1990, 1992) for including the birds into study of residual virulence of vaccine strains of rabies virus as irrelevant, we have to respect it. According to results of our previous studies (Š v r č e k et al., 1980a, 1983), the birds are not susceptible to rabies virus, or their susceptibility is extremely low. Rabies of the birds has also several specificities – birds are not able to spread the disease.

Results of our experiments with various target and non-target species explicitly demonstrate a high grade of cold mutant attenuation of the vaccine strain Vnukovo-32 on the level of the 107th serial cell passage (Vnukovo-32/107). The tested strain, when applied orally (including extremely high doses), is apathogenic to the target

carnivores – common fox, related polar fox, domestic cat and dog, and two species of autochthonous rodents included in the experiment. Similarly, rabies was not detected at subcutaneous administration of the strain Vnukovo-32/107 to the yellow-necked mouse and common voles while, at the intramuscular administration, the mortality was 10%. The tested strain has been apathogenic to predatory birds – Euroasian kestrels at both the intramuscular and intracerebral administration.

The residual virulence of the strain Vnukovo-32/107 was subjected to additional quantification in three groups of extensive comparative experiments carried out on white mice of various weight categories. Mice were infected orally, subcutaneously, intramuscularly and intracerebrally. Model experiments aimed at verification of possible contact infection by ingestion of the rabies infected material and immunosuppression were also performed. Obtained results serve as a proof of a high degree of attenuation or low residual virulence of the vaccination strain Vnukovo-32/107.

The cold mutant, vaccination strain Vnukovo-32/107, surpasses numerous vaccination strains (or variants of the SAD strain), used to produce live oral vaccines for immunization of free-living carnivores, due to its high degree of attenuation (low residual virulence). W a n d e l e r (1991) and A r t o i s et al. (1992) summarized the data on the test of residual virulence of these vaccination strains (corresponding to the appropriate WHO criteria). Besides that the high degree of attenuation of the strain Vnukovo-32 (or areactogeneity of live vaccines produced from this strain) is indicated by the fact that no case of „laboratory rabies“ has been recorded in the territory of Czechoslovakia since 1979 when this vaccine was introduced into use for vaccination of all species of domestic animals including the highly sensitive domestic cats and cattle (V r z a l et al., 1988).

The results (preliminary so far) of practical application of the oral vaccine produced by means of the strain Vnukovo-32/107 also point to its harmlessness (areactogeneity). In total, 232 600 vaccination baits Kamark were used throughout Slovakia in 1992–1993. Within the scope of obligatory control tests performed in the vaccination zone, 31 strains (isolated) of the rabies virus were obtained. By means of monoclonal antibodies all these strains were identified as street strains (Š v r č e k et al., 1994). This indicates that the strain Vnukovo-32/107 is also apathogenic to the extremely susceptible – common fox.

REFERENCES

- ARTOIS, M. – GUITTRÉ, C. – THOMAS, I. – LEBLOIS, H. – BROCHIER, B. – BARRAT, J.: Potential pathogenicity for rodents of vaccines intended for oral vaccination against rabies: a comparison. *Vaccine*, 10, 1992: 524–528.
- ATANASIU, P.: Quantitative assay and potency test of antirabies serum and immunoglobulin. In: KAPLAN, M. M. –

