

ÚZPI

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

# VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

**3**

VOLUME 40 (LXVIII)  
PRAHA  
MARCH 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 Hofírek, 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: Agris, CAB 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: Agris, CAB 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).

# MINERAL METABOLISM IN YOUNG BEEF CATTLE DURING TRANSFER FROM WINTER FEED RATION TO GRAZING

## MINERÁLNY METABOLIZMUS MLADÉHO VÝKRMOVÉHO DOBYTKA V OBDOBÍ PRECHODU ZO ZIMNEJ KŔMNEJ DÁVKY NA PAŠU

R. Žitňan<sup>1</sup>, A. Sommer<sup>1</sup>, M. Gallo<sup>1</sup>, J. Gallo<sup>1</sup>, A. Bomba<sup>2</sup>, J. Venglovský<sup>2</sup>, J. Buleca<sup>3</sup>, E. Bindas<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Animal Production at Nitra, Košice workplace, Slovak Republic

<sup>2</sup>Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

<sup>3</sup>University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

**ABSTRACT:** Concentrations of calcium, inorganic phosphorus, magnesium, sodium and potassium were observed in the blood serum of beef bullocks after their transfer from winter feed ration to grazing and in the successive grazing cycles within two years. Blood samples were taken by puncture from the *vena jugularis* from the identical six bullocks. In the first year of observation, blood collection took place a week before transfer to grazing while in the second year of observation twice in weekly intervals before grazing. In the period of grazing, the biological material was sampled in weekly intervals from week 1 to week 5 (May – 1st cycle, June – II<sup>nd</sup> cycle), then in week 10 (July – III<sup>rd</sup> cycle) and in week 14 (August – IV<sup>th</sup> cycle of grazing). Calcium concentrations in the blood serum of beef bullocks (Fig. 1) decreased after transfer from stable feeding to grazing while this drop was significant in the second year of observation ( $P < 0.05$ ). That period was followed by an increase in serum calcium concentrations in both target groups. The concentrations of inorganic phosphorus in the serum of beef bullocks (Fig. 2) dropped after transfer to grazing but a gradual increase in the values was recorded in week 4 in the first year of observation and in week 5 of grazing in the 2<sup>nd</sup> year of observation. These changes were not statistically significant. The concentrations of serum magnesium in beef bullocks (Fig. 3) statistically significantly dropped ( $P < 0.05$ ) after transfer from stable feeding to grazing in week 3 in the first year of observation and in week 4 of grazing in the second year of observation. In the successive period of grazing, a slight increase in magnesium concentrations was determined in both years of observation followed by a decrease at the end of the period of observation. The sodium values in the serum of beef bullocks (Fig. 4) significantly dropped after transfer from stable feeding to grazing in both years of observation ( $P < 0.05$ ). A highly significant drop of serum sodium ( $P < 0.01$ ) was observed in week 3 after transfer to grazing in both years of observation. In the successive period, serum sodium concentrations became stabilized and in the second half of the grazing period the sodium concentrations were gradually going up. Potassium concentrations in the blood serum of beef bulls after transfer from stable feeding to grazing (Fig. 5) showed an increase in both years of observation that was statistically significant in week 2 ( $P < 0.05$ ). In the successive period the concentrations of serum potassium were going up to reach the highest values in week 10 of the first year of observation and in week 5 in the 2<sup>nd</sup> year of observation, which was also statistically significant ( $P < 0.01$ ). The average daily weight gain of beef bullocks during the grazing season was 0.530 kg in the first year of observation and 0.470 kg in the second year of observation.

beef cattle; change in feed ration; grazing; mineral metabolism

**ABSTRAKT:** Sledovali sme hladiny vápnika, anorganického fosfora, horčíka, sodíka a draslíka v krvnom sére u výkrmových býčkov po prechode na pašu a v ďalších cykloch pasenia počas dvoch rokov. Pri priemernom hodnotení za dva sledované roky hladina sérového vápnika bola počas II. a III. cyklu pasenia (2,11 a 2,18 mmol/l) signifikantne nižšia ( $P < 0,05$ ) oproti hodnotám v období maštalného kŕmenia (2,39 mmol/l). Hodnoty anorganického fosforu v sére výkrmových býčkov boli počas celého obdobia vyrovnané a pohybovali sa v rozpätí od 2,00 do 2,07 mmol/l. Hladiny sérového horčíka po prechode z maštalného kŕmenia na pašu poklesli a tento pokles bol štatisticky významný ( $P < 0,05$ ) v IV. cykle pasenia (0,73 mmol/l) oproti hodnotám v období maštalného kŕmenia (0,86 mmol/l). Priemerné hodnoty sodíka v sére výkrmových býčkov boli v I. cykle pasenia (135,42 mmol/l) signifikantne nižšie ( $P < 0,01$ ), v II. cykle (130,52 mmol/l) vysoko signifikantne nižšie ( $P < 0,001$ ) oproti hodnotám v období maštalného kŕmenia (144,80 mmol/l). Koncentrácia draslíka v krvnom sére býčkov bola počas maštalného kŕmenia 4,41 mmol/l, čo bolo signifikantne nižšie ( $P < 0,05$ ) ako v priebehu I. cyklu pasenia (4,77 mmol/l). Počas ďalších cyklov pasenia hodnoty sérového draslíka štatisticky významne stúpali ( $P < 0,01$ ). Priemerný denný prírastok u výkrmových býčkov počas pasienkovej sezóny bol v prvom roku sledovania 0,530 kg a v druhom roku 0,470 kg.

výkrmový dobytok; zmena kŕmnej dávky; paša; minerálny metabolizmus

## ÚVOD

V období prechodu zo zimnej krmnej dávky na pašu dochádza k zvýšeniu obsahu dusíkatých látok, zníženiu sušiny i vlákniny a k zmene pomeru minerálnych látok v mladom pastevnom poraste, čo v podstatnej miere ovplyvňuje charakter látkového metabolizmu pasúcich sa zvierat.

V našich predchádzajúcich prácach sme zistili, že obdobie prechodu zo zimnej krmnej dávky na pašu ovplyvnilo úroveň bacherovej fermentácie (Žitňan, 1993; Žitňan a i., 1993a, 1994) a vybrané biochemické ukazovatele dusíkového a energetického metabolizmu v plazme a krvi výkrmového dobytku (Žitňan, 1990; Žitňan a i., 1993b). Výsledky týchto prác preukázali vzájomnú prepojenosť tráviacich procesov v bacheri a vnútorného prostredia organizmu zvierat na paši.

Na posúdenie úrovne minerálneho metabolizmu je možné využiť metabolický profilový test, pretože odhaľuje aj také poruchy metabolizmu, ktoré sa ešte klinicky neprejavujú (Brugère-Picoux a Brugère, 1987). Ingraham a Kappel (1988) doporučujú sledovať vápnik, anorganický fosfor, horčík, draslík, sodík, meď a železo. Aj napriek tomu, že úroveň minerálneho metabolizmu možno objektívne posúdiť len komplexným vyšetrením biologických tekutín a tkanív, sú krvné parametre indikátormi metabolických porúch (Lotthammer a i., 1988), pričom interpretácia laboratórnych testov sa musí opierať o znalosť referenčných hodnôt každej analyzovanej krvnej zložky (Rico a Braun, 1987).

Cieľom našej práce bolo sledovať hladiny vápnika, anorganického fosforu, horčíka, sodíka a draslíka v krvnom sére výkrmových býčkov v období prechodu zo zimnej krmnej dávky na pašu a v ďalších cykloch pasenia.

## MATERIÁL A METÓDA

Poloprevádzkové pokusy pasienkového spôsobu výkrmu býčkov sme uskutočnili v horskej oblasti na pasienkovom areáli počas dvoch rokov sledovania. Pokusy boli realizované so stádom 58 ks v 1. roku a 91 ks v 2. roku sledovania. Priemerná živá hmotnosť býčkov pinzgauského plemena a jeho krížencov s červenostakatým nížinným plemenom bola v prvom roku 207 kg a v 2. roku sledovania 186 kg. Vek býčkov bol 5–6 mesiacov. Pred prechodom na pašu v maštali sa krmna dávka skladala po oba sledované roky z kukuričnej siláže (8 kg), lúčneho sena (2 kg) a tvarovaného krmiva (1 kg). Obsah živín v krmnej dávke výkrmových býčkov v maštali bol v 1. roku sledovania: sušina 4,93 kg, vláknina 0,98 kg, NL 716 g, SNL 487 g, ŠJ 2,79, KE 0,566, NEK 175, Ca 27 g, P 17 g, Mg 8 g, Na 9 g, K 71 g a v 2. roku sledovania: sušina 4,85 kg, vláknina 0,96 kg, NL 707g, SNL 482 g, ŠJ 2,71, KE 0,559, NEK 178, Ca 30 g, P 15 g, Mg 7g, Na 8 g, K 63 g. Po

prechode býčkov na pašu, základnú zložku výživy zvierat tvoril pasienkový porast, ku ktorému mali neobmedzený prístup počas celého dňa. Obsah živín a minerálnych látok v pasienkovom poraste je uvedený v tab. I a II. Počas obidvoch rokov sledovania boli zvieratá prikrmované v prvých štyroch týždňoch po prechode na pašu. V 1. roku sledovania kukuričnou silážou s postupným znižovaním z 3 kg v 1. týždni na 2 kg v 2. týždni a 1 kg v 3. a 4. týždni po prechode na pašu. Taktiež boli prikrmované tvarovaným krmivom v 1. a 2. týždni po prechode na pašu 4 kg a v 3. a 4. týždni 3 kg. Jačmennú slamu dostávali v prvých dvoch týždňoch po prechode v množstve 1 kg. V 2. roku sledovania boli býčky pri-

I. Obsah živín v pasienkovom poraste počas dvoch rokov sledovania – Nutrient contents in grassland in the two years of observation

Živiny <sup>1</sup>	Rok sledovania <sup>2</sup>	Cyklus paše <sup>3</sup>			
		I.	II.	III.	IV.
Sušina <sup>4</sup> (%)	1.	17,70	18,46	19,89	22,46
	2.	18,89	20,60	22,40	21,12
Vláknina <sup>5</sup> (%)	1.	3,85	4,42	5,85	6,52
	2.	4,30	5,12	5,56	5,90
NL (%)	1.	4,28	3,34	4,02	3,78
	2.	4,32	4,06	3,90	3,81
SNL (%)	1.	3,36	2,74	3,35	3,15
	2.	3,60	3,12	2,81	2,27
ŠJ	1.	0,101	0,106	0,115	0,121
	2.	0,107	0,115	0,119	0,124
KE	1.	0,570	0,580	0,580	0,540
	2.	0,570	0,560	0,530	0,590
NEK	1.	335	259	291	260
	2.	337	271	236	183

NL = dusíkaté látky – crude protein; SNL = stráviteľné dusíkaté látky – digestible crude protein; ŠJ = škrobové jednotky – starch units; KE = koncentrácia energie – energy concentration; NEK = dusíkovo energetický kvocient – nitrogen-energy quotient

<sup>1</sup>nutrients, <sup>2</sup>year of observation, <sup>3</sup>grazing cycle, <sup>4</sup>dry matter, <sup>5</sup>fiber

II. Obsah minerálnych látok v pasienkovom poraste počas dvoch rokov sledovania (g/kg v pôvodnej sušine) – The content of minerals in grassland in the two years of observation (g/kg in original dry matter)

Minerálne látky <sup>1</sup>	Rok sledovania <sup>2</sup>	Cyklus paše <sup>3</sup>			
		I.	II.	III.	IV.
Ca	1.	1,1	1,2	1,2	1,5
	2.	1,4	1,2	1,5	1,3
P	1.	0,5	0,6	0,5	0,7
	2.	0,6	0,5	0,8	0,6
Mg	1.	0,3	0,4	0,5	0,7
	2.	0,4	0,6	0,7	0,5
Na	1.	0,2	0,2	0,3	0,4
	2.	0,3	0,4	0,4	0,2
K	1.	2,0	4,3	4,5	4,9
	2.	3,1	4,0	4,4	4,1

<sup>1</sup>minerals, <sup>2</sup>year of observation, <sup>3</sup>grazing cycle

krmované kukuričnou silážou len prvých dva týždne, a to v 1. týždni po prechode na pašu 3 kg a 2. týždni 2 kg. Tvarované krmivo dostávali v 1. a 2. týždni po prechode v množstve 1,2 kg a v 3. a 4. týždni 2,5 kg. Jačmennú slamu dostávali rovnako ako v 1. roku sledovania (1 kg) v prvých dvoch týždňoch po prechode na pašu. Úroveň prikrmovania zvierat v ďalšom priebehu pasienkovej sezóny po obidva sledované roky bola 2 kg tvarovaného krmiva na deň. Priemerné zloženie tvarovaného krmiva bolo: krmná slama 50 %, jačmenný šrot 30 %, otruby pšeničné 10 %, melasa 8 %, MKP-3 2 %.

Krv sme odoberali punkciou z *vena jugularis* stále od tých istých šiestich býčkov. V 1. roku sledovania sme uskutočnili odber týždne pred vyhnatím na pašu a v 2. roku sledovania dva razy v týždňových intervaloch pred pašou. Na paši sme odoberali biologický materiál v týždňových intervaloch od 1. po 5. týždne (máj – I. cyklus, jún – II. cyklus), potom v 10. týždni (júl – III. cyklus) a v 14. týždni (august – IV. cyklus). Odbery sme uskutočnili medzi 3. a 4. hodinou po nakŕmení býčkov v maštali a v tú istú dobu aj na paši po započatí príjmu paše. Sérový vápnik, horčík, sodík a draslík sme stanovili atómovou absorpčnou spektrálnou fotometriou (AAS 1). Anorganický fosfor v sére bol stanovený metódou podľa autorov Hořejší a Slavík (1953). Výsledky sú aritmetickým priemerom  $\pm$  SD a pre štatistické vyhodnotenie sme použili Studentov *t*-test.

## VÝSLEDKY

Hladina vápnika v krvnom sére výkrmových býčkov (obr. 1) po prechode z maštaľného krmenia na pašu poklesla, pričom tento pokles bol v 2. roku sledovania signifikantný ( $P < 0,05$ ). Po tomto období nastal v oboch sledovaných rokoch vzostup sérového vápnika. Pri priemernom hodnotení koncentrácie vápnika za dva sledované roky v jednotlivých cykloch pasienia (tab. III) sme zaznamenali v II. a III. cykle signifikantne nižšie hodnoty ( $P < 0,05$ ; 2,11 a 2,18 mmol/l) oproti hodnotám v období maštaľného krmenia (2,39 mmol/l).

Hodnoty anorganického fosforu v sére výkrmových býčkov (obr. 2) po prechode na pašu poklesli, avšak postupný vzostup hodnôt sme zaznamenali v 1. roku sledovania v 4. týždni a v 2. roku v 5. týždni pasienia. Tieto zmeny neboli štatisticky významné. Priemerné hodnoty anorganického fosforu za dva roky sledovania (tab. III) boli veľmi vyrovnané a pohybovali sa v rozpätí od 2,00 do 2,07 mmol/l.

Hladiny sérového horčíka u výkrmových býčkov (obr. 3) po prechode z maštaľného krmenia na pašu štatisticky významne ( $P < 0,05$ ) poklesli v 1. roku sledovania v 3. týždni a v 2. roku v 4. týždni pasienia. V ďalšom období pasienia došlo po oboch sledovaných rokoch k miernemu vzostupu hladín horčíka s následným poklesom ku koncu sledovaného obdobia. Priemerné hodnoty horčíka v sére výkrmových býčkov za dva roky sledovania (tab. III) boli v IV. cykle pasienia

(0,73 mmol/l) signifikantne nižšie ( $P < 0,05$ ) oproti hodnotám v období maštaľného krmenia (0,86 mmol/l).

Hodnoty sodíka v sére výkrmových býčkov (obr. 4) po prechode z maštaľného krmenia na pašu signifikantne klesli ( $P < 0,05$ ) v oboch sledovaných rokoch. V treťom týždni po prechode došlo k vysoko signifikantnému ( $P < 0,01$ ) poklesu sérového sodíka v oboch sledovaných rokoch. V ďalšom období pasienia sa stabilizovala koncentrácia sodíka v sére a v druhej polovici pasienkového obdobia došlo k postupnému znižovaniu hladín sodíka. Priemerné hodnoty sérového sodíka za dva roky sledovania (tab. III) boli v I. cykle pasienia (135,42 mmol/l) signifikantne nižšie ( $P < 0,01$ ), v II. cykle (130,52 mmol/l) vysoko signifikantne nižšie ( $P < 0,001$ ) oproti hodnotám v období maštaľného krmenia (144,80 mmol/l).

Koncentrácia draslíka v krvnom sére výkrmových býčkov po prechode z maštaľného krmenia na pašu (obr. 5) zaznamenala v oboch sledovaných rokoch vzostup, ktorý bol v 2. týždni štatisticky významný ( $P < 0,05$ ). V ďalšom období hladiny sérového draslíka stúpali a najvyšších hodnôt dosiahli v 1. roku sledovania v 10. týždni a v 2. roku v 5. týždni pasienia, čo bolo

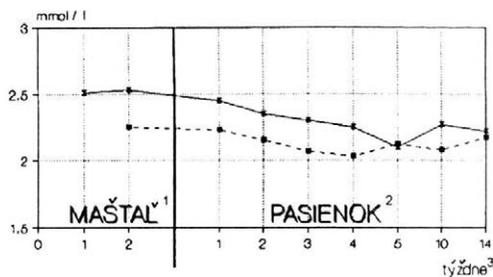
III. Priemerné hodnoty minerálnych látok v krvnom sére býčkov v jednotlivých cykloch pasienia za dva roky sledovania – Average values of minerals in the blood serum of bullocks in the particular grazing cycles over the two years of observation

Biochemické ukazatele <sup>1</sup> (mmol/l)	Maštaľné krmenie <sup>2</sup>	Cyklus paše <sup>3</sup>			
		I.	II.	III.	IV.
Ca $\bar{x}$	2,39	2,25	2,11	2,20	–
SD	0,18	0,13	0,12	0,16	–
a	–	–	$P < 0,05$	$P < 0,05$	–
b	–	–	–	–	–
P $\bar{x}$	2,07	2,04	2,00	2,07	2,04
SD	0,15	0,18	0,13	0,15	0,12
a	–	–	–	–	–
b	–	–	–	–	–
Mg $\bar{x}$	0,86	0,82	0,79	0,78	0,73
SD	0,08	0,11	0,08	0,10	0,07
a	–	–	–	–	$P < 0,05$
b	–	–	–	–	–
Na $\bar{x}$	144,80	135,42	130,52	134,17	135,85
SD	4,58	4,29	3,45	3,90	3,46
a	–	$P < 0,01$	$P < 0,01$	$P < 0,01$	$P < 0,01$
b	–	$P < 0,01$	–	–	–
K $\bar{x}$	4,41	4,77	5,08	5,06	4,92
SD	0,16	0,25	0,24	0,16	0,20
a	–	$P < 0,01$	$P < 0,01$	$P < 0,01$	$P < 0,01$
b	–	$P < 0,01$	–	–	–

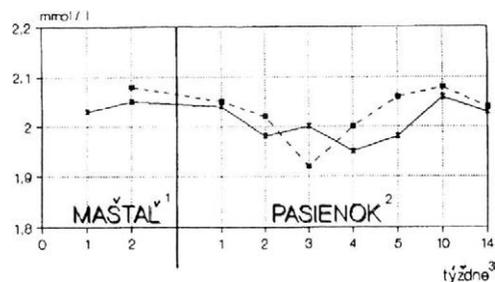
a – štatistická významnosť oproti východzej hodnote (odberu v maštali) – statistical significance against the initial value (of the blood collection in stable)

b – štatistická významnosť oproti predchádzajúcej hodnote – statistical significance against the preceding value

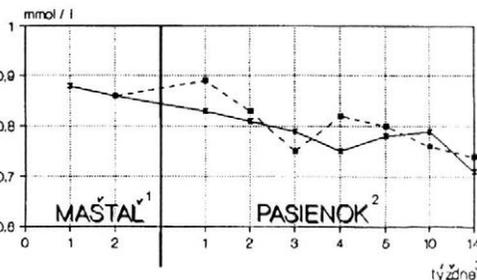
<sup>1</sup>biochemical parameters, <sup>2</sup>stable feeding, <sup>3</sup>grazing cycle



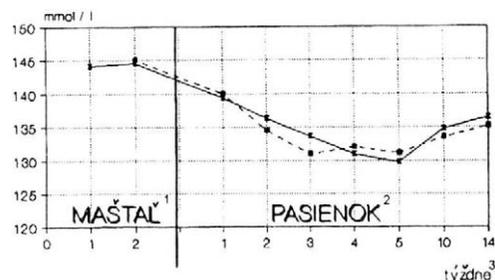
1. Dynamika obsahu vápníka v krvnom sére výkrmových býčkov – Dynamics of calcium content in the blood serum of beef bullocks



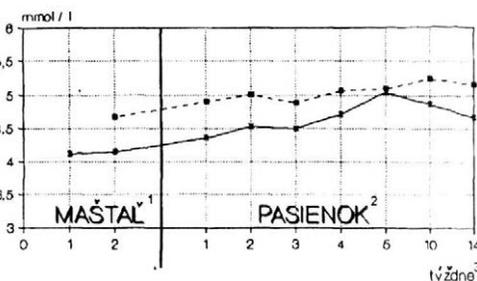
2. Dynamika obsahu anorganického fosforu v krvnom sére výkrmových býčkov – Dynamics of inorganic phosphorus content in the blood serum of beef bullocks



3. Dynamika obsahu horčíka v krvnom sére výkrmových býčkov – Dynamics of magnesium content in the blood serum of beef bullocks



4. Dynamika obsahu sodíka v krvnom sére výkrmových býčkov – Dynamics of sodium content in the blood serum of beef bullocks



5. Dynamika obsahu draslíka v krvnom sére výkrmových býčkov – Dynamics of potassium content in the blood serum of beef bullocks

Vysvetlivky pre obr. 1 až 5 – Explanatory notes to Figs. 1 to 5:  
 - - - prvý rok sledovania – first year of observation  
 — druhý rok sledovania – second year of observation

<sup>1</sup>stale, <sup>2</sup>pasture, <sup>3</sup>week

aj štatisticky významné ( $P < 0,01$ ). Priemerné hodnoty draslíka v sére býčkov za dva roky sledovania (tab. III) boli počas maštalného krmenia 4,41 mmol/l, čo bolo signifikantne nižšie ( $P < 0,05$ ) ako v priebehu I. cyklu pasenia (4,77 mmol/l). Počas ďalších cyklov pasenia hodnoty sérového draslíka štatisticky významne stúpali ( $P < 0,01$ ).