- KOPROWSKI, H. H. (eds.): Laboratory techniques in rabies. 3rd ed. Geneva, WHO 1973: 314–320.
- DEAN, D. J. – ABELSETH, M. K.: The fluorescent antibody test. In: KAPLAN, M. M. – KOPROWSKI, H. H. (eds.): Laboratory techniques in rabies. 3rd ed. Geneva, WHO 1973: 73–84.
- DEDEK, L. – MATOUCH, O. – VRZAL, V. – KAPPELER, A.: Vakciny k orální imunizaci lišek proti vzteklině. Veterinářství, 43, 1993: 368–370.
- FENJE, P.: Propagation of rabies virus in cultures of hamster kidney cells. Canad. Vet. J., 6, 1960: 479–484.
- FODOR, I. – GRABKO, V. I. – KHOZINSKI, V. V. – SELIMOV, M. A.: Nucleotide and deduced amino acid sequences of glycoprotein gene of rabies virus vaccine strain Vnukovo-32. Arch. Virol., 135, 1994: 451–459.
- GRIBENKA, S. V. – VASILENKO, O. V. – FURALEV, V. A. – KALJUŠNIK, S. J. – KUZMICKAJA, T. M. – SVEŠNIKOV, P. G. – BARINSKY, I. F.: Polučenie i charakteristika gibridom, producirujuščich monoklonalnye antitela k strukturnym belkam virusa bešenstva, štamm Vnukovo-32. Vopr. Virusol., 36, 1991: 318–321.
- KOPROWSKI, H.: The mouse inoculation test. In: KAPLAN, M. M. – KOPROWSKI, H. H. (eds.): Laboratory techniques in rabies. 3rd ed. Geneva, WHO 1973: 85–93.
- MAČIKOVÁ, I. – DEDEK, L. – VRZAL, L. V. – KONTSEKOVÁ, E. – KONTSEK, P. – ČIAMPOR, F.: Common and different properties of the rabies virus glycoprotein of strains SAD-Vnukovo and Pittman-Moore. Acta Virol., 36, 1992: 541–550.
- MATOUCH, O. – JAROŠ, J.: Tlumení vztekliny orální vakcínací lišek v ČR. Veterinářství, 42, 1992: 446–449.
- MATOUCH, O. – JAROŠ, J. – POHL, P. – VRZAL, V.: Orální vakcinace lišek proti vzteklině vakcínou Vnukovo. Veterinářství, 38, 1988: 540–542.
- MOCSÁRI, E. – KERÉKES, B.: Újabb lépés Európa felé: Magyarszágon is elkezdődik a rókkák orális immunizálása. Magy. Állatorv. Lap., 47, 1992: 581–583.
- MOCSÁRI, E. – KERÉKES, B. – HELTAY, I. – SZALAY, D. – CSABAY, L.: A rókkák veszteség elleni orális immunizálásának hazai tapasztalatai. Magy. Állatorv. Lap., 49, 1994: 10–15.
- NIKITINA, L. F. – SELIMOV, M. A.: Attenuirovannyj v kulture tkani vakcinnyj virus bešenstva (štamm Vnukovo), jeho biologičeskaja charakteristika. In: Zbor. Simp. IPVE AMN po bešenstvu. Moskva, 1969: 68–79.
- REED, L. J. – MUENCH, H.: A simple method of estimating 50 percent and points. Amer. J. Hyg., 27, 1938: 493–498.
- RUDD, R. J. – TRIMARCHI, C. V.: Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in isolation of a street strain rabies virus. J. Clin. Microbiol., 25, 1987: 1456–1458.
- SELIMOV, M. A.: Bešenstvo. Moskva, Medicina 1978. 336 p.
- SELIMOV, M. A.: Tissue culture rabies vaccine for human use (Rabivac-Vnukovo-32). Moscow, Medexport 1985. 62 p.
- SELIMOV, M. A.: Sovremennye dostizhenia v oblasti rabiiologii. Moskva, VNIIMMTI 1987. 70 p.,
- SELIMOV, M. A. – AKSENOVA, T. A. – KLJUJEVA, E. V. – GRIBENKA, L. V. – LEBEDEVA, I. V.: Evaluation of the inactivated tissue culture rabies vaccine from the Vnukovo-32 strain. Dev. Biol. Stand., 40, 1978: 57–64.
- SCHNEIDER, L. G.: Oral immunization of wildlife against rabies. Ann. Inst. Pasteur, Virology, 136, 1985: 469–473.
- SCHNEIDER, L. G. – COX, J. H. – MÜLLER, W. W. – HOHNSBEEN, K. P.: Current oral rabies vaccination in Europe. Rev. Infect. Dis., 10, 1988: 654–659.
- SINNECKER, V. H. – APITZSCH, L. – BERNDT, D. – SCHRADER, CH. – GOGOLIN, J. – EGERT, J.: Die Entwicklung des Tollwutlebendimpfvirus SAD/Potsdam 5/88 zur oralen Fuchsimpfung sowie seine Charakterisierung am Mausmodell. Mh. Veter.-Med., 45, 1990: 77–79.
- STECK, F. – WANDELER, A. – BICHSEL, P. – CAPT, S. – HÄFLINGER, U. – SCHNEIDER, L.: Oral immunization of foxes against rabies. Laboratory and field studies. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 5, 1982: 165–171.
- STÖHR, K. – MESLIN, F. X.: Development of oral vaccination in Europe. In: Proc. IVth Conf. Meeting WHO, IOE on rabies control in Europe. Piešťany, 6–7 Oct. 1993 (in press).
- STÖHR, K.: Fifteen years of oral vaccination in EUROPE. In: Proc. WHO Rabies Conf. Pulawy, 27–28 Jan. 1994 (in press).
- ŠVRČEK, Š.: Orálna vakcinácia líšok proti besnote. Metodické pokyny. Bratislava, ŠVS SR, 20, 1994.
- ŠVRČEK, Š. – ONDREJKA, R. – LICHARD, M. – VRTIAK, O. J. – BENÍŠEK, Z. – ALEXANDER, R. – ZÁVADOVÁ, J.: Štúdium patogenézy lyssy u sokolov myšiakov. Zbor. Ved. Prác ÚEVM Košice, 3, 1980a: 201–210.
- ŠVRČEK, Š. – VRTIAK, O. J. – SELIMOV, M. A. – AKSENOVA, T. A. – GERLACHOV, D. – HOLY, L. – ĎURAN, A. – BAJOVÁ, V.: Experimentálne predposylky i technika oraľnoy antirabičeskoj imunizacii. Acta Vet. Acad. Sci. Hung., 28, 1980b: 33–41.
- ŠVRČEK, Š. – VRTIAK, O. J. – SELIMOV, M. A. – AKSENOVA, T. A. – ONDREJKA, R. – ZÁVADOVÁ, J. – ALEXANDER, R. – BENÍŠEK, Z. – BAJOVÁ, V.: Perspektivy der oralen Immunisierung wildlebender Karnivoren gegen die Tollwut. Beitr. Jagd-Wildforsch., 12, 1982: 178–185.
- ŠVRČEK, Š. – MATOUCH, O. – VRTIAK, O. J. – ONDREJKA, R. – ŠVEC, J.: Značenie lisicy obyknovenoj (*Vulpes vulpes*, L.) v ekologii virusa bešenstva v Evrope. In: Proc. XVI. Congr. Int. Union Game Biologists, Štrbské Pleso, 1983: 584–590.
- ŠVRČEK, Š. – VRTIAK, O. J. – ONDREJKA, R.: Modifikácia kvantitatívnej metódy IPVE pre určenie imunogénnej aktivity živých antirabičských vakcín k orálnej imunizácii. In: Zbor. Ref. Vet. Vedy a Prax – 5. Symp. o besnote, Košice, 1984: 62–63. VŠV a ÚEVM, Košice.
- ŠVRČEK, Š. – VRTIAK, O. J. – ĎUROVE, A. – ONDREJKA, R. – ZÁVADOVÁ, J., et al.: Orálna antirabičská vakcína, overenie jej účinnosti a neškodnosti, predbežné výsledky terénneho použitia. [Záverená správa.] Univerzita veterinárskeho lekárstva Košice, Mevak Nitra, 1993. 88 p.
- ŠVRČEK, Š. – ĎUROVE, A. – SOKOL, J. – SÜLIOVÁ, J. – ONDREJKA, R., et al.: Imunoprofylaxia besnoty voľne žijúcich mäsožravcov (*Carnivora*). Slov. Vet. Čas., 19, 1994: 50–55.
- ŠVRČEK, Š. – SOKOL, J. – ĎUROVE, A. – SÜLIOVÁ, J. – ONDREJKA, R., et al.: Epizootological situation and control of rabies in the Slovak Republic. In: Proc. WHO Rabies Conf., Pulawy, 27–28 Jan. 1994 (in press).