Priemerný denný prírastok u výkrmových býčkov počas pasienkovej sezóny bol v 1. roku sledovania 0,530 a v 2. roku 0,470 kg.

## DISKUSIA

Stanovenie koncentrácie mineráliev v krvi je súčasťou komplexu vyšetrovaní pre objektívne posúdenie úrovne

minerálneho metabolizmu. Metabolizmus vápníka, fosforu a horčíka vzájomne úzko súvisia a preto je vhodné ich metabolizmus hodnotiť spolu. Hladina vápníka v krvi je pomerne stála. Koncentrácia anorganického fosforu reaguje citlivejšie na zvýšený alebo znížený príjem krmiva. Obsah horčíka v krvi závisí od jeho prísunu v krmivách a jeho nedostatok v diete sa rýchlo odzrkadľuje na znížení obsahu horčíka v krvi a v moči (V r z g u l a, 1982).

Na základe dosiahnutých výsledkov v našich pokusoch možno konštatovať, že po prechode mladých býčkov na pašu došlo k poklesu hladín vápníka, anorganického fosforu a horčíka v krvnom sére u sledovaných zvierat. So zvyšujúcim sa obsahom sušiny v II., III. a IV. cykle pasenia sme zaznamenali mierny vzostup hodnôt sledovaných makroprvkov. Počas celej pasien-

kovej sezóny bol veľmi úzky pomer Ca : P a najužších hodnôt dosiahol v II. cykle pasenia 2,1 : 2,0. Zelený a i. (1990) sledovali úroveň minerálneho metabolizmu jalovic na paši a zistili v krvi vyššie hladiny anorganického fosforu ako vápnika. Na jar v období prechodu na mladé zelené krmivo a pašu dochádza k zvýšenému vyplavovaniu vápnika močom (Starý a Rolencová, 1982). Všeobecne sa za príčinu poklesu horčíka v krvi považuje náhly prechod z obvyklého krmenia na mladú jarnú trávu alebo náhly prechod na krmenie zeleným krmivom. Pasenie na mladej bujne tráve môže vyvolať hypomagneziémiu s manifestným syndrómom už za 5–10 dní. Za hlavnú príčinu sa pokladá vysoký obsah N-látok (až 25 % sušiny), nízky obsah hrubej vlákniny a veľmi nízky obsah sušiny v mladej tráve. Porasty majú vyšší obsah draslíka, fosforu a menej vápnika, sodíka a horčíka (Vrzgula, 1982).

Obsah sodíka a draslíka v krvi je stabilný a mení sa len pri vážnejšom porušení ich dotácie do organizmu zvierata. Georgievskij a i. (1982) uvádzajú, že mladý pasterýny porast obsahuje pomerne málo sodíka, ale prebytok draslíka. Táto skutočnosť sa potvrdila aj v našich pokusoch, v ktorých sme zaznamenali pokles sodíka a vzostup draslíka v krvnom sére býčkov po prechode na pašu. Postupný nárast hladín sérového sodíka nastal až v III. a IV. cykle pasenia spolu so zvyšujúcim sa obsahom sušiny v pasterýnom poraste. Podľa Jambora (1986) pri nedoplnení krmnej dávky na paši dostatočným množstvom sodíka k neutralizácii nadbytočného množstva draslíka dochádza k acidózam, lebo nadbytok draslíka znemožňuje vylučovanie sodíka v obličkách pri vysoko alkalickom moči.

Pri konfrontácii našich výsledkov s referenčnými hodnotami pre mladý dobytok, ktoré uvádzajú Slanina a i. (1992), boli hodnoty sérového vápnika a sodíka mladých výkrmových býčkov nižšie počas pasienkovej sezóny.

Na základe našich výsledkov možno konštatovať, že v období prechodu zo zimnej krmnej dávky na pašu dochádza k poklesu vápnika, horčíka a sodíka a k vzostupu draslíka v krvnom sére mladých výkrmových býčkov. K úprave sledovaných parametrov minerálneho metabolizmu došlo v III. a IV. cykle pasenia.

## LITERATÚRA

BRUGÈRE-PICOUX, J. – BRUGÈRE, H.: Particularités de la biochimie clinique des ruminants. Détermination de valeurs normales usuelles des enzymes sériques. *Recu. Méd. Vétér.*, 163, 1987: 1043–1053.

GEORGIEVSKIJ, V. I. – ANNENKOV, B. N. – SAMOCHIN, V. T.: Minerálna výživa zvierat. Bratislava, Príroda 1982.

HOŘEJŠÍ, J. – SLAVÍK, K.: Základy chemického vyšetřování v lékařství. Praha, SZN 1953.

INGRAHAM, R. H. – KAPPEL, L. C.: Metabolic profile testing. *Veter. Clin. Amer.: Food Anim. Pract.*, 4, 1988: 391–411.

JAMBOR, V.: Podmínky správné výživy při pasterýním odchovu jalovic. *Veterinářství*, 36, 1986: 162–164.

LOTTHAMMER, K. H. – BOEHNKE, H. J. – KORAWIETZ, M.: Beziehungen zwischen verschiedenen Blutparametern als Kriterien für Stoffwechselstörungen und dem Milchzellgehalt bei Milchrindern. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 95, 1988: 379–384.

RICO, A. G. – BRAUN, J. P.: Interprétation des examens de laboratoire. *Recu. Méd. Vétér.*, 163, 1987: 696–971.

SLANINA, Ľ. a kol.: Metabolický profil hovädzieho dobytko vo vzťahu k zdraviu a produkcii. Bratislava, ŠVS SR 1992.

STARÝ, Z. – ROLENCOVÁ, M.: Změny metabolických ukazatelů u skotu v průběhu ročního období. *Veter. Med. (Praha)*, 27, 1982: 531–540.

VRZGULA, L. a kol.: Poruchy látkového metabolizmu hospodárskych zvierat a ich prevencia. Bratislava, Príroda 1982.

ZELENÝ, J. – KROUPOVÁ, V. – BRUNER, M.: Metabolická rizika pastvy jalovic. *Veterinářství*, 40, 1990: 295–298.

ŽITŇAN, R.: Study of rumen fermentation and selected biochemical parameters in blood plasma of bullocks changing over to pasture feeding. *Folia Vet.*, 34, 1990: 175–183.

ŽITŇAN, R.: Ruminal fermentation in feedlot cattle during transition to pasture feeding. *J. Anim. Sci.*, 71, Suppl. 1, 1993: 184 s.

ŽITŇAN, R. – GALLO, J. – BOMBA, A. – GALLO, M. – SOMMER, A.: Úroveň bacherovej fermentácie výkrmového dobytko v období prechodu zo zimného krmenia na pašu a v ďalších cykloch pasenia. *Živoč. Výr.*, 38, 1993a: 705–714.

ŽITŇAN, R. – GALLO, J. – GALLO, M. – BOMBA, A. – SOMMER, A.: Vybrané biochemické ukazovatele dusíkového a energetického metabolizmu v plazme a krvi výkrmových býčkov v období prechodu na pašu. *Vet. Med. – Czech*, 38, 1993b: 521–529.

ŽITŇAN, R. – SOMMER, A. – GALLO, J. – LAUKOVÁ, A. – BOMBA, A. – VENGLOVSKÝ, J.: Volatile fatty acid concentrations, enzyme activities and microflora in the rumen contents of heifers during transition to pasture. *Arch. Anim. Nutr.*, 46, 1994: 51–60.

Došlo 9. 5. 1994

## Kontaktná adresa:

MVDr. Rudolf Žitňan, CSc., Výskumný ústav živočíšnej výroby Nitra, Regionálna stanica Košice, Krmanova 1, 040 01 Košice, Slovenská republika  
Tel. 095/361 92, fax 095/622 48 45

## Upozornění pro autory vědeckých časopisů

Z důvodu rychlejšího a kvalitnějšího zpracování grafických příloh (grafů, schémat apod.) příspěvků zasílaných do redakce Vás žádáme o jejich dodání kromě tištěné formy i na disketách.

Týká se to samozřejmě těch grafických příloh, které byly vytvořeny v nějakém programu PC (např. CorelCHART, Quatro Pro, Lotus 1-2-3, MS Excel). Vzhledem k tomu, že nejsme schopni upravit a použít pro tisk všechny typy (formáty) grafických souborů, žádáme Vás, abyste nám také kromě originálních souborů (např. z MS Excel typ \*.XLS) zaslali grafické předlohy vyexportované jako bodovou grafiku v jednom z těchto formátů:

Bitmap	*.BMP
Encapsulated Postscript	*.EPS
Graphic Interchange Format	*.GIF
Mac paint	*.MAC
MS Paint	*.MSP
Adobe Photoshop	*.PSD
Scitex	*.SCT
Targa	*.TGA
Tag Image File Format	*.TIF

*Redakce časopisu*

# INCIDENCE OF ALLERGIC REACTIONS IN SMALL FLOCKS OF FOWL AND PATHOGENESIS OF AVIAN MYCOBACTERIOSIS IN THE DOMESTIC FOWL

## VÝSKYT ALERGICKÝCH REAKCÍ V MALOCHOVECH DRŮBEŽE A PATOGENEZE AVIÁRNÍ MYKOBACTERIÓZY KURA DOMÁCÍHO

K. Hejlíček, F. Tremml, L. Černý

*University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic*

**ABSTRACT:** Incidence of allergic reactions to avian tuberculin was investigated in 12,549 birds of the domestic fowl in the territory of one district, in 16 villages and in 721 small flocks. The reactions were found in 7.3% of birds and 35.5% flocks were infected. The zero reactions to tuberculin were observed only in one village out of the 16 villages investigated. Experimental infection confirmed high susceptibility of the domestic fowl to *M. avium*. After intramuscular implantation of *M. avium* suspension allergy to avian tuberculin was observed within a fortnight while within the same period histological lesions were found in muscle at the spot of puncture, in liver and spleen. Macroscopic lesions at the spot of puncture and in liver appeared in 21 days, and miliary tuberculosis of liver and spleen was detected almost regularly since day 28. Cultivation demonstrated mycobacteria in all the organs and tissues examined except the intestine in 12 days after infection. After peroral infection tuberculin allergy was observed in 106 days. Histological lesions were found in spleen in 49 days, as well as in liver, lungs and intestines in 96 days. Macroscopic lesions occurred in liver, spleen, lungs and intestine in 106 days. Small numbers of mycobacteria were isolated from various organs and tissues in 36 days after infection, and also from the intestine in 160 days. After infection by contacts with the tuberculous fowl tuberculin allergy appeared in 157 days. The first tuberculous lesions appeared in liver in 106 days, in spleen and intestine in 180 days. Cultivation demonstrated small numbers of mycobacteria in liver, spleen, lungs and kidneys in 37 and/or 48 days after infection. Mycobacteria were found in the intestine in 180 days.

domestic fowl; avian mycobacteriosis; tuberculinization; pathogenesis

**ABSTRAKT:** Na území jednoho okresu, v 16 obcích a v 721 malých chovech, byl sledován výskyt alergických reakcí na aviární tuberkulin u 12 549 jedinců kura domácího. Reagovalo 7,3 % ptáků a infikováno bylo 35,5 % chovů. Z 16 obcí pouze v jedné nebyli nalezeni reagenti na tuberkulin. Experimentálními infekcemi byla potvrzena vysoká vnímavost kura domácího k *M. avium*. Po intramuskulární infekci suspenzí *M. avium* vznikla alergie na aviární tuberkulin již za 14 dnů, za stejnou dobu byly zjištěny i histologické změny ve svalovině v místě vpichu, v játrech a slezině. Makroskopické změny v místě vpichu a v játrech vznikly po 21 dnech a od 28. dne byla téměř pravidelně nalézána miliární tuberkulóza jater a sleziny. Kultivací byly prokazovány mykobakterie již 12 dnů po infekci ve všech vyšetřovaných orgánech a tkáních mimo střevo. Po perorální infekci byla zjištěna tuberkulinová alergie za 106 dnů. Histologické změny byly nalezeny za 49 dnů ve slezině, za 96 dnů i v játrech, plicích a střevě. Makroskopické změny byly pozorovány po 106 dnech v játrech, slezině, plicích a ve střevě. Mykobakterie byly izolovány v malých počtech již za 36 dnů po infekci z různých orgánů a tkání, po 160 dnech i ze střeva. Po infekci kontaktem s tuberkulózním kurem se objevila tuberkulinová alergie za 157 dnů. Prvé tuberkulózní změny vznikly v játrech za 106 dnů, ve slezině a střevu po 180 dnech. Kultivací byly prokázány mykobakterie v malých množstvích z jater, sleziny, plic a ledvin již za 37, resp. 48 dnů po infekci. Ve střevě byly zjištěny mykobakterie po 180 dnech.

kur domácí; aviární mykobakteriáza; tuberkulinace; patogeneze

### ÚVOD

Výskyt tuberkulózy kura domácího (dále jen kur) je dlouhodobě zaznamenáván na území celé Evropy, i když v jednotlivých státech s různou intenzitou. Zejména častý výskyt byl zjišťován na území nynější SRN. Tak Herter (1951) zjistil až 21,4 % tuberkulózních nálezů u kura z malých chovů. Naproti tomu De die

a Schoene (1971) našli u jedinců z intenzivních chovů tuberkulózní procesy pouze v 0,01 %. Vysoké procento infikovaných ptáků bylo nalezeno v malochovech i tuberkulinovými testy. Pröschold (1921) prokázal 21,0 % reagentů. Nasal (1962) však v podnicích zabývajících se chovem kura domácího zjistil pouze 0,6 % ptáků s tuberkulinovou alergií. S vysokým procentem výskytu alergických reakcí je

spojen i značný počet zamořených malých chovů. Tak Schliesser a Berger (1962) našli 81,0 % malých chovů s výskytem tuberkulinových reakcí u chovaného kura. V některých evropských státech se však tuberkulóza kura domácího vyskytuje velmi zřídka, např. ve Švýcarsku (Büchli, 1964), v Portugalsku (Ferreira, 1936), ale i v Itálii (Acone aj., 1972).

V ČR našli Hökl a Prokůpek (1943) při vyšetření 2 167 jedinců kura domácího 8,3 % reagentů na tuberkulin. V malých soukromých chovech drůbeže našel Laciňa (1973) 1,2 % reagentů, kteří se vyskytovali v 15,1 % chovů, Pavlas a Rossi (1975) 4,3 % reagentů a 21,6 % infikovaných chovů. Kulíšek (1975) prokázal v malých chovech kura na Znojemsku 6,6 % ptáků s tuberkulinovou alergií.

Přehled o současné epizootologické situaci v tuberkulóze kura domácího v ČR je pouze částečný. Podle Surveillance antropozoonóz v ČR z roku 1989 nebyly v více než 88 milionů poražených drůbeže zjištěny tuberkulózní změny. Jednalo se však vesměs o drůbež z velkochovů. Tuberkulinovými reakcemi však bylo v tomto období zjištěno 1,13 % reagentů. V roce 1992 bylo prokázáno 0,92 % a v roce 1993 pak 0,51 % reagujícího kura. Zde se zřejmě již uplatnila častější tuberkulinace v malých chovech, jako součást zdravotních zkoušek při udělování licencí na prodej vajec.

Jak je patrné, pro výskyt a rozšíření tuberkulózy kura domácího je velmi důležitý způsob chovu. Častý výskyt onemocnění se eviduje především v malých chovech s nízkým stupněm hygieny a zejména chovem starší drůbeže, která bývá častěji infikována a u níž se vyskytují pokročilé formy onemocnění. Tak např. Al-lam (1965) našel u jedinců do jednoho roku věku 0,6 % reagentů, ve věku 1–2 roky 5,8 % reagentů a nad dva roky 12,5 % reagentů. Podobně Schliesser a Berger (1962) zjistili, že 52,2 % reagentů je starších dvou let, resp. 70 % starších tří let.

Kur domácí se infikuje *M. avium* výhradně perorální cestou. Tomu odpovídá i většinou autorů nejčastěji zjišťovaná lokalizace tuberkulózních procesů v játrech, slezině a ve stěně střešní (Reimann, 1889; Raymond, 1911; Eber, 1924; Craig, 1934; Dordević, 1961; Wojaczek-Steffke, 1964; Savejlev a Čebotarev, 1968; Metalib a Riddell, 1988). Primární afekt se tedy ve většině případů lokalizuje v zažívacím ústrojí. Eber a Pallaske-Eber (1934) uvádějí, že se jen ojediněle vyskytuje primární tuberkulóza plic. Wojaczek-Steffke (1964) však měla možnost prokázat primární plicní tuberkulózní změny u kura nejméně u 10 % pitvaných ptáků.

Patogeneze kura domácího byla studována různými způsoby experimentálních infekcí konaných řadou autorů. Jejich výsledky jsou však obtížně porovnatelné, protože byl použit různý infekční materiál, různé infekční dávky, kmeny s odlišnou virulencí i ptáci různého věku. Po intramuskulární infekci byl souhlasně zjišťován vznik generalizované tuberkulózy a úhyn za 80–192 dnů po infekci (de Jong, 1905; Cavriani

a Parmeggiani, 1959; Rossi, 1966). Po perorální infekci byl většinou pozorován vznik generalizované tuberkulózy s úhynem za 120–732 dnů jak uvádějí např. Beller a Henninger (1930), Dahmen a Abels (1934), Klimeš a Pavlas (1962). Histologické změny byly prokázány za 60 dnů, makroskopické změny v orgánech za 110–150 dnů (Dahmen a Abels, 1934; Ashour, 1972). Kontaktní infekce s tuberkulózním kurem nebo infikovaným prostředím vedla podle většiny autorů ke vzniku tuberkulózních změn pouze u 20 % ptáků a to teprve po delší době kontaktu, tj. 275–576 dnů (Dahmen a Abels, 1934; Schalk aj., 1935; Ščerban, 1966).

Cílem naší práce bylo poznání výskytu a rozšíření tuberkulózy kura domácího v malých chovech na větším územním celku a porovnání epizootologické situace v jednotlivých obcích. Dále pak v sérii pokusů po intramuskulární, perorální a kontaktní infekci zjistit nejkratší dobu vzniku alergických reakcí na tuberkulin, patologickomorfologických tuberkulózních procesů v jednotlivých orgánech a tkáních a přítomnost aviárních mykobakterií.

## MATERIÁL A METODY

V letech 1971–1973, kdy byly konány i jinými autory depistáže ke zjištění epizootologické situace v tuberkulóze kura domácího v malých chovech, jsme vyšetřili intradermálně tuberkulinaci v 16 obcích okresu Strakonice 12 549 jedinců kura chovaného v 721 malých chovech.

V sérii 11 pokusů jsme infikovali různým způsobem 159 tuberkulin negativních jedinců kura domácího ve věku pěti měsíců. V první části jsme infikovali 60 ptáků intramuskulárně (*i. m.*) suspenzí *M. avium* (1 mg/kg ž. h.). Ve druhé části jsme infikovali rovněž 60 jedinců perorálně (*p. o.*) krmivem, kontaminovaným v poměru 9 : 1 tuberkulózně změněnými játry kura domácího. Kontaminované krmivo bylo podáváno po dobu sedmi dnů. Z jater byly izolovány mykobakterie typizované jako *M. avium* sérotyp 2. Ve třetí části jsme infikovali 39 ptáků kontaktem ve společné voliérce se spontánně infikovaným kurem. Ptáci, kteří byli zdrojem infekce, pocházeli z tuberkulózního chovu drůbeže, reagovali na tuberkulin a někteří z nich měli i klinické příznaky onemocnění. Po skončení pokusu byli nemocní ptáci utraceni a z orgánů izolovány kmeny mykobakterií (*M. avium* sérotyp 2).

Tuberkulinaci kura jak ve vyšetřovaných malých chovech, tak i při experimentálních infekcích jsme prováděli a posuzovali podle platných směrnic s použitím aviárního tuberkulinu vyráběného Biovetou Ivanovice na Hané. Tuberkulinace byla pravidelně prováděna v šestitýdenních intervalech a vždy tři dny před plánovaným usmrcením skupiny experimentálně infikovaných jedinců.

Experimentálně infikovaní jedinci, pokud dříve neuhynuli, byli usmrceni po částech a sice po *i. m.* infekci

za 12–70 dnů, po infekci kontaminovaným krmivem za 36–220 dnů a po kontaktu s tuberkulózním kurem za 157–380 dnů.

Po usmrcení byli ptáci vyšetřeni patologickoanatomicky, jejich tkáňe a orgány kultivačně a histologicky. Kultivováno bylo na tři pevné půdy podle Petragranioho a dvě sérové půdy pro kultivaci mykobakterií. Kultivaci předcházela preparace suspendované tkáňe 10% kyselínou sírovou po dobu 20 min. s následnou neutralizací 8% louhem sodným. Po dvou měsících inkubace v termostatu při teplotě 37 °C byla kultivace ukončena. Izolované kmeny mykobakterií byly dále určeny biochemicky a sérologicky (IHE Praha). Histologické řezy byly barveny hematoxilin–cozinem na průkaz specifické granulární tkáňe a Ziehl–Neelsenem na průkaz mykobakterií.

## VÝSLEDKY

Jak je patrné z tab. I, pouze v jedné obci z 16 při tuberkulinaci 258 jedinců kura domácího v 21 malých chovech nebyli zjištěni reagenti. V ostatních 15 obcích počet reagujících ptáků i zamořených chovů značně kolísal, tj. od 1,5 do 14,2 %, resp. od 8,8 do 64,1 %. Z 12 549 tuberkulinovaných jedinců 7,3 % reagovalo na tuberkulin a ze 721 vyšetřených chovů byl v 35,6 % chován kur domácí infikovaný tuberkulózou.

U experimentálně infikovaného kura se vyvinula tuberkulinová alergie nejrychleji, již za 14 dnů, po *i. m.* infekci. Po infekci kontaminovaným krmivem za 106 dnů a po nejčastějším způsobu infekce – kontaktu s přirozeně infikovaným kurem za 157 dnů.

Po *i. m.* infekci (obr. 1) vznikly u kura histologické změny ve svalu v místě vpichu, v játrech a ve slezině po 14 dnech, izolované makroskopické změny v místě vpichu a v játrech po 21 dnech a od 28. dne po infekci byla téměř pravidelně nalézána miliární tuberkulóza jater a sleziny. Jen ojedinělý byl nálezn histologických změn v plicích, příp. v ledvinách. Kultivací byly prokazovány mykobakterie již 12 dnů po infekci ze všech vyšetřovaných orgánů a tkání mimo střeva.

Po *p. o.* infekci (obr. 2) kontaminovaným krmivem byly první histologické změny nalezeny za 49 dnů ve slezině, za 96 dnů i v játrech, plicích a ve střevě. Makroskopické změny byly pozorovány po 106 dnech v játrech, slezině, plicích a ve střevě. Mykobakterie byly izolovány v malých počtech již po 36 dnech z různých orgánů a tkání, po 160 dnech i ze střeva.

Po infekci kontaktem s tuberkulózním kurem (obr. 3) vznikly první tuberkulózní změny v játrech za 106 dnů, ve slezině a střevě po 180 dnech. Kultivací byly prokázány malé počty bakterií (slabý porost na kultivační půdě) z jater, sleziny, plic a ledvin již za 37 resp. 48 dnů. Ve střevě byly prokázány mykobakterie po 180 dnech.

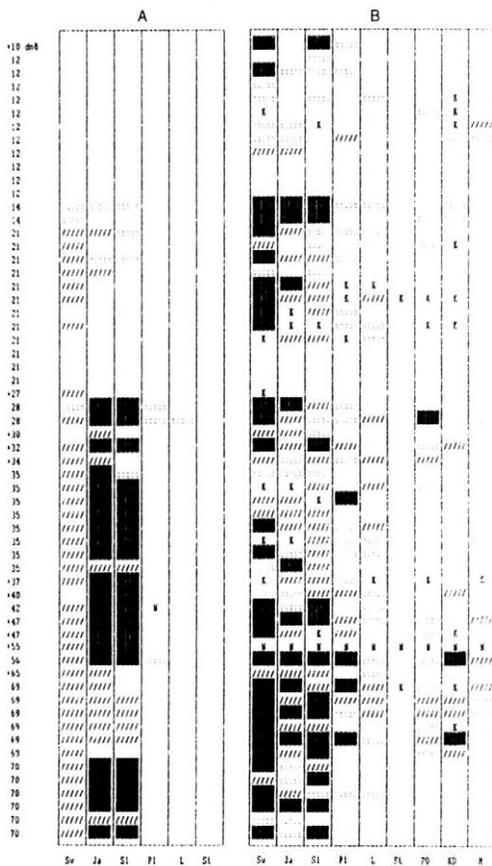
## DISKUSE

Tuberkulóza kura domácího je dlouho známým onemocněním a je považována za klasickou nákazu. Po zavedení velkochovů s jednoletou obměnou hejna a vysokým stupněm hygieny se výskyt tuberkulózy omezil téměř výhradně na malé soukromé chovy. Tam jsou v často nehygienických podmínkách chováni starší, ně-

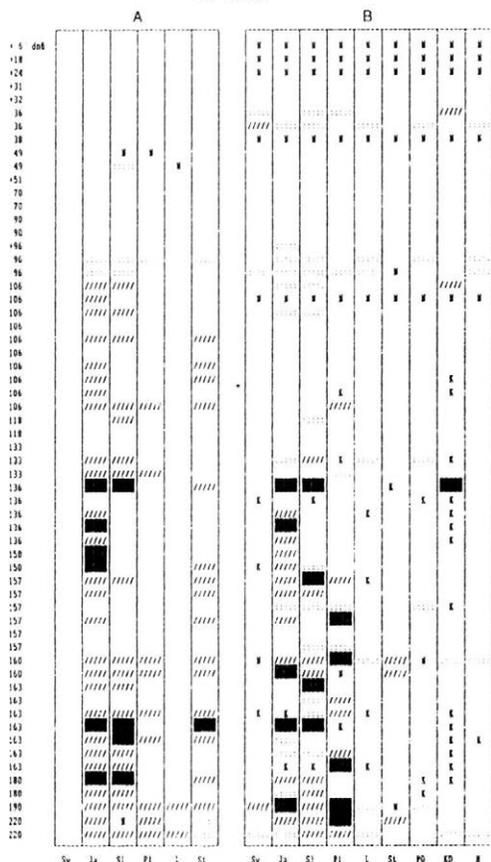
I. Výskyt reagentů na aviární tuberkulin u kura domácího v malých chovech jednoho okresu – Incidence of reactions to avian tuberculin in the domestic fowl in small flocks of one district

Obec <sup>1</sup>	Vyšetřeno celkem kusů <sup>2</sup>	Z toho tbc reagentů <sup>3</sup>	(%)	Počet vyšetřených chovů <sup>4</sup>	Zamořeno chovů <sup>5</sup>	(%)
J.	258	–	–	21	–	–
Hl.	226	6	2,6	34	3	8,8
Št.	1 631	26	1,5	86	8	9,3
Os.	192	3	1,5	31	3	9,6
Vý.	381	11	2,8	18	3	16,6
V.T.	572	24	4,2	39	7	17,9
Ho.	423	16	3,7	18	4	22,2
Či.	776	30	3,8	46	13	28,2
Li.	1957	158	7,8	84	30	35,7
P.	1 135	77	6,8	56	23	41,1
M.	305	31	10,1	14	6	42,8
N.	543	47	8,6	24	12	50,0
V.	1 041	84	8,0	62	32	51,6
Šk.	696	99	14,2	44	24	54,5
K.	683	72	10,5	38	21	55,2
S.	1 730	242	14,0	106	68	64,1
Celkem <sup>6</sup>	12 549	921	7,3	721	257	35,6

<sup>1</sup>village, <sup>2</sup>total number of birds examined, <sup>3</sup>of that tbc reactions, <sup>4</sup>number of flocks examined, <sup>5</sup>flock infestation, <sup>6</sup>in total



1. Výsledky patologickoanatomického, histologického a kultivačního vyšetření kura domácího, infikovaného intramuskulárně suspenzí *M. avium* (1 mg/kg ž. h.) – The results of patho-anatomic, histological and cultivation examination of the domestic fowl infected intramuscularly with *M. avium* suspension (1 mg/kg l.w.)



2. Výsledky patologickoanatomického, histologického a kultivačního vyšetření kura domácího, infikovaného perorálně krmivem kontaminovaným játry tbc změně (9 dílů krmiva a 1 díl jater) – The results of patho-anatomic, histological and cultivation examination of the domestic fowl infected perorally with feed contaminated with the liver of TBC fowl (9 portions of feed and one portion of liver)

Vysvětlivky k obr. 1 až 3 – Explanations for Figs. 1 to 3:

A	
□	beze změn – without changes
	histologické změny – histological changes
////	izolované tbc změny – isolated tuberculous changes
■	miliární tbc – miliary tuberculosis
N	nevyšetřeno – unexamined
↓	úhyn – mortality

B	
□	negativní – negative
	do 20 kolonií – up to 20 colonies
////	nad 20 kolonií – above 20 colonies
■	souvislý porost – continuous stand
N	nevyšetřeno – unexamined
K	kontaminace – contamination

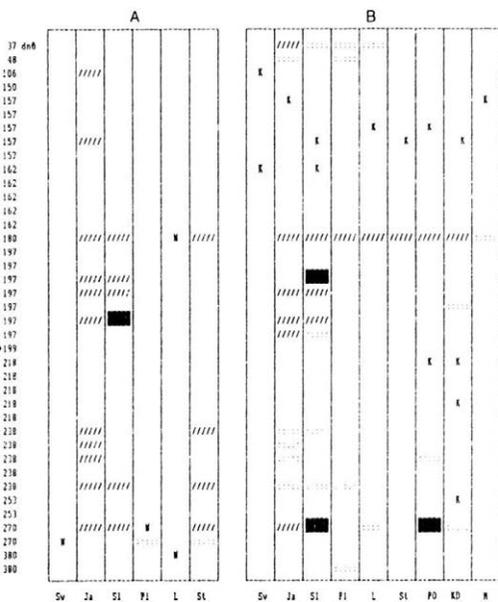
Sv = sval – muscle  
 Ja = játra – liver  
 SI = slezina – spleen  
 Pl = plíce – lungs  
 L = ledviny – kidneys  
 St = střevo – intestine  
 PO = pohlavní orgány – sexual organs  
 KD = kostní dřeň – bone marrow  
 M = mozek – brain

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

B = kultivační vyšetření – cultivation examination

dnů – days, kur domácí – domestic fowl

## Kur domácí



3. Výsledky patologickoanatomického, histologického a kulturačního vyšetření kura domácího, infikovaného kontaktem s the kurem – The results of patho-anatomic, histological and cultivation examination of the domestic fowl infected by a contact with TBC fowl

kdy i víceletí jedinci. Vysoké procento zamoření malých chovů kura domácího v ČR prokázali mimo nás i Lacina (1973), Pavlas a Rossi (1975) a Kulíšek (1975). Výsledky našich vyšetření – 7,3 % reagentů a 35,6 % zamořených chovů – se nejvíce blíží zjištěním Kulíška (1975) na Znojemsku či ještě více dřívějším nálezům Hökla a Prokůpka (1943). Různá frekvence výskytu reagentů i zamořených chovů, které jsme zjistili v 16 obcích na území jednoho okresu, ukazuje na značné místní epizootologické rozdíly dané pravděpodobně dlouholetým vývojem nálezové situace. Tomu nasvědčuje i skutečnost, že procento reagentů v obci ne vždy koreluje s procentem zamořených chovů. Jsou tedy v některých obcích většinou chovy s ojedinělým výskytem reagentů, v jiných je možno nalézt relativně menší počet zamořených chovů, ale s vyšším procentem reagujících ptáků. Lze se tedy domnívat, že nálezová situace v tuberkulóze drůbeže zůstává dlouhodobě stejná pokud není nákaza systematicky ovlivňována účinným postupem tlumení. V našich poměrech však zatím nebyla plošnému tlumení tuberkulózy drůbeže v malých chovech věnována pozornost.

Experimentální infekce potvrdily vysokou vnímavost kura domácího k infekci *M. avium*. Po *i. m.* infekci byla téměř u všech ptáků od 28. dne nalézána miliární tuberkulóza jater a sleziny. To zcela odpovídá výsledkům autorů Rossi (1966), Pavlas a Patloková (1977) a dalších. Po perorální infekci, podobně jako Beller a Henninger (1930), Dahmen

a Abels (1934), Klimeš a Pavlas (1962) jsme měli možnost pozorovat vznik generalizované tuberkulózy po 106, resp. 120 dnech. Histologické a makroskopické tuberkulózní změny pak o něco dříve než Dahmen a Abels (1934) a Ashour (1972), tj. za 49 oproti 60 dnům, resp. za 106 oproti 110–150 dnům. Závažný je však výskyt tuberkulózních změn po 106 dnech ve stěvě. To svědčí pro značnou afinitu *M. avium* k zažívacímu ústrojí kura domácího a současně ukazuje na značné riziko vylučování mykobakterií u perorálně infikovaných ptáků. To jsme konečně mohli potvrdit i kulturačním průkazem mykobakterií ze střeva za 160 dnů po infekci. Zajímavý je průkaz mykobakterií z různých tkání a orgánů již za 36 dnů od začátku pokusu. Svědčí to pro poměrně rychle nastupující bakteriemi, po ní až za delší dobu vzniknou makroskopické tuberkulózní změny. Po infekci kontaktem s tuberkulózním kurem jsme měli možnost prokázat tuberkulózní změny dříve, tj. za 106, resp. 157 dnů, než popisují Dahmen a Abels (1934), Schalk aj. (1935) a Šerban (1966). Vysvětlení lze hledat v tom, že v našem pokusu tuberkulózní a zdraví jedinci se nacházeli společně v omezeném prostoru voliery. Podobně však i v našich kontaktních pokusech se infikovalo, tj. vznikly patologickomorfologické změny nebo byly izolovány mykobakterie v době od 106. do 380. dne po infekci pouze u 12 ptáků ze 37, tj. v 32,4 %. I při kontaktní infekci se projevila výrazná afinita *M. avium* ke stěně štvevní kura domácího.

Uvedené skutečnosti považujeme za velmi podstatné nejen pro poznání patogeny aviařní tuberkulózy kura domácího, ale i z pohledu diagnostických možností nákazy, když nejdříve lze mykobakteriální infekci diagnostikovat kultivací a v dalším pořadí pak histologicky, alergicky a patologickoanatomicky. Jako velmi nebezpečná se jeví perorální infekce tuberkulózně změněnými tkáněmi, k níž může dojít např. při kanibalismu kura domácího.

## LITERATURA

- ACONE, P. – IZZI, R. – GUACINO, C. – URSO, C.: Sulla tuberculosi aviare - studio batteriologico di alouini focolai in campania. *Zooprofilassi*, 27, 1972: 73–81.
- ALLAM, S. A. H.: Untersuchungen über das Vorkommen von Mykobakterien in Handelsieren und in Eiern tuberkulösen Hühnerbestände. [Disertace.] Giessen, 1965. 111 s.
- ASHOUR, N.: Contribution to the experimental infection of young chickens with *Mycobacterium avium*. *Acta Vet. (Brno)*, 41, 1972: 421–427.
- BELLER, K. – HENNINGER, E.: Die Empfänglichkeit des Huhnes für Tuberkulose unter normalen Haltungsbedingungen. *Arch. Gefügelkde*, 4, 1930: 453–462.
- BÜCHLI, W.: Untersuchungen über die Ausbreitung der Geflügeltuberkulose in der Ost- und Zentralschweiz und künstliche Übertragungsversuche des *Typhus gallinaceus* von Rinder der Braunviehrasse. *Schweizer Arch. Tierheilkde*, 106, 1964: 586–594.

- CAVRINI, V. – PARMEGGIANI, A.: Saggi sulla prova allergica e sulla prova di agglutinazione nella tubercolosi aviaria. *Vet. Ital.*, 10, 1959: 3–16.
- CRAIG, J. F.: Avian tuberculosis. *Vet. Rec.*, 1934: 54–56.
- DAHMEN, H. – ABELS, H.: Versuche zur Frage der Bekämpfung der Geflügeltuberkulose mit dem Friedman-Mittel. *Tierärztl. Rdsch.*, 40, 1934: 737–739.
- DEDIÉ, K. – SCHOENE, W.: Fragen der Tuberkulose und Mykobakterien nach Tilgung der Rindertuberkulose. *Tierärztl. Umsch.*, 26, 1971: 257–265.
- DORDEVIČ, M.: Statistička analiza učestalosti i lokalizacije nalaza tuberkuloze v parnote živine. *Vet. Glasn.*, 15, 1961: 395–399.
- EBER, A.: Die Tuberkulose des Hausgeflügel. *Zschr. Infektionskr.*, 25, 1924: 145–175. In: FELDMAN, W. H.: Avian tuberculosis infections. 1938: 233–245.
- EBER, A. – PALASKE-EBER, R.: Die durch Obduktion feststellbaren Geflügelkrankheiten. Hannover, Verlag von M. D. H. Schoper 1934. 132 s.
- FERREIRA, J.: Tuberculose aviária au Portuga. *Étudé bacteriologique de quelques cas. Arqs. Inst. Bact.*, Camara Pestana, 7, 1936: 181–196.
- HERTER, W.: Beitrag zur Statistik der Hühnerkrankheiten nebst einigen kritischen Beträchtungen. *Tierärztl. Umsch.*, 6, 1951: 22. In: SCHÖRMANN, J.: Untersuchungen über das Vorkommen des *M. avium* und anderer Mykobakterien im Kot von Hühnern. [Dissertace.] Berlin, 1967. 61 s.
- HÖKL, J. – PROKÚPEK, K.: O rozšířenosti tuberkulózy u malých zvířat (vepřů, psů a drůbeže) v hospodářstvih s infikovaným skotem a kozami v poměrech malozemědělských. *Zvěrolék. Obz.*, 36, 1943: 233–239.
- JONG de, D. A.: Rapports entre la tuberculose de l'homme, du gros bétail, de la volaille, et d'autres animaux domestiques (notamment du chein). In: Bericht über den 8. Internationalen tierärztl. Kongress, Budapest, 1905: 3–27.
- KLIMEŠ, B. – PAVLAS, M.: Příspěvek k experimentální infekci slepic tuberkulózou. *Sbor. Vys. Šk. Zem. (Brno)*, řada B., 9, 1962: 49–62.
- KULÍŠEK, L.: Tlumení ptačích tuberkulóz v soukromých chovech drůbeže v okrese Znojmo. *Veterinářství*, 25, 1975: 260.
- LACINA, J.: Výsledky depistáže tuberkulóz drůbeže v chovech soukromého sektoru. In: III. Czech Poultry Conference, 5th Annual Meeting of the Poultry Section Meeting of the Czech Veterinary Association, Nové Město n. Mor., May 24–25, 1973.
- METALIB, A. A. – RIDDELL, C.: Epizootology of avian tuberculosis in chickens in Saskatchewan. *Can. Vet. J.*, 29, 1988: 840–842.
- NASSAL, J.: Die Tuberkulose des Geflügels und ihre Bedeutung für Mensch und Tiere. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 13, 1962: 290. In: *Zbl. Vet.-Med.*, 10, 1963: 209–212.
- PAVLAS, M. – PATLOKOVÁ, V.: Effect of the size of inoculum and the mode of administration of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* on the results on bioassay on pullets. *Acta. Vet. (Brno)*, 46, 1977: 129–134.
- PAVLAS, M. – ROSSI, L.: Zkušnosti s ozdravováním malochovů drůbeže nakažených tuberkulózou. Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1975. 35 s.
- PRÖSCHOLD, T.: Die Bekämpfung der Geflügeltuberkulose unter Zuhilfenahme der Intrakutanimpfung zur Feststallung der tuberkulösen Tiere. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 1921: 553–556; 565–567.
- RAYMOND (1911): In: ZELLER, H.: Die Tuberkulose des Geflügels. *Erg. allg. Path. path. Anat. Mensch. Tiere*, 26, 1932: 804–876.
- REIMANN: Dresden. *Blätter f. Geflügelz.* 1885–1889. In: KLIMMER, M.: Die Uebertragung der Geflügeltuberkulose auf Menschen und das Vorkommen von Tuberkelbazillen in Hühnereiern. *Berl. Tierärztl. Wschr.*, 40, 1930: 702–709.
- ROSSI, L.: Výskyt *Mycobacterium avium* ve svalovině experimentálně a spontánně infikované drůbeže. *Veter. Med. (Praha)*, 11, 1966: 49–52.
- SAVELJEV, J. A. – ČEBOTAREV, A. N.: Veterino-sanitarnaja ocenka mjasa ptici pri tuberkuleze. *Trudy Vsesojuz. Nauč.-issled. Inst. Vet. Sanit., Moskva*, 30, 1968: 158–169.
- SCHALK, A. F. – RODERICK, L. M. – FOUST, H. C. – HARSHFIELD, G. S.: Avian tuberculosis, collected studies. *Tech. Bull. N. Dak. Agri. Exp. Sta.*, 279, 1935: 46.
- SCHLIESSER, T. – BERGER, W.: Vergleichende Untersuchungen mit der Frischblut-Schnellagglutination und der Tuberkulin-Kehllappenprobe bei Hühnern. *Mh. Tierheilkde*, 14, Rindertub. u. Brucelose, 1962: 91–98.
- ŠČERBAN, N. F.: K voprosu epizootologii tuberkuleza kur. *Sbor. Nauč. Trudov Donskogo sel'.-choz. Inst.*, 2, 1966. In: *Landwirtsch. Zbl.*, 13, 1968: 326.
- WOJACZEK–STEFFKE, E.: Über das Vorkommen von Lungentuberkulose beim Haushuhn. *Mh. Vet.-Med.*, 19, 1964: 427–429.
- Surveillance antropozoonóz v ČR 1989: 172–180.