- ŠVRČEK, Š. – ĎUROVE, A. – ONDREJKA, R. – ZÁVADOVÁ, J. – SŮLIOVÁ, J. – BENÍŠEK, Z. – VRTIAK, O. J. – FEKETEOVÁ, J. – MAĎAR, M.: Immunogenic and antigenic activity of an experimental oral rabies vaccine prepared from the strain Vnukovo-32/107. *Vet. Med. – Czech*, 40, 1995 (in press).
- VRZAL, V. – CHUMELA, J. – ZATLOUKAL, L. – ČUPERA, Z.: Historie, současný stav a vývoj imunoprofylaxie vztekliny v ČSSR. *Veterinářství*, 38, 1988: 358–359.
- VRZAL, V. – DEDEK, L. – MATOUCH, O. – KAPPELER, A.: Immunogenní a protekční schopnost vakcíny proti vzteklině k orální imunizaci lišek. *Veterinářství*, 43, 1993: 370–372.
- WANDELER, A. I.: Oral immunization of wildlife. In: BAER, G. M. (ed.): *The natural history of rabies*. 2nd ed. Boca Raton, CRC Press 1991: 485–503.
- WHO Report. Consultation on requirements and criteria for field trials on oral rabies vaccination of dogs and wild carnivores. Geneva, 1-2 March 1989 (WHO/Rab.Res./89.32).
- WHO/APHIS Report. Consultation on baits and baiting delivery system for oral immunization of wildlife against rabies. Tort Collins, 10–12 July 1990. (WHO/Rab.Res./90.35).
- WHO Expert Committee on Rabies. Eighth report. WHO Technical Report Series, No 824. Geneva, WHO 1992. 89 p.
- ZÁVADOVÁ, J. – ŠVRČEK, Š. – SŮLIOVÁ, J. – MANDLÍK, M. – HŮSKA, M. – ĎUROVE, A. – BENÍŠEK, Z. – ONDREJKA, R. – BENKO, G.: Zdokonalenie laboratórnej diagnostiky besnoty a titrácie vírusu besnoty. [Závěrečná správa.] Košice, Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny 1993. 53 p.