Došlo 19. 5. 1994

**Kontaktní adresa:**

Doc. MVDr. František Trnml, CSc., Vysoká škola veterinární a farmaceutická, Palackého 1–3, 612 42 Brno, Česká republika  
Tel. 05/41 32 11 07, fax 05/41 21 12 41

# PREVALENCE OF ANTIBODIES TO *COXIELLA BURNETII* IN CATTLE, SHEEP AND SMALL GROUND MAMMALS IN THE REGION OF WESTERN BOHEMIA

## VÝSKYT PROTILÁTEK PROTI *COXIELLA BURNETII* U SKOTU, OVCÍ A DROBNÝCH ZEMNÍCH SAVCŮ V ZÁPADNÍCH ČECHÁCH

### I. Literák

*University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic*

**ABSTRACT:** The prevalence of antibodies to *C. burnetii* was studied in the Karlovy Vary district (the Czech Republic) between 1987 and 1989. Sera of cows, sheep and heart eluates of small ground mammals were tested using the complement fixation test with *C. burnetii* antigen in phase II (Bodibion, Mevak Nitra, Slovakia). Titers greater or equal to 8 or 10 were considered as positive. Cows from two large-scale farms were tested four times (the average number of every sampling was 339 cows). Their seroprevalences varied from 0.3 to 4.3% and from 0.3 to 10.6% on the first and second farm, respectively. The highest seroprevalences were on both farms in July, 1987. No clinical signs of Q-fever were observed in cows from these farms. In May, 1988, sera of 96 sheep from two farms were tested. No antibodies to *C. burnetii* were detected. A total of 488 small ground mammals from 9 various localities was tested. Antibodies were ascertained in one Common Vole (*Microtus arvalis*) at a titer of 10 and in one Bank Vole (*Clethrionomys glareolus*) at a titer of 2560. At present, some strains of *C. burnetii* occur in cattle and small ground mammals in the study area but these strains do not cause the clinical Q fever as they did in the same area at the beginning of the fifties.

*Coxiella burnetii*; antibodies; complement fixation test; cattle; sheep; small ground mammals

**ABSTRAKT:** V letech 1987–1989 byla na Karlovarsku v západních Čechách vyšetřována séra skotu, ovcí a srdeční výluhy drobných zemních savců k zjištění protilátek proti *C. burnetii*. K detekci protilátek byla použita komplementfixační reakce s antigenem fáze II (Bodibion, Mevak Nitra, Slovensko). Základní ředění séra bylo 1 : 8, příp. 1 : 10. Během sledované doby byly čtyřikrát vyšetřeny krávy ze dvou velkokapacitních kravínů (při jednom vyšetření průměrně 339 krav). Séroprevalence se pohybovala od 0,3 do 4,3 % v jednom kravíně a od 0,3 do 10,6 % v druhém kravíně. Nejvyšší séroprevalence byla v obou kravínech v srpnu 1987. U krav nebyly patrné příznaky onemocnění Q-horečkou. V květnu 1988 byla vyšetřena séra 96 ovcí ze dvou chovů, protilátky proti *C. burnetii* nebyly zjištěny. Z drobných zemních savců bylo vyšetřeno 488 jedinců z devíti různých lokalit. Protilátky byly prokázány u jednoho hraboše polního (*Microtus arvalis*) v titru 10 a u jednoho normfka rudého (*Clethrionomys glareolus*) v titru 2560. *C. burnetii* se v západních Čechách v současné době vyskytuje u skotu a některých drobných zemních savců, nezpůsobuje však manifestní klinická onemocnění jako v téže oblasti začátkem 50. let.

*Coxiella burnetii*; protilátky; komplementfixační reakce; skot; ovce; drobní zemní savci

### ÚVOD

Na území České republiky byla Q-horečka poprvé zjištěna v roce 1952 u zaměstnanců pražských jatek (Patočka a Kubelka, 1953). V letech 1952–1954 pak byla diagnostikována série epidemí Q-horečky u zemědělců na Karlovarsku (Raška aj., 1954; Řeháček, 1987). Zdrojem těchto infekcí byla nemocná domácí zvířata, především skot a ovce, která byla přemísťována v poválečném období. Od případů

v 50. letech nejsou z oblasti západních Čech zprávy o vyšetřování na Q-horečku. Z blízké oblasti jižních Čech jsou však opakovaně od konce 70. let publikovány práce o séroprevalenci protilátek proti *C. burnetii* u lidí, hospodářských zvířat a drobných zemních savců (Řeháček aj., 1977, 1984, 1987; Vošta aj., 1988, 1989; Lisák aj., 1989; Cempírková aj., 1993; Literák, 1994).

Cílem této práce je dokumentovat výskyt *C. burnetii* v oblasti, v níž byla naposled zjištěna před více než 30 lety.

## MATERIÁL A METODY

### SKOT

V letech 1987–1989 byly opakovaně sérologicky vyšetřovány dojnice ze dvou objektů živočišné výroby v obcích Albeřice a Bražec (okres Karlovy Vary). Dojnice byly vyšetřeny čtyřikrát. Byly ustájeny ve velkokapacitních stájích, během letního období byly vyháněny na pastvu.

### OVCE

V květnu 1988 bylo vyšetřeno 32 sér ovcí ze stáda v Lučině a 64 ze stáda v Novém Hlavákově (okres Karlovy Vary).

### DROBNÍ ZEMNÍ SAVCI

Drobní zemní savci byli odchytáváni v květnu, září a listopadu v letech 1987–1989. Byli odchytáváni do sklapovacích pastí během dvounoční expozice v terénu. Pasti byly kladeny ve 100 kusových liniích na devíti různých lokalitách v Doupovských horách (okres Karlovy Vary). Na protilátky proti *C. burnetii* byly vyšetřovány tzv. eluáty. Jako eluát byl označen výluh rozstříženého srdce v 1 ml pufrovaného fyziologického roztoku. S tímto eluátem se dále pracovalo jako se sérem v ředění 1 : 10. Celkem bylo vyšetřeno 488 drobných zemních savců.

### SÉROLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

K detekci protilátek byla použita komplementfixační reakce. Pracovalo se s antigenem ve fázi II (Bodibion, Mevak Nitra, Slovensko) a komplemtem Sevatest Toxoplasma komplement (SEVAC, Pra-

ha, Česká republika). Základní titr ředění séra byl 1 : 8, příp. 1 : 10.

## VÝSLEDKY

### SKOT

V obou velkokapacitních stájích byly zjištěny protilátky proti *C. burnetii*. Určitá séroprevalence byla zjištěna při každém ze čtyř odběrů. V Albeřicích se séroprevalence pohybovala od 0,3 do 4,3 %. V Bražci od 0,3 do 10,6 %. V obou stájích byla nejvyšší séroprevalence v červenci 1987, během dalších odběrů byla výrazně nižší (tab. I a II).

### OVCE

Výsledky vyšetření byly negativní.

### DROBNÍ ZEMNÍ SAVCI

Výsledky vyšetření drobných zemních savců jsou uvedeny v tab. III. Ze 488 eluátů různých druhů drobných zemních savců byly protilátky detekovány ve dvou případech. Protilátky byly zjištěny u jednoho hraboše polního (*Microtus arvalis*) ze 136 vyšetřených a u jednoho norníka rudého (*Clethrionomys glareolus*) ze 73 vyšetřených. Hraboš polní byl odchycen v Bražci a měl titr protilátek 10. Norník rudý byl odchycen u obce Javorná a měl titr protilátek 2560.

## DISKUSE

Nepřímo pomocí průkazu protilátek bylo prokázáno, že v západních Čechách – v oblasti, kde byla poprvé

I. Protilátky proti *C. burnetii* u krav ve velkokapacitním kravínu v Albeřicích – Antibodies to *C. burnetii* in cows kept on a large-scale farm at Albeřice

Datum <sup>1</sup>	Vyšetřeno <sup>2</sup>	Počet pozitivních <sup>3</sup>	Tit <sup>4</sup>	Procento pozitivních <sup>5</sup>
6. 7. 1987	346	15	8–256 ( $\bar{x}_g = 17,5$ )	4,3
8. 9. 1988	319	2	80, 160	0,6
16. 11. 1988	346	1	10	0,3
8. 2. 1989	345	4	≥10	1,2

$\bar{x}_g$  = průměrný geometrický titr – mean geometric titer

<sup>1</sup>date, <sup>2</sup>cows examined, <sup>3</sup>number of positive findings, <sup>4</sup>titer, <sup>5</sup>percentage of positive findings

II. Protilátky proti *C. burnetii* u krav ve velkokapacitním kravínu v Bražci – Antibodies to *C. burnetii* in cows kept on a large-scale farm at Bražec

Datum <sup>1</sup>	Vyšetřeno <sup>2</sup>	Počet pozitivních <sup>3</sup>	Tit <sup>4</sup>	Procento pozitivních <sup>5</sup>
6. 7. 1987	292	31	8–256 ( $\bar{x}_g = 16,7$ )	10,6
8. 9. 1988	353	1	40	0,3
15. 11. 1988	360	3	3 x 10	0,8
8. 2. 1989	352	9	≥10	2,6

<sup>1</sup>date, <sup>2</sup>cows examined, <sup>3</sup>number of positive findings, <sup>4</sup>titer, <sup>5</sup>percentage of positive findings

Druh <sup>1</sup>	Vyšetřeno <sup>2</sup>	Pozitivních <sup>3</sup>
Myšice křovinná/lesní ( <i>Apodemus sylvaticus/flavicollis</i> )	176	0
Hraboš polní ( <i>Microtus arvalis</i> )	136	1 (0,7 %)
Rejsek obecný ( <i>Sorex araneus</i> )	75	0
Normík rudý ( <i>Clethrionomys glareolus</i> )	73	1 (1,4 %)
Hraboš mokřadní ( <i>Microtus agrestis</i> )	21	0
Rejsek malý ( <i>Sorex minutus</i> )	3	0
Myška drobná ( <i>Micromys minutus</i> )	2	0
Hryzec vodní ( <i>Arvicola terrestris</i> )	2	0
Celkem <sup>4</sup>	488	2 (0,4 %)

<sup>1</sup>species, <sup>2</sup>animals examined, <sup>3</sup>positive findings, <sup>4</sup>total

na území České republiky prokázána Q-horečka zvířat – se *C. burnetii* stále vyskytuje. *C. burnetii* cirkuluje v populacích skotu a v populacích volně žijících drobných zemních savců. Virulence kmenů *C. burnetii*, které vyvolávaly protilátkovou odpověď u skotu ve sledované oblasti, je ale zřejmě minimální. Za celou dobu sledování nebyly totiž u zvířat s protilátkami, ani u jiných, pozorovány příznaky onemocnění, které by mohly být dány do souvislosti s klinickými příznaky Q-horečky u skotu. Klinické příznaky u skotu charakterizující Q-horečku nezaregistroval ani místní obvodní veterinární lékař (K o ž d o ň, ústní sdělení). Nízká virulence kmenů *C. burnetii*, nyní cirkulujících v populacích skotu, je nejvýznamnějším rozdílem proti situaci na stejném území začátkem 50. let, jak ji popsal Raška aj. (1954).

Příčiny rozdílné séroprevalence ve dvou blízkých chovech a při různých termínech vyšetření není možné jednoznačně zdůvodnit. Nejvyšší séroprevalence zjištěná ve velkokapacitním kravinu v Bražci v červenci 1987 nedosahuje hodnot zjištěných v některých jihočeských chovech skotu. Např. Lisák aj. (1989) uvádí séroprevalenci protilátek proti *C. burnetii* zjišťovanou komplementfixační reakcí přes 25 % u osmi z 23 stád. Častý výskyt protilátek ale ani u skotu v jižních Čechách není v souvislosti s klinickými příznaky Q-horečky skotu (Řeháček aj., 1977, 1984, 1985, 1987; Lisák aj., 1989; Cempírková aj., 1993; Literák, 1994).

Ovce hrají zřejmě v současné době na našem území jen malou roli v cirkulaci *C. burnetii*. Negativní výsledky vyšetření ovcí z Karlovarska korespondují s negativními výsledky vyšetření ovcí před pastvou ve dvou jihočeských lokalitách (Řeháček aj., 1985). Teprve po pastvě tam byly zjištěny protilátky v nízké prevalenci 1,7 %.

Séroprevalence protilátek proti *C. burnetii* u drobných zemních savců na Karlovarsku je podobná séroprevalenci, kterou v jižních Čechách – u Lipenské přehrady zaznamenal Řeháček aj. (1987). V okolí Lipenské nádrže bylo vyšetřeno 295 drobných zemních savců, u pěti myšic křovinných (*Apodemus sylvaticus*) byly

zjištěny protilátky v titru 8-256 (komplementfixační reakcí). Naproti tomu na jiné jihočeské lokalitě – v nivě řeky Lužnice popisuje Vošta aj. (1988) séroprevalenci podstatně vyšší. V letech 1986 a 1987 tam vyšetřil 116 a 66 drobných zemních savců, přičemž protilátky zjistil u 46,5 % a 36,4 % jedinců (mikroaglutinační reakcí). Jeho nejvyšší zjištěný titr byl 128. Extrémně vysoký titr 2560, který byl na Karlovarsku zjištěn u normálního rudého indikovaly pravděpodobně akutní infekční stav, kdy infekční dávka musela být poměrně vysoká (Řeháček aj., 1992).

Přetrvávající výskyt riketsie *C. burnetii* na území České republiky je skutečností. Význam tohoto výskytu z hlediska zdraví lidí a zvířat však bude možné definovat až po izolacích konkrétních kmenů *C. burnetii* a stanovení jejich virulence v experimentálních infekcích.

## LITERATURA

- CEMPÍRKOVÁ, R. – ŘEHÁČEK, J. – LISÁK, V.: Protilátky proti *Coxiella burnetii* a *Chlamydia psittaci* v některých vybraných chovech skotu v jižních Čechách. Sbor. Jihočes. Univ. Zeměd. Fak., České Budějovice, 10, 1993: 51–61.
- LISÁK, V. – VOŠTA, J. – ŘEHÁČEK, J.: Výskyt *Coxiella burnetii* a *Chlamydia psittaci* u hovězího dobytka v jižních Čechách. Vet. Med. (Praha), 34, 1989: 403–410.
- LITERÁK, I.: *Coxiella burnetii* antibodies in calves concentrated in a large-capacity calf house in an area with endemic incidence of latent bovine Q-fever. Acta Vet. (Brno), 63, 1994: in press.
- PATOČKA, F. – KUBELKA, V.: Studie o Q-rickettsiáze. Českoslov. Hyg., 2, 1953: 340–352.
- RAŠKA, K. – ALDOVÁ, E. – KUBÁSEK, M. – SYRŮČEK, L. – HAVLÍK, O. – MANYCH, J. – ŠÁŇA, B.: Q-horečka. Sdělení 1. Zpráva o prvních u nás pozorovaných epidemiích. Čas. Lék. Čes., 93, 1954: 1153–1159.
- ŘEHÁČEK, J.: Epidemiology and significance of Q-fever in Czechoslovakia. Zbl. Bakt. Hyg., R. A, 267, 1987: 16–19.
- ŘEHÁČEK, J. – VOŠTA, J. – TARASEVICH, I. V. – BREZINA, R. – YABLONSKAYA, V. A. – PLOTNIKOVA, L. F. – FETISOVA, N. F. – HANÁK, P.: Rickettsioses studies.

3. Natural foci of rickettsioses in south Bohemia. Bull. Wld. Hlth. Org., 55, 1977: 455-461.

ŘEHÁČEK, J. – VOŠTA, J. – BREZINA, R. – HANÁK, P.: Rickettsie v jihočeské části CHKO Šumava. Sbor. Vys. Šk. zeměd. Praha, Průvoz.-Ekon. Fak., České Budějovice, 2, 1984: 63-77.

ŘEHÁČEK, J. – VOŠTA, J. – BREZINA, R. – HANÁK, P.: Rickettsiae in the Šumava region. Folia Parasit., 32, 1985: 173-183.

ŘEHÁČEK, J. – VOŠTA, J. – KOCIANOVÁ, E. – LISÁK, V. – HANÁK, P. – KOVÁČOVÁ, E. – CEMPÍRKOVÁ, R.: Výskyt koxiellózy a chlamydiózy na Šumavě. Vet. Med. (Praha), 32, 1987: 279-288.

ŘEHÁČEK, J. – ÚRVÖLGYI, J. – KOCIANOVÁ, E. – JEDLIČKA, L.: Susceptibility of some species of rodents to rickettsiae. Folia Parasit., 39, 1992: 265-284.

VOŠTA, J. – ŘEHÁČEK, J. – HANÁK, P. – TŮMA, V.: Výskyt protilátek proti leptospírám a *Coxiella burnetii* u drobných savců nivy Horní Lužnice. Sbor. Vys. Šk. zeměd. Praha, Agron. Fak., České Budějovice, Řada A, 1988: 141-148.

VOŠTA, J. – ŘEHÁČEK, J. – LISÁK, V.: Q-horečka na Třeboňsku. Sbor. Vys. Šk. Zeměd. Praha, Agron. Fak. České Budějovice, Řada B, 6, 1989: 109-117.