Arrived on 5th August 1994

Kontaktná adresa:

Prof. Štefan Š v r č e k , Rabiologické laboratórium UVL a ÚEVM, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/321 11–5, 095/71 94 62, fax 095/76 76 75

POKyny PRO AUTORY

Časopis uveřejňuje původní vědecké práce, krátká sdělení a výběrově i přehledné referáty, tzn. práce, jejichž podkladem je studium literatury a které shrnují 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).

Vlastní úprava rukopisu má odpovídat státní normě ČSN 88 0220 (formát A4, 30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, mezi řádky dvojitá mezera). Tabulky, grafy a fotografie se dodávají zvlášť, nepodlepují se. Na všechny přílohy musí být odkazy v textu.

Název práce (titul) nemá přesáhnout 85 úhozů. Je nutné vyvarovat se v něm obecných názvů. Jsou vyloučeny podtitulky článků.

Krátký souhrn (Abstrakt) je informačním výběrem obsahu a závěru článku, nikoliv však jeho pouhým popisem. Musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo ve vědecké práci, a má obsahovat základní číselné údaje včetně statistických hodnot. Nemá překročit rozsah 170 slov. Je třeba, aby byl napsán celými větami, nikoliv heslovitě. Je uveřejňován a měl by být dodán ve stejném jazyce jako vědecká práce.

Rozšířený souhrn (Abstract) je uveřejňován v angličtině, měly by v něm být v rozsahu cca 2 strojopisných stran komentovány výsledky práce a uvedeny odkazy na tabulky a obrázky, popř. na nejdůležitější literární citace. Je nutné jej (včetně názvu práce a klíčových slov) dodat v angličtině, popř. v češtině či slovenštině jako podklad pro překlad do angličtiny.

Úvod má obsahovat hlavní důvody, proč byla práce realizována a velmi stručnou formou má být popsán stav studované otázky.

Literární přehled má být krátký, je třeba uvádět pouze citace mající úzký vztah k problému. Doporučuje se co nejnižší počet citovaných autorů.

Metoda se popisuje pouze tehdy, je-li původní, jinak postačuje citovat autora metody a uvádět jen případné odchylky. Ve stejné kapitole se popisuje také pokusný materiál.

Výsledky – při jejich popisu se k vyjádření kvantitativních hodnot dává přednost grafům před tabulkami. V tabulkách je třeba shrnout statistické hodnocení naměřených hodnot. Tato část by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale pouze faktické nálezy.

Diskuse obsahuje zhodnocení práce, diskutuje se o možných nedostatecích a práce se konfrontuje s výsledky dříve publikovanými (požaduje se citovat jen ty autory, jejichž práce mají k publikované práci bližší vztah). Je přípustné spojení v jednu kapitolu spolu s výsledky.

Literatura musí odpovídat státní normě ČSN 01 0197. Citace se řadí abecedně podle jména prvních autorů. 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.

Na zvláštním listě uvádí autor plné jméno (i spoluautorů), akademické, vědecké a pedagogické tituly a podrobnou adresu pracoviště s PSC, číslo telefonu a faxu.

Pokud autor používá v práci zkratku jakéhokoliv druhu, je nutné, aby byly alespoň jednou vysvětleny (vypsány), aby se předešlo omylům. V názvu práce a v souhrnu je vhodné zkratky nepoužívat.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Original scientific papers, short communications, and selectively reviews, that means papers based on the study of technical literature and reviewing recent knowledge in the given field, are published in this journal. Published papers are in Czech, Slovak or English. Each manuscript must contain a short and a longer summary.