Došlo 25. 7. 1994

---

*Kontaktní adresa:*

MVDr. Ivan Literák, CSc., Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Česká republika  
Tel. 05/41 32 11 07, fax 05/41 21 11 51

---

# THE FIRST FINDINGS OF *GIARDIA* SPP. IN HORSES IN THE CZECH REPUBLIC

## PRVNÍ NÁLEZY *GIARDIA* SPP. U KONÍ V ČESKÉ REPUBLICCE

I. Pavlásek, L. Hess, I. Stehlík, V. Štika

State Veterinary Institute, Praha, Czech Republic

**ABSTRACT:** The first occurrence of *Giardia* spp. in horses in the Czech Republic is reported. During preventive examination of 360 five-month up to 14-year horses from various parts of the region of Central Bohemia carried out from January 1993 to June 1994 in the parasitological laboratory of the State Veterinary Institute in Prague, the *Giardia* cysts were detected in the excrements of 18 (5%) horses, mostly 2–4 years of age, and in two foals 3 and 6 weeks old. During the period between March 1993 and June 1994, systematic and repeated observation was aimed at a group of 38 racing horses two up to four years of age from two studs in the surroundings of Prague. In one of these studs *Giardia* spp. cysts were found in 7 horses (35%) out of a total of 20 animals. During bacteriological examination of horses infected with *Giardia* carried out parallelly, only in one animal pathogenic bacteria *Rhodococcus equi* and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* were detected in the excrements. After the application of Entizole (following discontinuation of the preparation on days 4 and 50), however, the result of bacteriological examination was negative. The size of cysts ( $n = 100$ ) was  $12.8\text{--}16.0 \times 9.6\text{--}11.2 \mu\text{m}$  (with the mean of  $14.6 \times 9.9 \mu\text{m}$ ) there was no finding of free trophozoites of *Giardia* in the horse excrements examined. On the basis of morphological characteristics of the protozoan cysts and of the structure of median bodies (following excystation of the *Giardia* cysts *in vitro*), the intestinal flagellate found in horses can be included into the morphological group of *G. intestinalis*. By a long-term observation of seven spontaneously infected horses, new data on the dynamics and duration of shedding *Giardia* cysts and on the possibility of spread of the parasite in the environment of their housing have been obtained. In three of the spontaneously infected horses the efficiency of Entizole in its total daily dose of 3.5, 5 and 7.5 g/animal was verified and in one of the horses (after failure of the treatment with the dose of 5 g/day) the efficiency of Avrazor was also verified in its dose of 7.5 g in the course of 3 days. It came out from these, till now preliminary results that 10–12 day application of Entizole in the dose of 7.5 g/horse resulted in total control of shedding of the flagellate during the treatment and during at least 40 days after discontinuation of its application, while in case of the dose of 3.5 g/horse findings of the *Giardia* cysts were repeatedly positive as early as on day 8 after ending the treatment, its intensity being in fact identical with the quantity of cysts found in the excrements of the horse before the application of Entizole. Three-day application of Avrazor to one animal in which during the five-month period (following completion of 12-day medication with Entizole in the dose of 5 g) the *Giardia* cysts were intermittently found was successful and till now, in the course of 7 months, the protozoan has not been detected in this horse. Further studies are needed to clarify whether the horse can represent a source of spread of giardiasis among other farm animals, as well as a potential source of infection for a man, in the case of taking this protozoal infection for zoonosis.

*Giardia* spp.; *Rhodococcus equi*; *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*; *Giardia* cysts; horses; Entizole; Avrazor

**ABSTRAKT:** Poprvé byl zjištěn výskyt *Giardia* spp. u koní v České republice při preventivním vyšetřování 360 pětiměsíčních až 14letých koní z různých oblastí Středočeského kraje. Vyšetřování se uskutečnilo v období od ledna 1993 do června 1994 v parazitologické laboratoři Státního veterinárního ústavu v Praze. Cysty giardií byly detekovány ve výkalech 18 (5 %), většinou dvou- až čtyřletých koní, a u dvou hříbat ve věku tři a šest týdnů. V období od března 1993 do června 1994 byla sledována skupina 38 dvou- až čtyřletých dostihových koní ze dvou stájí v okolí Prahy. Na jedné z nich byly cysty *Giardia* spp. zjištěny u sedmi (35 %) z celkového počtu 20 koní. Při souběžném bakteriologickém vyšetření koní nakažených giardiemi byly ve výkalech pouze jednoho zvířete detekovány patogenní bakterie *Rhodococcus equi* a *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Po aplikaci Entizolu (4. a 50. den po vysazení preparátu) byl výsledek bakteriologického vyšetření negativní. Na základě morfometrické charakteristiky cyst prvoka a struktury mediánních tělísek lze nálezy střevního bičkovce u koní zařadit do morfologické skupiny *Giardia intestinalis*. Dlouhodobým sledováním sedmi spontánně nakažených koní byly získány nové údaje o dynamice a délce vylučování cyst giardií a o možnosti šíření parazita v prostředí ustájení koní. U tří spontánně nakažených koní byla v celkové denní dávce 3,5; 5 a 7,5 g na jednoho koně ověřována účinnost Entizolu a u jednoho z nich (po neúspěšném léčení v dávce 5 g na den) také Avrazoru v dávce 7,5 g po dobu tří dnů proti *Giardia* spp. Z předěžných výsledků vyplývá, že 10–12denní podávání Entizolu v dávce 7,5 g zcela utlumilo vylučování cyst bičkovce

během léčení a nejméně 40 dnů po jeho vysazení, zatímco při dávce 3,5 g byly opětovně pozitivní nálezy cyst giardií již 8. den po ukončeném léčení a jejich intenzita byla v podstatě shodná s množstvím cyst zjištěných ve výkalech koně v období před podáváním Entizolu. Třídenní podávání Avrazoru jednomu jednému zvířeti, u kterého byly během pětíměsíčního období (po ukončeném 12denním podávání Entizolu v dávce 5 g) střídavě zjišťovány cysty giardií, bylo úspěšné a po dobu sedmi měsíců nebyl prozatím tento prvok u koně detekován. Dalšími studiemi bude třeba objasnit, zda kůň může být zdrojem šíření giardiózy mezi jinými hospodářskými zvířaty, potenciálně i zdrojem nálezů člověka, jestliže je tato protozoární infekce považována za zoonózu.

*Giardia* spp.; *Rhodococcus equi*; *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*; cysty giardií; koně; Entizol; Avrazor

## ÚVOD

*Giardia* (*Lambia*) pod názvem *Cercomonas intestinalis* u člověka poprvé popsal Lambert (1859). Po řadu let trvající taxonomické a nomenklaturické spory a různé názory týkající se tohoto střevního bičíkovce nakonec vyústily v závěr, že *C. intestinalis* je synonymum pro druh *Giardia intestinalis* (Lambert, 1859) Alexeieff, 1914 náležející do rodu *Giardia* Künstler, 1882, čeledě *Hexamitidae* Kent, 1880, řádu *Diplomonadida* Wenyon, 1926.

U zvířat byly giardie poprvé nalezeny u králíků (*Oryctolagus cuniculus*) s druhovým označením *Hexamita duodenalis* Davaine, 1875, což je synonymum dnes uváděného druhu *Giardia duodenalis* (Davaine, 1875) Deschienes, 1921.

První zpráva o giardiích u koní pochází z Jižní Afriky. Nalezl je Fantham (1921) při postmortálním vyšetřování jednoho koně z oblasti Pretorie, a to v tlustém střevě. Bičíkovec byl následně pojmenován *Giardia equi* Fantham, 1921. Druhé sdělení o výskytu tohoto druhu giardie u anemické klisvy s klinickými příznaky koliky, bolestmi břicha, průjmem, celkovou slabostí a ztrátou chuti k přijímání krmiva uveřejnili Varela a Salsamendi (1958) z Uruguaye. O giardióze u dvou hříbat ve věku jednoho a tří měsíců bez klinických příznaků onemocnění informuje Bemrick (1968) ze Severní Ameriky. Manahan (1970), který se zabýval studiem příčin chronických průjmových onemocnění u koní v Austrálii, našel ve vzorku výkalů jednoho ze 32 vyšetřovaných zvířat prvoky typu *Giardia*, ne však v cystové formě. Ve Švýcarsku, v souvislosti se studiem průjmů u telat, zjistili u koní ustájených s telaty giardie Nesvada aj. (1982). V USA Kirkpatrick a Skand (1985) zaznamenali giardie u plnokrevného koně, který po dobu šesti měsíců trpěl občasnými průjmy. V důsledku sníženého příjmu krmiva došlo u tohoto koně k výrazné ztrátě tělesné hmotnosti, jeho srst byla špatné kvality a zjistili u něho exsudativní dermatitidu.

Cílem tohoto sdělení je informovat o prvních nálezech *Giardia* spp. u koní v České republice, o dynamice vylučování cyst prvoka, o způsobu a účinnosti léčby této protozoózy u dostihových koní a o výsledcích bakteriologického vyšetření výkalů koní spontánně nakažených giardiemi.

## MATERIÁL A METODA

### METODA ZJIŠŤOVÁNÍ PREVALENCE A DYNAMIKY VÝSKYTU *GIARDIA* SPP.

V období od ledna 1993 do června 1994 bylo v parazitologické laboratoři Státního veterinárního ústavu v Praze koprologicky vyšetřeno celkem 360 vzorků výkalů od pětíměsíčních až 14letých koní a dvou tří- a šestitýdenních hříbat z různých lokalit ve Středočeském kraji.

V období od března do listopadu 1993 a od března do června 1994 byl v šesti termínech uskutečněn odběr vzorků výkalů od skupiny 38 koní. Dvacet koní pocházelo z tréninkové dostihové stáje (lokalita č. 1) s dvouaž šestiletými vrcholovými sportovními výkonnostními koňmi. Osmnáct koní této skupiny bylo z chovatelského zařízení polokrevných a plnokrevných koní (lokalita č. 2). Obě stáje se nacházejí v okolí Prahy. Během dostihové sezony nebo v případech importů koní dochází na lokalitě č. 1 často ke střídání ustájených zvířat v jednotlivých boxech.

Dynamika výskytu *Giardia* spp. byla sledována u pěti spontánně nakažených koní (1-LI, 2-TA, 3-DU, 4-TE, 5-FR) na lokalitě č. 1 v období od 3. 5. do 24. 5. 1993 denním vyšetřováním vzorků výkalů odebíraných rektálně vždy v ranních hodinách. Periodicky bylo těchto pět koní dále vyšetřováno ve čtyřech obdobích vždy ve čtyřech po sobě jdoucích dnech.

### POSTUP A ZPŮSOBY LÉČENÍ GIARDIÓZY KONÍ

Proti spontánní nazeze giardiemi byla u tří koní (1-LI, 5-FR a 6-MA) na lokalitě č. 1 ověřována účinnost Entizolu (metronidazole, derivát nitromidazolu, výrobce Polfa).

U koně 1-LI byl Entizol při první aplikaci podáván perorálně dvakrát denně (ráno a večer) rozpuštěný ve vodě (denní dávka činila 3,5 g) po dobu 10 dnů v období od 16. 4. do 25. 4. 1993. Druhá aplikace Entizolu ve stejném režimu podávání, avšak ve zvýšené denní dávce (5,0 g), se uskutečnila v období od 29. 6. do 8. 7. 1993, tj. 59. den po ukončení prvního léčení. Kůň 5-FR byl léčen Entizolem po dobu 12 dnů v celkové denní dávce 5 g od 9. 6. do 20. 6. 1993 a Avrazorem v cel-

kové denní dávce 7,5 g po dobu tří dnů (9.–11. 11. 1993). Entizol, v dávce 7,5 g denně, byl aplikován ve stejném chemoterapeutickém režimu po dobu 10 dnů (od 9. do 18. 11. 1993) koni 6-MA.

Během prvních dvou dnů podávání preparátů byly výkaly koní vyšetřovány v ranních a večerních hodinách, dále potom v denních intervalech minimálně po dobu 20 dnů. Za celé sledované období bylo na lokalitách č. 1 a 2 vyšetřeno celkem 394 vzorků.

#### METODA KOPROLOGICKÉHO VYŠETŘOVÁNÍ A ZPŮSOB HODNOCENÍ INTENZITY VÝSKYTU CYST *GIARDIA* SPP. VE VÝKALECH KONÍ

Vzorky výkalů koní o hmotnosti asi 10 g byly vyšetřovány flotačně-centrifugační metodou podle Brezy (1957). Intenzita vylučovaných cyst giardií byla hodnocena ve třech kličkách (o průměru 4 mm) odebraných z povrchové blanky supernatantu při použití okuláru 10x a objektivu 45x zvětšujícího pomocí křížků podle následujícího klíče:

- (+) – velmi ojedinělý nález cyst giardií po celé ploše krycího sklíčka (15 x 15 mm)
- + – minimálně jedna cysta v pěti zorných polích alespoň v 10 různých místech plochy krycího sklíčka
- ++ – minimálně jedna cysta v jednom zorném poli
- +++ – minimálně dvě až tři cysty v jednom zorném poli
- ++++ – více jak tři cysty v jednom zorném poli.

#### METODY BAKTERIOLOGICKÝCH VYŠETŘENÍ KONÍ NAKAŽENÝCH GIARDIEMI

U koní 1-LI, 2-TA, 3-DU, 4-TE a 5-FR bylo v průběhu sledování provedeno bakteriologické vyšetření vzorků jejich výkalů standardními laboratorními metodami (KA s alkoholem, DC, XLD, pomnožení v médiu podle Rappaporta-Vassiliadis s dvojitým vyočkováním) zaměřené na záchyt nejčastějších enteropatogenů. Kůň 1-LI byl vyšetřen celkem třikrát: před první aplikací Entizolu, čtvrtý den po ukončení podávání preparátu a konečně 50. den po druhém léčení. Vzorky výkalů koní 2-TA, 3-DU, 4-TE a 5-FR byly vyšetřeny bakteriologicky jednorázově v době jejich stoprocentního napadení *Giardia* spp.

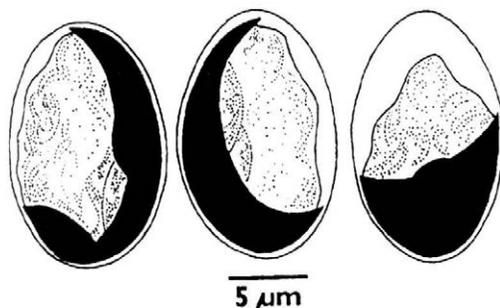
#### VÝSLEDKY

##### VÝSLEDKY PARAZITOLOGICKÝCH VYŠETŘENÍ

##### Morfometrická charakteristika cyst *Giardia* spp. u koní

Většina cyst *Giardia* spp. byla oválná a s pevnou blanou. Proměřením 50 cyst získaných z výkalů spontánně nakažených dvou koní (1-LI a 5-FR) byla v na-

tivním preparátu jejich velikost 12,8–16,0 x 9,6–11,2  $\mu$ m (průměr 14,6 x 9,9  $\mu$ m). Uvnitř cyst byla patrná oválná jádra lokalizovaná v jedné třetině jednoho z pólů cysty. U některých z nich byl dobře zřetelný svazek bičíků a zejména mediánní tělíška. Při diagnostice giardií ve výkalech koní s použitím flotačního roztoku (Breza, 1957) docházelo k nahromadění obsahu cysty k jedné její stěně nebo pólu, což je pro cysty tohoto střevního bičíkovce velmi typické (obr. 1). Žádné volné trofozoity giardií nebyly ve vyšetřovaných vzorcích nalezeny.



1. Nejčastější formy destrukce (změn) vnitřního obsahu cyst *Giardia* spp. ve flotačním roztoku při koprologickém vyšetřování výkalů koní – The most frequent forms of destruction (changes) of the content inside the *Giardia* spp. cysts in the flotation solution during coprological examination of excrements of horses

##### Prevalence *Giardia* spp. u koní

Z celkového počtu 360 vyšetřených vzorků výkalů koní různých věkových kategorií byly giardie nalezeny u 18 (5 %) zvířat. Pozitivní byly nálezy u dvou hříbat ve věku tři a šest týdnů

Cysty *Giardia* spp. byly zjištěny pouze u koní na lokalitě č. 1 a konkrétní údaje o počtech pozitivních případů jsou uvedeny v tab. I.

V období od 5. 4. do 16. 4. 1993 byl denně vyšetřován trus dvou tříletých spontánně nakažených koní (1-LI a 2-TA), u kterých byly giardie nalezeny při prv-

1. Nálezy cyst *Giardia* spp. při kontrolních opakovaných vyšetřeních skupiny dostihových koní na lokalitě č. 1 – Findings of *Giardia* spp. cysts during control and repeated examinations of a group of racing horses in locality No. 1

Datum vyšetření <sup>1</sup>	Počet vyšetřených <sup>2</sup>	Počet pozitivních/% nakažených <sup>3</sup>
29. 3. 1993	20	2/10
3. 5.	20	5/25
17. 8.	20	5/25
7. 11.	20	2/10
19. 3. 1994	6	3/50
14. 6.	6	2/33,3

<sup>1</sup>date of examination, <sup>2</sup>number of animals examined, <sup>3</sup>number of positive/% of infected animals

ním kontrolním vyšetření (29. 3. 1993). Během uvedené období se cysty *Giardia* spp. vyskytovaly v různé intenzitě denně u koně 1-LI. Kůň 2-TA vylučoval cysty prvoka permanentně během prvních tří dnů, v dalších osmi dnech byly nálezy střídavě pozitivní a negativní.

Při 22denním sledování (v období od 3. 5. do 24. 5.) průběhu vylučování cyst *Giardia* spp. u skupiny pěti koní se u dvou z nich (1-LI a 5-FR) vyskytovaly cysty denně po celou dobu. U koní 2-TA, 3-DU (třiletí) a 4-TE (dvouletý) byly nálezy cyst prvoka velmi nepravidelné a výsledky denních vyšetření byly střídavě pozitivní a negativní. Také intenzita vylučovaných cyst giardií byla u těchto koní v porovnání s intenzitou zjišťovanou u 1-LI a 2-TA (zvláště u 1-LI) výrazně nižší.

Při vyšetřování stejné skupiny pěti koní ve 14denních intervalech v měsíci červnu 1993 (vždy ve čtyřech po sobě jdoucích dnech) a v měsíčních intervalech (v červenci a srpnu téhož roku) byly cysty giardií detekovány v poměrně vysoké intenzitě (++) až (++++) na počátku června u koně 1-LI. V dalších kontrolních vyšetřeních se cysty u tohoto koně vyskytovaly sporadicky v důsledku aplikace Entizolu. U koní 2-TA, 3-DU a 4-TE byly nálezy cyst ve sledovaných obdobích ojedinelé s intenzitou hodnocenou + až ++. Zajímavé byly nálezy u koně 4-TE. Po dobu 50–57 dnů, které uplynuly od zjišťování denní dynamiky, se u tohoto koně cysty nevyskytovaly. Avšak při vyšetřování jeho výkalů v červenci a srpnu byly cysty giardií detekovány opět ve všech čtyřech po sobě jdoucích dnech v intenzitě hodnocené + až ++.

#### Účinnost antiparazitik proti spontánní nákaze koní 1-LI, 5-FR a 6-MA giardiemi

Průběh sledování vlivu použitých preparátů proti giardiím u koní je souhrnně uveden v tab. II. Cysty giardií nebyly zjištěny již po 36–48 hodinách a dále po celou dobu aplikace antiparazitik v denních dávkách 3,5; 5 a 7,5 g. U koně 1-LI se však cysty giardií začaly opět objevovat osmý den po vysazení Entizolu (dávka 3,5 g). Druhá aplikace (5 g denně) ve stejném chemoterapeutickém režimu uskutečněném 65. den po ukončení prvního léčení posunula počátek opětovných pozitivních nálezů prvoka až na 21. den po vysazení Entizolu. Také intenzita vylučovaných cyst byla výrazně nižší.

Entizol, v dávce 5 g denně, byl ověřován také u koně 5-FR přesto, že intenzita cyst před léčením byla nízká, a to +. Podobně jako u koně 1-LI nebyly ani u tohoto zvířete cysty giardií nalezeny během podávání preparátu. Poprvé se začaly objevovat opět 41. den po ukončení léčení a jejich intenzita byla přibližně na stejné úrovni jako v období před aplikací preparátu. Vzhledem k tomu, že při kontrolních tříměsíčních vyšetřováních (v týdenních až 14denních intervalech) byly permanentně cysty giardií ve střední intenzitě (++) zjišťovány, byl tento kůň po druhé přeléčen Avrazorem v dávce 7,5 g na den po dobu tří dnů. Žádné cysty

nebyly zjištěny od 4. do 131. dne po léčení a sledování koně 5-FR bylo tudíž po této době ukončeno.

Sto procentně efektivní nebyla aplikace Entizolu v dávce 7,5 g na den po dobu 10 dnů ani u koně 6-MA. Cysty giardií nebyly detekovány během léčení a až do 31. dne po jeho ukončení. Při dalších vyšetřeních, uskutečněných z provozních důvodů 121. až 123. den, byly cysty tohoto střevního bičíkovce ve velmi nízké intenzitě opět detekovány.

#### VÝSLEDKY BAKTERIOLOGICKÝCH VYŠETŘENÍ

Patogenní druhy bakterií *Rhodococcus equi* a *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* byly detekovány pouze u koně 1-LI v době pozitivního nálezu cyst *Giardia* spp. den před aplikací Entizolu. Negativní byl výsledek bakteriologického vyšetření tohoto koně 4. a 50. den po léčení, podobně jako i u koní 2-TA, 3-DU, 4-TE, 5-FR v období jejich 100% nákazy giardiemi.

#### DISKUSE

Od prvního nálezu giardií u koní uplynulo 72 let a poznatky o rozšíření a významu parazita u tohoto hostitele jsou doposud velmi sporadické. Jejich nálezy byly většinou náhodné a v případě údajů M a n a h a n a (1970) možná i sporné.

V literatuře bylo popsáno více než 40 různých druhů giardií a přesto, že se používají nové metody (imunoelektroforetické, izoenzymatické, chemotaxonomická pozorování restrikční endonukleázovou analýzou DNA), pomocí nichž by bylo možné odlišit druhy, případně kmeny, je i v současné době přesnější určení *Giardia* zatím velmi nesnadné. Také F a n t h a m (1921) připouští, že *Giardia equi* Fantham, 1921 může náležet k již známým, dříve popsaným druhům. Vzhledem k těmto skutečnostem i k doposud nevyjasněné problematice hostitelské specifity giardií, označujeme proto nálezy prvoka u koní v našem materiálu *Giardia* spp. Podle našich měření byla velikost cyst giardií u koní v porovnání s údaji autorů B e m r i c k (1968), K i r k p a t r i c k a S k a n d (1985) o něco větší (délka o 2,4 a šířka o 1,2 µm). Zjištěným rozdílům však nepřikládáme významnou důležitost a domníváme se, že intenzita u koní lze na základě struktury mediálních tělísek (po excystaci *in vitro*) zařadit podle M e y e r a (1985) do morfologické skupiny *Giardia intestinalis*.

Na základě prostudované a dostupné literatury si dovoluujeme tvrdit, že tato práce přináší vůbec první ucelenější informace o *Giardia* spp. u koní. Dosažené výsledky z našich dlouhodobých pozorování přinesly některé nové údaje zejména: o dynamice a délce vylučování cyst giardií u spontánně nakažených koní, o výsledcích léčení a také počáteční údaje o možnosti případného šíření parazita v prostředí ustájených koní. Podobně jako i v řadě jiných publikací o giardiích

II. Vliv aplikace Entizolu a Avrazoru na průběh spontánních nákaz koní *Giardia* spp. – Effect of application of Entizole and Avrazor on the course of spontaneous infections of horses with *Giardia* spp.

	Před aplikací <sup>1</sup>	Během aplikace <sup>2</sup>						Po aplikaci <sup>3</sup>			
1-LI První aplikace Entizolu (3,5 g/den) <sup>4</sup>											
Datum vyšetření <sup>5</sup>	od 5. 4. do 16. 4.	16. 4.		17. 4.		18. 4.–25. 4.	26. 4.–2. 5.		3. 5.–25. 5.		
		Ráno <sup>6</sup>	Večer <sup>7</sup>	Ráno <sup>6</sup>	Večer <sup>7</sup>		1.–7. den <sup>8</sup>	8.–30. den <sup>8</sup>			
Nález cyst <i>Giardia</i> spp. <sup>9</sup>	++ až ++++ <sup>10</sup>	++	+	(+)	+	negativní <sup>11</sup>	negativní <sup>11</sup>		+ až ++++		
1-LI Druhá aplikace Entizolu (5,0 g/den) <sup>12</sup>											
Datum vyšetření <sup>5</sup>	od 20. 6. do 28. 6.	29. 6.		30. 6.		1. 7.–8. 7.	9. 7.–28. 7. 1.–20. den <sup>8</sup>	29. 7. 21. den <sup>8</sup>	31. 7. 23. den <sup>8</sup>	1. 8. 24. den <sup>8</sup>	
Nález cyst <i>Giardia</i> spp. <sup>9</sup>	+ až ++ <sup>10</sup>	+		+		negativní <sup>11</sup>	negativní <sup>11</sup>	+	negativní <sup>11</sup>	+	
5-FR Aplikace Entizolu (5,0 g/den) <sup>13</sup>											
Datum vyšetření <sup>5</sup>	od 4. 6. do 8. 6.	9. 6.		10. 6.		11. 6.–20. 6.	21. 6.–30. 7. 1.–40. den <sup>8</sup>	31. 7. 41. den <sup>8</sup>	1. 8. 42. den <sup>8</sup>	6. 8.–9. 8. 47.–50. den <sup>8</sup>	
		Ráno <sup>6</sup>	Večer <sup>7</sup>	Ráno <sup>6</sup>	Večer <sup>7</sup>		negativní <sup>11</sup>	negativní <sup>11</sup>	+	+++	+ až ++
Nález cyst <i>Giardia</i> spp. <sup>9</sup>	+ <sup>10</sup>	+	(+)	(+)	negativní <sup>11</sup>	negativní <sup>11</sup>	negativní <sup>11</sup>	+	+++	+ až ++	
5-FR Aplikace Avrazoru (7,5 g/den) <sup>14</sup>											
Datum vyšetření <sup>5</sup>	od 6. 11. do 8. 11.	9. 11.		10. 11.		11. 11.	15. 11.–17. 11. 4.–6. den <sup>8</sup>	18. 12.–21. 12. 37.–41. den <sup>8</sup>		19. 3.–21. 3. 94. 121.–131. den <sup>8</sup>	
Nález cyst <i>Giardia</i> spp. <sup>9</sup>	+ <sup>10</sup>	+		(+)		negativní <sup>11</sup>	negativní <sup>11</sup>	negativní <sup>11</sup>	negativní <sup>11</sup>		
6-MA Aplikace Entizolu (7,5 g/den) <sup>15</sup>											
Datum vyšetření <sup>5</sup>	od 4. 11. do 8. 11.	9. 11.		10. 11.		11. 11.–18. 11.	19. 11.–22. 11. 1.–3. den <sup>8</sup>	18. 12.–21. 12. 30.–33. den <sup>8</sup>		19. 3.–21. 3. 94. 121.–131. den <sup>8</sup>	
Nález cyst <i>Giardia</i> spp. <sup>9</sup>	+ <sup>10</sup>	+		(+)		negativní <sup>11</sup>	negativní <sup>11</sup>	negativní <sup>11</sup>	+		

<sup>1</sup>before application, <sup>2</sup>during application, <sup>3</sup>after application, <sup>4</sup>1-LI the first application of Entizole (3.5 g/day), <sup>5</sup>date of examination, <sup>6</sup>morning, <sup>7</sup>evening, <sup>8</sup>day 1–day 7 (day following application), <sup>9</sup>finding of cysts of *Giardia* spp., <sup>10</sup>intensity of occurrence of *Giardia* cysts, <sup>11</sup>negative, <sup>12</sup>second application of Entizole (5.0 g/day), <sup>13</sup>application of Entizole (5.0 g/day), <sup>14</sup>application of Avrazor (7.5 g/day), <sup>15</sup>application of Entizole (7.5 g/day)

z různých hostitelů, také v tomto našem sdělení zůstává bohužel mnoho otázek nedořešených. Patří k nim kromě jiných např. určení primárního zdroje nákaz koní giardiemi, vliv prvoka na celkový zdravotní stav, případně výkonnost dostihových koní a tím i nezbytnost léčení zvířat i při relativně nízké intenzitě výskytu cyst prvoka ve vyšetřovaných vzorcích výkalů. Na příkladu spontánní nákazy u koní 1-LI a 5-FR je zřejmé, že za určitých podmínek, které bude rovněž třeba v dalších studiích blíže objasnit a charakterizovat, mohou být cysty vylučovány v různé intenzitě výkaly koně permanentně po značné dlouhé období. Podobně jako u jiných hostitelů dochází také u koní k periodickému vylučování cyst prvoka, což výsledek diagnostiky této parazitózy při běžném rutinním koprologickém vyšetřování velmi znesnadňuje a významně ovlivňuje. Doporučujeme proto, a je to v zájmu samotných majitelů koní, aby pro objektivní posouzení byly k rutinnímu parazitologickému vyšetřování cílenému na přítomnost cyst giardií zasílány vzorky výkalů odebrané nejlépe v ranních hodinách a alespoň po třech po sobě jdoucích dnech. Pro rutinní diagnostiku *Giardia* spp. u koní jsou zcela objektivní a vhodné standardní koprologické metody s použitím různých flotačních roztoků. Při intenzivním výskytu cyst bičkovce ve výkalech lze použít i metodu nativního preparátu. Vzhledem k relativně

malým rozměrům cyst, které jsou navíc bezbarvé a tudíž snadno přehlédnutelné, doporučujeme preparáty prohlížet při zvětšení 200–450x.

Z výsledků sledování, ve kterých jsme zjišťovali účinnost Entizolu proti spontánní nákaze koní giardiemi vyplynulo, že dávka 3,5; 5 a 7,5 g na koně podávaná perorálně dvakrát denně po dobu 10 a 12 dnů zcela utlumila vylučování cyst *Giardia* spp. během aplikace preparátu a dále 7, 20 a 40 dnů po jeho vysazení. Neznamenal však úplnou likvidaci parazita; po určité době se cysty giardií začaly u koní většinou opět objevovat.

Při pozitivním nálezu cyst giardií u koní 1-LI byly detekovány také patogenní druhy bakterií *Rhodococcus equi* a *Streptococcus equi*. Podle autorů Woolkock aj. (1979) a Debey a Bailie (1987) se *R. equi* vyskytuje ve výkalech 30,9 až 40,4 % koní. Podle Robinsona (1982) je *R. equi* součástí mikroflóry dolní části gastrointestinálního traktu koní. Jensen (1934) řadí *R. equi* mezi půdní mikroorganismy a Wilson (1955) považuje půdu za rezervoár tohoto druhu a tím za zdroj vzniku hnisavé pneumonie, enteritidy a podkožních abscesů u hřbat. Barton a Hughes (1980) uvádějí, že kromě koní byl *R. equi* izolován u prasat, skotu, buvolů, ovcí, koček, koz a plazů a také u člověka. *S. equi* (sérologická skupina C) způsobuje

u koní hnisavá onemocnění horních cest dýchacích. Poměrně často je izolován při bakteriologických vyšetřeních z výtěrů pohlavních orgánů klisen, u nichž způsobuje záněty a podílí se na sníženém zabřezávání. Podle osobního sdělení a zatím nepublikovaných údajů MVDr. M. Lávičkové (SVÚ Praha) může *S. equi* vyvolat také aborty hřibbat.

Za zajímavé považujeme zjištění, že aplikace Entizolu měla s největší pravděpodobností vliv na přítomnost obou zjištěných patogenních druhů bakterií u koně I-LI, neboť se je nepodařilo opětovně detekovat 4. a 5. den po aplikaci uvedeného preparátu.

Z našich výsledků dále vyplývá, že *Giardia* spp. bude pravděpodobně častějším parazitem koní než tomu nasvědčují dosavadní literární údaje. K přenosu těchto infekcí může u vnímavých koní docházet velmi snadno.

V souvislosti s údaji WHO, která řadí *Giardia* mezi zoonózy, dále na základě současných znalostí o hostitelské specificitě prvoka a zcela recentních literárních údajů o přenosech giardií z infikovaných domácích zvířat (prostřednictvím kontaktu s nimi nebo cystami kontaminovanou potravou, pitnou vodou apod.) mají naše nálezy značný význam i epidemiologický. Na jedné lokalitě bylo *Giardia* spp. z 20 dlouhodobě sledovaných koní infikováno sedm zvířat (35 %). Získané výsledky rozšiřují nejen hostitelské spektrum giardiózních nálezů, ale současně upozorňují, že také koně a nekontrolované využívání jejich výkalů se může stát za určitých okolností dalším možným zdrojem kontaminace různých substrátů v našem životním prostředí cystami *Giardia* spp.

#### Poděkování

Autoři práce děkují Mgr. Z. Polákoví, pracovníku Státního veterinárního ústavu v Praze, za obětavou spolupráci na překladu souhrnu do angličtiny.

#### LITERATURA

- BARTON, M. D. – HUGHES, K. L.: *Corynebacterium equi*: a review. Vet. Bull., 50, 1980: 65–80.
- BEMRICK, W. J.: Giardia in North American horses. VMSAC, 63, 1968: 163–165.
- BREZA, M.: Niekoľko praktických poznatkov a námetov k helmintokopropologickej diagnostike. Helminológia, 1, 1957: 57–65.
- DEBEY, M. C. – BAILIE, W. E.: *Rhodococcus equi* in fecal and environmental samples from Kansas horse farms. Vet. Microbiol., 14, 1987: 251–257.
- FANTHAM, H. B.: Some parasitic protozoa found in South Africa: IV. Safr. J. Sci., 18, 1921: 164–170.
- JENSEN, H. L.: Studies on saprophytic mycobacteria and corynebacteria. Proc. Linn. Soc. NSW., 59, 1934: 19–61.
- KIRKPATRICK, C. E. – SKAND, D. L.: Giardiasis in a horse. JAVMA, 187, 1985: 163–164.
- LAMBL, W.: Mikroskopische Untersuchungen der Darm-Excrete. Prag. Vischr. Prakt. Heilkde., 61, 1859: 1–58.
- MANAHAN, F. F.: Diarrhoea in horses with particular reference to a chronic diarrhoea syndrome. Austral. Vet. J., 46, 1970: 231–234.
- MEYER, E. A.: The epidemiology of giardiasis. Parasitology Today, 1, 1985: 101–105.
- NESVADBA, J. – HORNING, B. – NESVADBA, J. Jr. et al.: Giardiasis beim Rind. In: Proc. XIIIth World Congress Dis. Cattle, the Netherlands, 1, 1982: 237–240.
- ROBINSON, R.: Epidemiological and bacteriological studies of *Corynebacterium equi* isolates from California farms. J. Reprod. Fertil. (Suppl.), 32, 1982: 477–480.
- VARELA, J. C. – SALSAMENDI, D.: Primer hallazgo en al país de infección natural de nuestros equinos por *Giardia equi* Fantham, 1921. An. Fac. Vet. (Uruguay), 8, 1958: 165–171.
- WILSON, M. M.: A study of *Corynebacterium equi* infection in a study of Thoroughbred horses in Victoria. Austral. J., 31, 1955: 175–181.
- WOOLCOCK, J. – FARMER, A. – MUTIMER, M.: Selective medium for *Corynebacterium equi* isolation. J. Clin. Microbiol., 9, 1979: 640–642.

Došlo 29. 6. 1994

---

#### Kontaktní adresa:

Ing. Ivan Pavlasek, DrSc., Státní veterinární ústav, Sídlíštní 24/136, 165 03 Praha 6-Lysolaje, Česká republika  
Tel. 02/34 46 00–9, fax 02/34 42 91

---

# IMMUNOGENIC AND ANTIGENIC ACTIVITY OF AN EXPERIMENTAL ORAL RABIES VACCINE PREPARED FROM THE STRAIN VNUKOVO-32/107

## IMUNOGÉNNA A ANTIGÉNNA AKTIVITA EXPERIMENTÁLNEJ ORÁLNEJ ANTIRABICKEJ VAKCÍNY Z KMEŇA VNUKOVO-32/107

Š. Švrček<sup>1</sup>, A. Ďurove<sup>1</sup>, R. Ondrejka<sup>1</sup>, J. Závadová<sup>1</sup>, J. Süliová<sup>1</sup>, Z. Beníšek<sup>1</sup>,  
O. J. Vrťiak<sup>1</sup>, J. Feketeová<sup>2</sup>, M. Maďar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Rabiological laboratory of the University of Veterinary Medicine, Institute  
of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic*

<sup>2</sup>*Mevak, JSC, Nitra, Slovak Republic*

**ABSTRACT:** The immunogenic and antigenic activity of an experimental live oral rabies vaccine prepared from the strain Vnukovo-32/107 was evaluated on the basis of results obtained in 3 sets of experiments. These were carried out as model experiments on white mice, then on target animals – red foxes (*Vulpes vulpes*) and a related species – farm-bred polar foxes (*Alopex lagopus*). For quantitative determination of the immunogenic activity of the orally or subcutaneously administered rabies vaccines in model experiments on mice a method was used that had been developed in our laboratory. Antibodies were detected and quantified by an ELISA kit that had also been developed in our lab. Tenacity of the experimental vaccine (infectious tissue culture medium after yolk addition) was verified at different temperatures; the effects of storage temperature upon virus titre and immunogenic activity were investigated. An important part of the experiments – evaluation of the antigenic and immunogenic activity of the live vaccine at oral vaccination (vaccination baits, conditions simulating field vaccination) was carried out in foxes. The immunogenic activity (challenge experiments with a street virus on day 180 and 360 after vaccination) was evaluated in common foxes (*Vulpes vulpes*). The results document a high immunogenic and antigenic activity of the experimental live oral rabies vaccine. The strain Vnukovo-32/107 is suitable for the industrial manufacturing of vaccination baits. In the target species – common foxes challenged on day 180 after primovaccination an 83% protection was observed. Challenge on day 180 after revaccination (or day 360 after primovaccination), the orally immunized foxes proved to be 100% protected. For parallel evaluation of the immunogenic activity of an oral vaccine and for antibody titration it is recommended to employ the quantitative mice test and an ELISA technique, respectively.

rabies; immune prophylaxis of rabies; oral rabies vaccine; vaccination strain Vnukovo-32/107; immunogenic and antigenic activity of the vaccine

**ABSTRAKT:** Na základe výsledkov troch súborov pokusov bola hodnotená imunogénna a antigénna aktivita experimentálnej živej orálnej antirabickej vakcíny z kmeňa Vnukovo-32/107. Pokusy boli vykonané jednak ako modelové na bielych myšiach; tiež na cieľovom druhu zvierat – líškach obyčajných (*Vulpes vulpes*) a príbuznom druhu zvierat – farmových líškach polárnych (*Alopex lagopus*). Pre kvantitatívne stanovenie imunogénnej aktivity orálne, resp. subkutánne aplikovaných antirabických vakcín v modelových pokusoch na myšiach boli využité vlastné metodické postupy, vyvinuté riešiteľským pracoviskom. Pre detekciu a kvantifikáciu protilátok bola použitá ELISA technika vykonaná pomocou súpravy vyvinutej v našom laboratóriu. Bola overená tenacita experimentálnej vakcíny pri jej uchovávaní pri rôznych teplotách, resp. vplyv teploty uchovávania živej vakcíny na titer vírusu, antigénnu a imunogénnu aktivitu. Hodnotenie antigénnej a imunogénnej aktivity živej vakcíny (vo forme vakcinačných návnad) pri orálnej aplikácii (podmienky simulujúce vakcináciu v teréne) bolo vykonané tiež na líškach. Imunogénna aktivita (čelenžné pokusy uličným vírusom na 180. a 360. deň po vakcinácii) bola hodnotená na líškach obyčajných. Dosiahnuté výsledky svedčia o vysokej imunogénnej a antigénnej aktivite experimentálnej živej orálnej antirabickej vakcíny z kmeňa Vnukovo-32/107. Kmeň je vhodný pre priemyselnú výrobu vakcinačných návnad. U cieľového druhu, líšok obyčajných, čelenžovaných na 180. deň po primovakcinácii bola zaznamenaná 83% protekcia očkovaných. Pri čelenži vykonanej na 180. deň po revakcinácii (resp. 360. deň po primovakcinácii) sme zistili 100% protekciu orálne imunizovaných líšok. Pre priebežné hodnotenie imunogénnej aktivity orálnej vakcíny sa doporučuje využiť kvantitatívny test na myšiach a pre titráciu protilátok ELISA technika.

besnota; imunoprofylaxia besnoty; orálna antirabická vakcína; vakcinačný kmeň Vnukovo-32/107; imunogénna a antigénna aktivita vakcíny

## INTRODUCTION

In correspondence with available literature data, statistical data (Rabies Bull. WHO, 1977–1993) as well as with our own observations and analyses of the current epizootological situation the fox plays the most important role in the ecology of rabies virus and epizootiology of rabies in Western and Central Europe including the territory of our country. Fox is the decisive reservoir species. This is the reason why the „offensive“ anti-infectious measures are aimed at the essential problem – control of „fox“ rabies. These problems are discussed in detail in our recent paper (Švrček et al., 1994).

The recent, extensively applied measures, aimed at the control of fox rabies (rabies of wild animals in general), restricted solely to decrease the density of fox population, are of limited or transient character. This scope of problems is evaluated in detail in comprehensive studies of a number of authors (Steck et al., 1982; Wandeler, 1987, 1991; Blancou et al., 1991; Debbie, 1991; Stöhr and Meslin, 1993; Aubert, 1994; Stöhr, 1994). Ecological and ethical aspects of application of some methods of the decrease in population density of free-living carnivores represent additional limiting factors. On the basis of our investigations and results of experimental studies (Švrček et al., 1980a, b, 1983) a permanent effect on fox population density resulting from consistent protection of trophic fox competitors – predatory birds – may be presumed.

Large-area elimination of the disease or prevention of its introduction into the areas free of this disease are the decisive criteria of epizootiological effectiveness of control of animal rabies. Immunoprophylaxis of rabies is of vital importance within the complex of anti-infectious (anti-rabies) measures (Debbie, 1991). In this process, the inevitable postvaccination immunity of a decisive proportion of sensitive animal population (approximately 70% according to the general epizootologic laws) can be induced only on the assumption that all generally valid requirements are observed: the use of vaccine which is harmless, areactogenic and effective under field conditions – the use of a suitable system of application which ensures mass immunization of target or reservoir animals.