The author is fully responsible for the originality of his paper, for its subject and formal correctness. The author shall make a written declaration that his paper has not been published in any other information source.

The board of editors of this journal will decide on paper publication, with respect to expert opinions, scientific importance, contribution and quality of the paper.

The paper extent shall not exceed ten typescript pages, including tables, figures and graphs.

Manuscript layout shall correspond to the State Standard ČSN 88 0220 (quarto, 30 lines per page, 60 strokes per line, double-spaced typescript). Tables, figures and photos shall be enclosed separately. The text must contain references to all these annexes.

The title of the paper shall not exceed 85 strokes. It is necessary to avoid in the title the usage of common expressions. Subtitles of the papers are not allowed either.

Abstract is an information selection of the contents and conclusions of the paper, it is not a mere description of the paper. It must present all substantial information contained in the paper. It shall not exceed 170 words. It shall be written in full sentences, not in form of keynotes, and comprise base numerical data including statistical data. It should be submitted in English and if possible also in Czech or Slovak.

Introduction has to present the main reasons why the study was conducted, and the circumstances of the studied problems should be described in a very brief form.

Review of literature should be a short section, containing only literary citations with close relation to the treated problem. It is recommended to cite the lowest possible number of authors.

Only original method shall be described, in other cases it is sufficient enough to cite the author of the used method and to mention modifications of this method. This section shall also contain a description of experimental material.

In the section **Results** figures and graphs should be used rather than tables for presentation of quantitative values. A statistical analysis of recorded values should be summarized in tables. This section should not contain either theoretical conclusions or deductions, but only factual data should be presented here.

Discussion contains an evaluation of the study, potential shortcomings are discussed, and the results of the study are confronted with previously published results (only those authors whose studies are in closer relation with the published paper should be cited). The sections Results and Discussion may be presented as one section only.

The citations are arranged alphabetically according to the surname of the first author. References in the text to these citations comprise the author's name and year of publication. Only the papers cited in the text of the study shall be included in the list of references. All citations shall be referred to in the text of the paper.

If any abbreviation is used in the paper, it is necessary to mention its full form at least once to avoid misunderstanding. The abbreviations should not be used in the title of the paper nor in the summary.

The author shall give his full name (and the names of other collaborators), academic, scientific and pedagogic titles, full address of his workplace and postal code.

VETERINARY MEDICINE – CZECH

Volume 40, No. 2, February 1995

CONTENTS

Holečková B., Šutiaková I., Pijáková N.: Observation of Robertsonian translocation in a cattle population.....	33
Bíreš J., Bartko P., Jenčík F., Weissová T., Jesenská M., Bírešová M.: Possibilities of elimination of magnesite light ashes impacts in beef bulls.....	35
Praslička J., Pilko P., Várady M., Čorba J.: Occurrence of levamisole- and tetramisole-resistant gastrointestinal (GI) nematodes in sheep.....	45
Šály J., Kačmár P., Neuschl J., Jantošovič J.: The effect of the bentazone herbicide on hematological parameters in sheep in the conditions of acute and subchronic intoxication.....	49
Švrček Š., Ondrejka R., Beníšek Z., Vrtiak O. J., Selimov M. A., Závadová J., Ďurove A., Süliová J., Maďar M.: Quantification of residual virulence of the Vnukovo-32/107 rabies virus vaccination strain.....	53

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 40, č. 2, Únor 1995

OBSAH

Holečková B., Šutiaková I., Pijáková N.: Nález Robertsonovej translokácie v chove hovädzieho dobytká.....	33
Bíreš J., Bartko P., Jenčík F., Weissová T., Jesenská M., Bírešová M.: Možnosti eliminácie pôsobenia magnezitových úletov u výkrmových býkov.....	35
Praslička J., Pilko P., Várady M., Čorba J.: Nález gastrointestinálnych nematódov u oviec rezistentných k levamizolu a tetramizolu.....	45
Šály J., Kačmár P., Neuschl J., Jantošovič J.: Vplyv herbicídu bentazón na hematologické ukazovatele u oviec v podmienkach akútnej a subchronickej intoxikácie.....	49
Švrček Š., Ondrejka R., Beníšek Z., Vrtiak O. J., Selimov M. A., Závadová J., Ďurove A., Süliová J., Maďar M.: Kvantifikácia zbytkovej virulencie vakcinačného kmeňa vírusu besnoty Vnukovo-32/107.....	53