On the basis of comprehensive analysis of topical knowledge on rabies immunoprophylaxis (Debbie, 1991; Wandeler, 1991; Matouch and Jaroš, 1992; Stöhr and Meslin, 1993; Stöhr, 1994; Švrček et al., 1993, 1994) it is possible to assume that oral vaccination is the only prospective method of antirabies immunization of free-living common fox (or additional reservoir carnivorous species). It has a number of specificities and is connected in particular with the development of suitable vaccination baits.

Besides the areactogenicity of the vaccine its utilizability is decisively affected by its antigenic and particularly its immunogenic activity. The specificities

which must be respected in the process of the development of oral antirabies vaccines are summarized in the study by Wandeler (1991). With regard to the fact that the use of oral antirabies vaccines assumes the exclusive use of live vaccines, an extraordinary attention is paid to the degree of attenuation of the vaccination strain. These problems are discussed in detail in our paper published in parallel to this one (Švrček et al., 1994).

The effectiveness of live vaccines in general and of oral vaccines in particular is, besides other aspects, conditional upon the immunogenic and antigenic activity of the selected vaccination strain and also on the vaccination dose. This dose (at the same volume of inoculum) depends first of all on the concentration (titer) of the live vaccination virus in the tissue culture infectious medium (semiproduct for production of vaccine). It is also conditional upon its viability, preservation, etc. The above-mentioned problems are usually eliminated by an adequate technological procedure of vaccine production. These aspects are described in the available literature (Stöhr et al., 1990; Wandeler, 1991). However, the immunogenic activity of the vaccination strain still remains the basic problem, accompanied by the above-mentioned no less important areactogenicity aspect, conditional upon the degree of attenuation.

With regard to the lack of proper standardization of the methods used in evaluation of oral antirabies vaccines effectiveness (Artois et al., 1993) the presented paper also brings forward the methodical procedures developed by our laboratory. We presume that these procedures will extend the range of methods used to quantify the effectiveness of oral antirabies vaccines.

The paper provides a summary of some results of our experiments aimed predominantly at the determination of immunogenic and antigenic activity of experimental live oral tissue culture rabies vaccine obtained from the strain Vnukovo-32/107. They were carried out partly as model experiments on white mice and mainly on the target species – common fox and the related species – farmed polar fox. Additional results of experimental studies related to this problems are presented in our papers referred to in this study.

## MATERIALS AND METHODS

### A. IMMUNOGENIC AND ANTIGENIC ACTIVITY OF VACCINE: EXPERIMENTS ON MICE

#### Experimental animals

The random-bred SPF white mice were included in the experiment, obtained from VELAZ, Praha. For intracerebral titration of the vaccination strain, mice weighing 6.0 g were used; for immunization experiments – 12 g, for preliminary and control titration of the challenge strain CVS – 18 g, respectively.

## Vaccine

A live rabies vaccine – the infectious medium tissue culture of the strain Vnukovo-32/107 cultured in the cell line BHK-21 was used. 10% of egg yolk was added to the virus suspension. Before the vaccine was used for immunization experiments, the titration of the vaccination virus had been carried out – continuously by the two following methods:

- a) By intracerebral inoculation test (Koprowski, 1973) on mice (MIT) weighing 6.0 g. The control of specificity of the decrease for the detection of rabies antigen in brain impression smears by direct immunofluorescence test (DIFT) (Dean and Ableseth, 1973) was carried out.
- b) By rapid tissue-culture infectious test – RTCIT (Wiktor, 1973; Rudd and Trimarchi, 1987; Závadová et al., 1993); on 8 chamber Lab-Tek slides; in the cell line BHK-21/13 S.

The results were compiled by the cumulative method according to Reed and Muench (1938).

### Determination of immunogenic activity

Immunogenic activity was determined by the two following quantitative techniques proposed by our laboratory:

- for oral rabies vaccines (Švrček et al., 1984);
- for parenteral rabies vaccines (Švrček and Vrtiak, 1980).

At oral administration, 0.1 ml of vaccine diluted 1 : 5 – 1 : 1 250 (the dilution multiple 5) was dropped onto the root of the tongue. Five mice were immunized by each dilution.

At parenteral administration, 0.2 ml of vaccine diluted 1 : 5 – 1 : 3 125 (the dilution multiple 5) was applied to the animals subcutaneously into the upper lip. Five mice were immunized by each dilution.

The challenge of the immunized mice was carried out on day 21 after vaccination; it was carried out by the strain CVS in both immunization methods. At challenge the immunized mice were infected subcutaneously into the upper lip, the volume of the inoculum being 0.1 ml; 5 MSCLD<sub>50</sub> was used for the challenge. The results were compiled by the cumulative method for the expression of vaccine ED<sub>50</sub>.

### Determination of antigenic activity

It was carried out in parallel – on mice immunized subcutaneously or orally, in the same way as in the experiments for the determination of immunogenic activity, mentioned above.

In immunized mice, on day 21 after vaccination, the antirabies antibodies were detected and quantified by ELISA-method, using the set developed in our laboratory (Švrček et al., 1988, 1992; Süliová et al., 1988, 1989).

## B. THE INFLUENCE OF TEMPERATURE ON IMMUNOGENICITY OF VACCINE; EXPERIMENTS ON MICE

### Experimental animals

In experiments, by analogy with the above-mentioned experiments A, the same weight categories of random-breed SPF white mice were used. The animals were obtained from VELAZ, Praha.

### Vaccine

The native infectious tissue culture medium of the vaccination strain Vnukovo-32/107 was used. Two batches of the tissue culture medium at the suitable virus titre were used. The virus titre was determined in parallel by intracerebral MIT and RTCIT (carried out as described above – experiments A):

- infectious medium No. 14 =  $\log 10^{5.3}$  MICLD<sub>50</sub>/0.03 ml or 10<sup>6.0</sup> RTCIT;
- infectious medium No. 25 =  $\log 10^{5.2}$  MICLD<sub>50</sub>/0.03 ml or 10<sup>6.0</sup> RTCIT.

The stabilizer (10% of egg yolk) was added to the virus suspensions and once again the control titration of the vaccines by the intracerebral MIT was carried out. The results were the same as in the case of preliminary titration.

The following thermic effects were chosen for experimental evaluation of the storage temperature effect on the virus titre and immunogenic activity of live vaccine stabilized by egg yolk:

- freezing to –20 °C and thawing;
- storage at +4 °C during 3.5 and 10 days, respectively;
- storage at +20 °C during 3.5 and 10 days, respectively.

### Determination of immunogenic activity

It was performed in parallel by two quantitative techniques for oral and parenteral vaccines. The description of the techniques is given in experiments A. The immunized mice in both groups were challenged on day 21 after vaccination using the strain CVS in a dose of 2.9 MSCLD<sub>50</sub>/0.1 ml at the same way.

## C. IMMUNOGENIC AND ANTIGENIC ACTIVITY OF VACCINE; EXPERIMENTS ON COMMON FOXES AND FARM-BRED POLAR FOXES

### Experimental animals

16 young, 6–7-month-old common foxes, caught in the field, were included in the experiment. Before including in the experiment, the foxes were examined for

the presence of antirabies antibodies by virus-neutralization test (VNT) *in vivo* on mice (Atanasiu, 1973).

The experiments were also completed on 15 farm-bred polar foxes of approximately the same age as common foxes. The animals had not been vaccinated against rabies before.

## Vaccine

A live rabies vaccine was used for oral immunization of foxes – the infectious tissue culture medium of the strain Vnukovo-32/107 cultured in the BHK-21 cell line. The oral vaccine (vaccination baits) was prepared from the above-mentioned virus suspension by adding protective medium – 10% egg yolk and filling 2.0 ml of the virus suspension into plastic-aluminium blisters. Head and neck of chickens served as a vehicle (the utilizable part of the bait), 150 mg of tetracycline was a biomarker.

The titration of the vaccination virus was carried out before adding of egg yolk by intracerebral MIT (Koprowski, 1973) on mice weighing 6.0 g. The actual titre of the vaccination virus was as follows:

- in oral vaccine for primovaccination of the foxes =  $10^{5.12}$  MICLD<sub>50</sub>/0.03 ml (i.e.  $10^{6.5}$  MICLD<sub>50</sub> of the virus used for the vaccination =  $7.9 \times 10^6$  MICLD<sub>50</sub>);
- in oral vaccine for revaccination of the foxes =  $10^{4.7}$  MICLD<sub>50</sub>/0.03 ml (i.e.  $10^{6.5}$  MICLD<sub>50</sub> of the virus used for the revaccination =  $3.16 \times 10^6$  MICLD<sub>50</sub>).

## Oral vaccination

Primovaccination – 27 foxes, revaccination – 21 foxes was carried out individually by feeding of vaccination baits, fasting. The intake of the baits (including the perforation of the blister) was 100%. The clinical observation of foxes after vaccination and revaccination lasted 45 days.

## Detection of antibodies

The antibodies in foxes were detected and quantified by VNT *in vivo* on mice (Atanasiu, 1973); on day 28 after primovaccination and on day 28 after revaccination. 50 MICLD<sub>50</sub>/0.03 ml of strain CVS was used as the challenge virus for VNT.

## Challenge

On day 180 after primovaccination and on day 180 after revaccination (day 360 after vaccination), the challenge was carried out on common foxes; on 6 animals in the first and on 5 animals in the second of the above-mentioned intervals. One animal (common fox No. 8) has clinically fallen ill on day 245 of the experi-

ment and it deceased as a consequence of trauma. Rabies was eliminated by laboratory examination.

The street rabies strain LB-1 (isolated from *gl. submandibularis* of the common fox) was used for the challenge. The supernatant of the guinea pig's brain suspension was administered intramuscularly to foxes into the *m. masseter* bilaterally. Volume of the inoculum was 1.0 ml; the virus dose 0.9–1.0  $\times 10^4$  MICLD<sub>50</sub>. In parallel with vaccinated foxes, two common foxes of the same age that had not been vaccinated against rabies before, were infected as control.

The clinical observation of the foxes after infection lasted 90 days. In deceased foxes or in those that were killed after post-infection observation, the partial necropsy was carried out: parts of brain and submandibular salivary glands were taken out. The rabies antigen in impression smears was detected by DIFT (Dean and Abelseth, 1973) and the virus isolation was carried out by intracerebral MIT on suckling mice (Koprowski, 1973).

## RESULTS

### A. IMMUNOGENIC AND ANTIGENIC ACTIVITY OF VACCINE; EXPERIMENTS ON MICE

The used live oral vaccine from the strain Vnukovo-32/107 had a convenient titre of virus (at intracerebral titration in MIT  $10^{5.5}$  MICLD<sub>50</sub>/0.03 ml and  $10^{6.0}$  at titration by RTCIT).

The results of determination of immunogenic activity in model experiments on mice are shown in Tab. I. The results indicate that experimental live oral vaccine had convenient immunogenic activity:

- at oral application ED<sub>50</sub> = 0.340 µl, and/or dilution 1 : 29 =  $3.6 \times 10^4$  MICLD<sub>50</sub> of vaccination virus;
- at subcutaneous application ED<sub>50</sub> = 0.106 µl, and/or dilution 1 : 189 =  $1.1 \times 10^4$  MICLD<sub>50</sub> of vaccination virus.

The results of experiments also indicate that for introduction of protection in 50% of mice (ED<sub>50</sub>) immunized orally 3.2 times higher dose of vaccine virus is necessary than at subcutaneous application of vaccine.

The results of determination of antigenic activity of the above-mentioned live oral vaccine in the experiments on mice immunized orally, or subcutaneously are shown in Tab. II. Tested live oral vaccine has also convenient antigenic activity. Titre of antibodies (antigenic activity) at oral application of vaccine was significantly lower than at subcutaneous one. Numerical expression is probably irrelevant, according to our found differences of protective activity of vaccine at oral and subcutaneous application. We must remark, however, that at parenteral vaccination the immunizing dose was twice higher in content than at subcutaneous vaccination (0.2 or 0.1 ml).

I. Immunogenic activity of live cell-culture oral rabies vaccine strain Vnukovo-32/107. Oral and subcutaneous application. Experiments in mice

Vaccine application	ED <sub>50</sub>	Note
Oral	0.340 µl	dilution 1 : 29 and/or 35 984 MICLD <sub>50</sub> /0.1 ml
Subcutaneous	0.106 µl	dilution 1 : 189 and/or 11 043 MICLD <sub>50</sub> /0.2 ml

II. Antigenic activity of live cell-culture oral rabies vaccine strain Vnukovo-32/107. Subcutaneous and oral application. Detection of antibodies by ELISA method on 21st day after vaccination. Experiments in mice

Vaccine application	Dilution of vaccine	Titer of antibodies
Oral	1 : 2	1 : 128
	1 : 10	1 : 32
	1 : 50	1 : 16
	1 : 250	1 : 4
	1 : 1 250	0
Subcutaneous	1 : 5	1 : 2 048
	1 : 25	1 : 2 048
	1 : 125	1 : 256
	1 : 625	1 : 128
	1 : 3 125	1 : 128

B. THE INFLUENCE OF TEMPERATURE ON IMMUNOGENICITY OF VACCINE; EXPERIMENTS ON MICE

The used live vaccine had a convenient initial titre of virus (at vaccine No. 14 =  $10^{5.3}$  MICLD<sub>50</sub>/0.03 ml and at vaccine No. 25 =  $10^{5.2}$  MICLD<sub>50</sub>/0.03 ml) as well as immunogenic activity (ED<sub>50</sub> at oral application = 0.54 or 0.62 µl and at subcutaneous application 0.13 or 0.14 µl). The chosen thermal regime influenced differently the titre of vaccination strain in tested batches (of vaccine) and immunogenic activity of vaccines, too.

The results of vaccination virus titre and immunogenic activity determination at the chosen thermal regime of storage two batches of live cell vaccine (with 10% egg yolk added) from strain Vnukovo-32/107 are shown in Tab. III. Freezing and thawing of the live vaccine, despite of the added protective medium (10% egg yolk), results, a decrease in virus titre approx. in one half of logarithm. Immunogenic activity of vaccine is also reduced at its oral application, less significantly than at subcutaneous application. Storage of vaccine, even longterm at +4 °C, is relatively considerate. Titre of vaccination virus and immunogenic activity of live vaccine was significantly influenced during its storage at +20 °C, especially longterm (10 days) and at its following oral application.

C. IMMUNOGENIC AND ANTIGENIC ACTIVITY OF VACCINE; EXPERIMENTS ON COMMON FOXES AND FARM-BRED POLAR FOXES

The experiments were carried out on 16 animals of the target species – common foxes and 15 farm-bred

polar foxes. Twenty-seven animals were used for the determination of antigenic activity of oral vaccine (12 common foxes and 15 polar foxes). For immunogenic activity determination (challenge experiments) 16 common foxes were used, 12 of them vaccinated orally and 4 non-vaccinated – control animals.

During 45 days of observations of the vaccinated animals no distinct changes were determined which could confirm the reactogenicity of live vaccine from the strain Vnukovo-32/107 applied orally.

The results of determined antigenic activity of live oral vaccination strain Vnukovo-32/107 on day 28 after primovaccination are shown in Tab. IV.

Rabies antibodies were detected in all 27 vaccinated animals; seroconversion is 100%. Individual titre of detected antibodies (ED<sub>50</sub>) was different. The average titre of 27 vaccinated animals was ED<sub>50</sub> = 25.3, in common foxes slightly higher (ED<sub>50</sub> = 26.8) than in polar foxes (ED<sub>50</sub> = 24.0). But rather low levels of virus neutralizing antibodies were found in 4 vaccinated animals (ED<sub>50</sub> = 5.3; resp. 5.7; 5.4; 7.9).

The results of detection and quantification of antibodies on day 28 in orally revaccinated foxes are shown in Tab. V. In all 21 animals antibodies were detected; a secondary immune response was manifested – titre of antibodies was significantly higher than at primovaccination (in average totally ED<sub>50</sub> = 39.8; in polar foxes 37.6 in average and in common foxes 45.2). In animals which were found to have low levels of antibodies after primovaccination, the level of ED<sub>50</sub> after revaccination hardly approached the average levels of ED<sub>50</sub>, compared with other primovaccinated foxes of the group.

The results of challenge experiments – determination of immunogenic activity of a live oral vaccine performed on common foxes are shown in Tabs. IV, V.

III. Influence of temperature on stability (titer of virus, immunogenic activity) of live oral vaccine, strain Vnukovo-32/107. Oral and subcutaneous application. Experiments in mice

Number of vaccine	Thermic influence (°C)	Time of duration (days)	Titer of virus log MICLD <sub>50</sub> /0.03 ml	ED <sub>50</sub> of vaccine in µl	
				orally	subcutaneously
14			5.3	0.54	0.13
25			5.2	0.62	0.14
14	freezing		4.8	0.72	0.17
25	freezing		4.8	0.77	0.19
14	+4	3	5.3	0.58	0.17
		5	5.3	0.57	0.14
		10	4.8	0.58	0.14
25	+4	3	5.1	0.69	0.18
		5	5.1	0.70	0.16
		10	4.7	0.72	0.17
14	+20	3	4.7	0.73	0.20
		5	4.6	0.80	0.25
		10	3.8	1.90	0.35
25	+20	3	4.6	0.84	0.26
		5	4.6	0.90	0.28
		10	3.7	1.90	0.35

IV. Antigenic and immunogenic activity of the oral rabies vaccine from the Vnukovo-32/107 strain. Experiments in red fox and polar fox. Primovaccination

Animals		Dose of vaccine MICLD <sub>50</sub>	Titer of antibodies on 28th day ED <sub>50</sub>	Challenge on 180th day after vaccination			
Species	number			performance	surviving	deaths	incubation period
Red fox	1	10 <sup>6.9</sup>	35.8	+	+	-	51
	2	10 <sup>6.9</sup>	36.7	+	+	-	
	3	10 <sup>6.9</sup>	5.3	+	-	+	
	4	10 <sup>6.9</sup>	37.6	+	+	-	
	5	10 <sup>6.9</sup>	23.4	+	+	-	
	6	10 <sup>6.9</sup>	27.8	+	+	-	
	7	10 <sup>6.9</sup>	23.2				
	8	10 <sup>6.9</sup>	26.4				
	9	10 <sup>6.9</sup>	34.5				
	10	10 <sup>6.9</sup>	5.7				
	11	10 <sup>6.9</sup>	37.8				
	12	10 <sup>6.9</sup>	27.9				
Average			26.8	6	5	1	51
Polar fox	1	10 <sup>6.9</sup>	35.4	-			
	2	10 <sup>6.9</sup>	22.9	-			
	3	10 <sup>6.9</sup>	12.9	-			
	4	10 <sup>6.9</sup>	17.9	-			
	5	10 <sup>6.9</sup>	37.2	-			
	6	10 <sup>6.9</sup>	25.6	-			
	7	10 <sup>6.9</sup>	16.3	-			
	8	10 <sup>6.9</sup>	5.4	-			
	9	10 <sup>6.9</sup>	27.9	-			
	10	10 <sup>6.9</sup>	34.2	-			
	11	10 <sup>6.9</sup>	29.3	-			
	12	10 <sup>6.9</sup>	19.7	-			
	13	10 <sup>6.9</sup>	32.4	-			
	14	10 <sup>6.9</sup>	7.9	-			
	15	10 <sup>6.9</sup>	35.1	-			
Average			24.0				
Total			25.3	6	5	1	51

Animals		Dose of vaccine MICLD <sub>50</sub>	Titer of antibodies on 28th day ED <sub>50</sub>	Challenge on 180th day after revaccination			
Species	number			performance	surviving	deaths	incubation period
Red fox	7	10 <sup>6.5</sup>	48.2	+			
	8	10 <sup>6.5</sup>	45.6	0			
	9	10 <sup>6.5</sup>	45.2	+			
	10	10 <sup>6.5</sup>	25.4	+			
	11	10 <sup>6.5</sup>	62.3	+			
	12	10 <sup>6.5</sup>	45.2	+			
Average			45.2	5	5		
Polar fox	1	10 <sup>6.5</sup>	42.1				
	2	10 <sup>6.5</sup>	39.6				
	3	10 <sup>6.5</sup>	21.2				
	4	10 <sup>6.5</sup>	18.6				
	5	10 <sup>6.5</sup>	41.2				
	6	10 <sup>6.5</sup>	37.6				
	7	10 <sup>6.5</sup>	35.1				
	8	10 <sup>6.5</sup>	18.9				
	9	10 <sup>6.5</sup>	45.2				
	10	10 <sup>6.5</sup>	61.4				
	11	10 <sup>6.5</sup>	42.7				
	12	10 <sup>6.5</sup>	37.2				
	13	10 <sup>6.5</sup>	50.4				
	14	10 <sup>6.5</sup>	19.3				
	15	10 <sup>6.5</sup>	53.2				
Average			37.6				
Total			39.8	5	5		

Red fox No. 8 died on 245th day after primovaccination

The results from Tab. IV indicate that out of the six challenged common foxes (orally vaccinated 180 days ago) during the period of observation one fox (No. 3) died. It died on 51st day after challenge, it fell clinically ill on 49th day (the symptoms of paralytic form of rabies). Control foxes (non-vaccinated) KL-1, KL-2 died on 21st–25th day after infection. Another five experimental vaccinated and challenged common foxes did not fall ill and on 90th day after infection they were killed.

On 180th day after revaccination the challenge was also performed in five common foxes. During the period of observation no vaccinated fox died (Tab. V). Control (non-vaccinated) foxes – KL-3, KL-4 died on 22nd–27th day after vaccination.

Rabies antigen was detected by DIFT in impression smears from the brain of dead fox No. 3 and also in control foxes – non-vaccinated (KL-1–KL-4). Rabies antigen was also detected in submandibular salivary glands in four non-vaccinated control foxes. The results of the rabies virus isolation by intracerebral MIT in suckling mice were the same. Control postmortal examination (detection of rabies antigen, virus isolation) in vaccinated animals, which survived the challenge showed negative results.

## DISCUSSION

With regard to the fact that oral vaccination (Wanderer, 1991) is the sole promising method of antirabies immunization of free-living common foxes (or other reservoir carnivores) a number of its specificities must be taken into account. The basic problem is that the live vaccines are effective only when they are applied orally while their enteric application fails to induce the desired effect. These problems, together with some others, were also investigated by our laboratory (Švrček, 1975; Švrček and Vrtiak, 1975; Švrček et al., 1977, 1978, 1980a, b, 1982; Ondrejka, 1984). Summarized results were published in additional recent publications (Švrček et al., 1993, 1994).

Presently, the oral rabies vaccination of free-living common fox in Europe is carried out in several states (Stöhr et al., 1990; Stöhr and Meslin, 1994) and is evaluated as a technically feasible, highly effective, ecologically harmless method of control of „fox“ rabies. Several problems however remain to be solved. The criteria of harmlessness and effectiveness of oral rabies vaccines (in the form of recommendations) formulated by WHO (1989, 1990, 1992) and described in

detail and documented by W a n d e l e r (1991) are exceedingly demanding. However, the quantitative methodical procedures of oral vaccine effectiveness evaluation have not been standardized yet.

Special importance is ascribed to the selection of suitable vaccination strain. This concerns most of all the definition of the residual virulence towards target and non-target animal species. This problem is discussed separately in the paper published in parallel (Š v r ě c k et al., 1994). Evaluation of immunogenic and antigenic activity represents still another problem.

The development of the oral antirabies vaccine was carried out using the strain Vnukovo-32 on the level of the 107th serial passage (Š v r ě c k et al., 1980, 1982). This study presents some results of determination of immunogenic and antigenic activity of the experimental live oral tissue culture rabies vaccine prepared from the mentioned highly attenuated strain. The experiments were carried out partly as model experiments on white mice and mainly on the target species – common fox and the related species – farmed polar fox. Additional results of studies of this problem are presented in some other publications; part of them referred to in this paper.

The first part of the study was aimed at the determination of immunogenic and antigenic activity of the experimental oral rabies vaccine obtained by means of the strain Vnukovo-32/107 in experiments on mice immunized orally or subcutaneously. Our own methodical procedures were used to quantify these parameters. Presented results indicate that the vaccine from the strain Vnukovo-32/107 exhibits satisfactory immunogenic and antigenic activity.

In addition to that, the strain Vnukovo-32/107 is used to produce an inactivated non-concentrated as well as concentrated purified vaccine for human purposes (S e l i m o v and A k s e n o v a, 1965; N i k i t i n a and S e l i m o v, 1969; S e l i m o v et al., 1978; S e l i m o v, 1978, 1985, 1987). This strain, on the level of the 107th serial passage (Vnukovo-32/107), has been used for almost 20 years by Bioveta Ivanovice na Hané to produce a live cellular vaccine for all species of domestic animals (V r z a l et al., 1988) and recently also to produce inactivated vaccines. These vaccines exhibit high immunogenic and antigenic activity. The suitability of the strain Vnukovo-32 for production of an oral vaccine was experimentally confirmed (apart from our laboratory) by other authors (S e l i m o v et al., 1987, 1992; M a t o u c h et al., 1988).

With regard to the need of relatively long storage of live vaccination virus (in the course of the technological process, storage of prepared baits before their distribution and after putting them out in the field) and some specificities of tenacity of the rabies virus (M a t o u c h et al., 1987) another experimental series was carried out in our laboratory. The experiments performed on mice, using two batches of experimental live oral vaccine, served to verify the influence of the thermal regime of storage on the virus titer and immunogenic

activity of the vaccine. Two methodical procedures developed in our laboratory were used to quantify the immunogenic activity at subcutaneous and oral applications. A suspension of the vaccination strain Vnukovo-32/107 was preserved by adding 10% of egg yolk. Results indicate that the repeated freezing and defreezing of the vaccine is undesirable. The long-term storage at 20 °C decreases considerably the vaccination virus titer and immunogenic activity of the vaccine at oral applications; the decrease is less pronounced at subcutaneous immunization.

It is generally accepted knowledge that the virus titer in a standard volume of vaccine frequently represents a limiting factor (M a t o u c h et al., 1988; W a n d e l e r, 1991; D e d e k et al., 1993).

A substantial portion of experiments (the third), the results of which are presented in this study, concerning evaluation of immunogenic and antigenic activity of the live vaccine in the form of vaccination baits at oral applications (conditions simulating vaccination in the field), was carried out on common and farm-bred polar fox. Immunogenic activity (challenge experiments with the street virus on days 180 and 360 after vaccination) was evaluated in experiments on common fox. Results of our experiments point to the suitable immunogenic and antigenic activity of experimental live oral vaccine from the strain Vnukovo-32/107. They correspond to the results of experiments of other authors (M a t o u c h et al., 1988; S e l i m o v et al., 1987, 1992) or results of verification of the effectiveness of oral vaccines prepared from other vaccination strains (S t e c k et al., 1982; D e d e k et al., 1993; A r t o i s et al., 1993).

Our results indicate a suitable immunogenic and antigenic activity of experimental live oral antirabies vaccine from the strain Vnukovo-32/107 as well as its good stability. This strain is suitable for industrial production of vaccination baits. However, the target species – common fox – challenged on day 180 after primary vaccination exhibited 83% protection of vaccinated individuals. The challenge of foxes carried out on day 180 after revaccination (or on day 360 after primary vaccination) revealed 100% protection of orally immunized foxes.

Determination of the effectiveness and quantification of oral antirabies vaccines is relatively complex. Methodical procedures have not yet been standardized. The effectiveness of vaccine applied directly to the mouth cavity mucous membrane is different from that at application by means of vaccination baits; vaccination baits containing (theoretically) higher than the 100% protection dose (if applied directly) ensure protection of only 50% of the vaccinated foxes against the subsequent challenge (A r t o i s et al., 1994). The value of antirabies antibody titer is an accepted parameter of the protective activity of vaccines (N a t h a n s o n and G o n z a l e s - S c a r a n o, 1991). However, it is difficult to determine accurately the value of the titer of antirabies antibodies which ensures the protection.

The defining of protective activity of vaccines in general and oral antirabies vaccine in particular by means of challenge trials on the target species raises several problems. Besides questions of economic and technical character an extraordinary accent is put on ethical problems. However, the performed challenge experiments are inevitable for the development of new vaccines.

In the process of continuous evaluation of immunogenic activity of the oral vaccine we recommend to use the quantitative test on mice (Švrček et al., 1984) and for the antibody titration to employ the ELISA technique. For this purpose we have developed a suitable kit (Švrček et al., 1988, 1992; Šüliová et al., 1990, 1992).

The development of vaccination baits for oral antirabies immunization in Slovakia has come to an end. At the present the strain Vnukovo-32/107 is used in Mevak Nitra for an industrial production of oral vaccine registered under the brand name Kamark. The results of evaluation of the two-year use of this vaccine under the conditions of Slovakia were presented in our previous paper (Švrček et al., 1994). Within the planned control investigations, besides other performed tests, the detection and quantification of antirabies antibodies was carried out in 158 foxes shot in vaccination zones. Antibodies were detected in 59.4% of the investigated animals. The vaccine complies with valid requirements of WHO on oral antirabies vaccines.

## REFERENCES

- ARTOIS, M. – MASSON, E. – BARRAT, J. – AUBERT, M. F. A.: Efficacy of three oral rabies vaccine-baits in the red fox: a comparison. *Vet. Microbiol.*, 38, 1993: 167–172.
- 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.
- AUBERT, M.: Control of rabies in foxes: what are the appropriate measures? *Vet. Rec.*, 134, 1994: 55–59.
- BLANCOU, J. – AUBERT, M. F. A. – ARTOIS, M.: Fox rabies. In: BAER, G. M. (ed.): *The natural history of rabies*. 2nd ed. Boca Raton, CRC Press 1991: 257–290.
- 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.
- DEBBIE, J. G.: Rabies control of terrestrial wildlife by population reduction. In: BAER, G. M. (ed.): *The natural history of rabies*. 2nd ed. Boca Raton, CRC Press 1991: 477–484.
- DEDEK, L. – MATOUCĎ, O. – VRZAL, V. – KAPPELER, A.: Vakcíny k orální imunizaci lišek proti vzteklině. *Veterinářství*, 43, 1993: 368–370.
- 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.
- MATOUCĎ, O. – JAROŠ, J. – POHL, P.: Přežívání viru vztekliny ve vnějších podmínkách. *Vet. Med. (Praha)*, 32, 1987: 669–674.
- MATOUCĎ, O. – JAROŠ, J. – POHL, P. – VRZAL, V.: Orální vakcinace lišek proti vzteklině vakcínou Vnukovo. *Veterinářství*, 38, 1988: 540–542.
- MATOUCĎ, O. – JAROŠ, J.: Tlučení vztekliny orální vakcinační lišek v ČR. *Veterinářství*, 42, 1992: 446–449.
- NATHANSON, N. – GONZALES-SCARANO, F.: Immune response to rabies virus. In: BAER, G. M. (ed.): *The natural history of rabies*. 2nd ed. Boca Raton, CRC Press 1991: 145–162.
- NIKITINA, L. F. – SELIMOV, M. A.: Attenuirovannyj v kulture tkani vakcinnyj virus bešenstva (štamm Vnukovo), jeho biologičeskaja charakteristika. In: *Zbor. Symp. IPVE AMN po bešenstvu*. Moskva, IPVE AMN 1969: 68–79.
- REED, L. J. – MUENCH, H.: A simple method of estimating 50 per cent and points. *Amer. J. Hyg.*, 27, 1938: 493–498.
- RUDD, R. J. – TRIMATCHI, 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 dostiženija v oblasti rabologii. VNIIMMTI Moskva, 1987. 70 p.
- SELIMOV, M. A. – AKSENOVA, T. A. – KLUEVA, E. V. – GRIBENCHA, 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.
- SELIMOV, M. A. – KARATAJEVA, T. D. – AKSENOVA, T. A.: Orafnaja imunizacija pescov živoj tkanevo-kulturnoj antirabičeskoj vakcinoy iz štamma Vnukovo-32. *Vopr. Virusol.*, 32, 1987a: 622–623.
- SELIMOV, M. A. – KARATAJEVA, T. D. – BARASKOV, A. N. – POLJAKOV, A. V. et al.: Pervyj ograničennyj polevoj opyt oraľnoj antirabičeskoj imunizacii pescov v Jakutskoj ASSR. In: *Proc. Voprosy regionalnoj gigieny, sanitarii i epidemiologii*. Jakutsk, MZ JaASSK 1987b: 156–158.
- SELIMOV, M. A. – KARATAJEVA, T. D. – BARASKOV, A. N. – VASILEV, A. P. et al.: Orafnaja antirabičeskaja imunizacija kletočnych pescov... vakcinoy iz štamma Vnukovo-32. In: *Proc. Voprosy regionalnoj gigieny, sanitarii i epidemiologii*. Jakutsk, MZ JaASSK 1987c: 153–156.
- SELIMOV, M. A. – NOGINOV, V. K. – ŠMAKOVA, A. A. – AKSENOVA, T. A. – KULIKOVA, L. G.: Orafnaja antirabičeskaja imunizacija enotivnych sobak. In: *Proc. Voprosy regionalnoj gigieny, sanitarii i epidemiologii*. Jakutsk, MZ JaASSK 1987d: 159–161.
- SELIMOV, M. A. – CHOZINSKI, V. V. – DOLŽANOV, P. B. – AKSENOVA, T. A. – MAČITIDZE, C. Z.: Živaja antirabičeskaja vakcina Vnukovo-32. In: *Proc. Meždunar. Symp. Probl. patologii i ochrany zdorovja dikich životnych, Astrachaň*. Moskva, FNTO Seľskogo chozjajstva 1992: 44–47.
- 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. – KARGE, E. – LOPELMANN, F. – LOPELMANN, H. – GEBAUER, R. – DEDEK, J. – HÄHN, J.: Die Entwicklung des Impfköders für die orale Immunisierung freilebender Füchse gegen Tollwut, *Mh. Veter.-Med.*, 45, 1990: 65–69.
- STÖHR, K. – MESLIN, F. X.: Development of oral vaccination in Europe. In: Proc. IVth Concentr. Meeting WHO, OIE on rabies control in Europe. Piešťany, 6–7 Okt. 1993 (in press).
- STÖHR, K.: Fifteen years of oral vaccination in EUROPE. In: Proc. WHO Rabies Conf. Pulawy, 27–28 Jan. 1994 (in press).
- SÜLIOVÁ, J. – BENÍŠEK, Z. – ŠVRČEK, Š. – VRTIAK, O. J. – ZÁVADOVÁ, J. – FEJFAR, V. – ONDREJKA, R. – MLYNARČIKOVÁ, K.: Utilization of ELISA method for quantification of rabies antibody. Zoonoses. In: Proc. Congress with International Participation. Brno, 1988: 5–6.
- SÜLIOVÁ, J. – ŠVRČEK, Š. – BENÍŠEK, Z. – VRTIAK, O. J. – ZÁVADOVÁ, J. – FEJFAR, V.: ELISA test pre kvantifikáciu antirabických protilátok. In: Zbor. XVII. Ved. Konf. VŠV Aktívne zdravie – základ produkcie a reprodukcie zvierat. Košice, VŠV 1989: 36–37.
- ŠVRČEK, Š.: Štúdium patogenézy a imunoprofylaxie lyssy. [Habilitationná práca.] Košice, 1975. 212 p. – Vysoká škola veterinárska.
- ŠVRČEK, Š.: Orálna vakcinácia líšok proti besnote. Metodické pokyny. Bratislava, ŠVS SR, 1994. 20 p.
- ŠVRČEK, Š. – VRTIAK, O. J.: Vozmožnosti orálnej antirabičskej imunizácie divých plotojadných. In: Proc. 20th World Vet. Congr., Thessaloniki, 1975: 2459–2460.
- ŠVRČEK, Š. – VRTIAK, O. J.: Modifikácia količestvenného metóda IPVE dlja opredelenija imunogennoj aktivnosti antirabičeskich vakcin v opyte na myšach. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, 28, 1980: 43–46.
- 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. – GOLY, L. – ĎURAN, A. – BAJOVÁ, V.: Experimentálne predposylky i technika orálnej antirabičskej imunizácie divých plotojadných. *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.: Perspektiven der peroralen 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 lyssy obyčonnej (*Vulpes vulpes*, L.) v ekologii vírusa 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 antirabických vakcín k orálnej imunizácii. In: *Zbor. Ref. Vet. Vedy a Prax – 5. Symp. o besnote*. Košice, 1984: 62–63.
- ŠVRČEK, Š. – VRTIAK, O. J. – ĎUROVE, A. – ONDREJKA, R. – ZÁVADOVÁ, J. et al.: Orálna antirabická vakcína, overenie jej účinnosti a neškodnosti, predbežné výsledky terénneho použitia. [Záverčná správa]. Košice, UVL a Nitra, Mevak 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. – 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. *Vet. Med. – Czech*, 40, 1995: 53–64.
- ŠVRČEK, Š. – SOKOL, J. – ĎUROVE, A. – SÜLIOVÁ, J. – ONDREJKA, R. – ZÁVADOVÁ, J. – BENÍŠEK, Z. – LÁNI, D. – SELIMOV, M. A. et al.: Epizootological situation and control of rabies in the Slovak Republic. In: Proc. WHO Rabies Conf., Pulawy, 27–28 Jan. 1994 (in press).
- VRZAL, V. – CHUMELA, J. – ZATLOUKAL, L. – ČUPERÁ, Z.: Historie, současný stav a vývoj imunoprofylaxie vztekliny v ČSSR. *Veterinářství*, 38, 1988: 358–359.
- VRZAL, V. – DEDEK, L. – MATOUCH, O. – KAPPELER, A.: Imunogenní a protekční schopnost vakcíny proti vzteklině k orální imunizaci líšek. *Veterinářství*, 43, 1993: 370–372.
- WANDELER, A. I.: Rabies virus. In: APPEL, M. J. (ed.): *Virus infections of carnivores*. Amsterdam, Elsevier Sci. Publ. 1987: 449–462.
- 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).
- WHO Expert Committee on rabies. Eighth report, WHO Technical Report Series, No 824. Geneva, WHO 1992. 89 p.
- WIKTOR, T. J.: Tissue culture methods. In: KAPLAN, M. M. – KOPROWSKI, H. H. (eds.): *Laboratory techniques in rabies*. 3rd ed. Geneva, WHO 1973: 101–123.
- ZÁVADOVÁ, J. – ŠVRČEK, Š. – SÜLIOVÁ, J. – MANDELÍK, M. et al.: Zdokonalenie laboratórnej diagnostiky besnoty a titrácie vírusu besnoty. [Záverčná správa.] Košice, Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny 1993. 53 p.

Arrived on 5th August 1994

*Kontaktná adresa:*

Prof. MVDr. Štefan Š v r č e k, CSc., Rabiologické laboratórium University veterinárskeho lekárstva a Ústavu experimentálnej veterinárnej medicíny, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika  
Tel. 095/321 11–5, 095/71 94 62, fax 095/76 76 75

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 Hoffrek, 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 Vězník, 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, CAB 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, CAB 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).

NÁRODNÍ KNIHOVNA



1 000931352

# VETERINARY MEDICINE – CZECH

---

Volume 40, No. 3, March 1995

## CONTENTS

Žitňan R., Sommer A., Gallo M., Gallo J., Bomba A., Venglovský J., Buleca J., Bindas L.: Mineral metabolism in young beef cattle during transfer from winter feed ration to grazing .....	65
Hejlíček K., Tremf F., Černý L.: Incidence of allergic reactions in small flocks of fowl and pathogenesis of avian mycobacteriosis in the domestic fowl.....	71
Literák I.: Prevalence of antibodies to <i>Coxiella burnetii</i> in cattle, sheep and small ground mammals in the region of Western Bohemia.....	77
Pavlásek I., Hess L., Stehlík I., Štika V.: The first findings of <i>Giardia</i> spp. in horses in the Czech Republic .....	81
Švrček Š., Ďurove A., Ondrejka R., Závadová J., Süliová 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 .....	87

## VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

---

Ročník 40, č. 3, Březen 1995

## OBSAH

Žitňan R., Sommer A., Gallo M., Gallo J., Bomba A., Venglovský J., Buleca J., Bindas L.: Minerální metabolismus mladého výkrmového dobytka v období přechodu zo zimnej krmnej dávky na pašu .....	65
Hejlíček K., Tremf F., Černý L.: Výskyt alergických reakci v malochovech drúbeže a patogeneze aviární mykobakteriôzy kura domácího .....	71
Literák I.: Výskyt protilátok proti <i>Coxiella burnetii</i> u skotu, ovci a drobných zemních savců v západních Čechách .....	77
Pavlásek I., Hess L., Stehlík I., Štika V.: První nálezy <i>Giardia</i> spp. u koní v České republice....	81
Švrček Š., Ďurove A., Ondrejka R., Závadová J., Süliová J., Beníšek Z., Vrtiak O. J., Feketeová J., Maďar M.: Imunogénna a antigénna aktivita experimentálnej orálnej antirabickej vakcíny z kmeňa Vnukovo-32/107.....	87

---

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA ● Vydává Ústav zemědělských a potravinářských informací ● Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/25 75 41, fax: 02/25 70 90 ● Sazba: Studio DOMINO – ing. Jakub Černý, Pražská 108, 266 01 Beroun, tel.: 0311/240 15 ● Tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1995

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