

ÚZPI

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

# VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

5

VOLUME 40 (LXVIII)  
PRAHA  
MAY 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 Herzog, CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

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

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

Prof. MVDr. Zdeněk Věžík, 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).

# THE EFFECT OF VIRGINIAMYCIN ON RUMEN FERMENTATION *IN VITRO* AFTER ADAPTATION OF INOCULUM DONORS

## ÚČINEK VIRGINIAMYCINU NA BACHOROVOU FERMENTACI *IN VITRO* PO ADAPTACI DONORU INOKULA<sup>\*)</sup>

M. Marounek<sup>1</sup>, V. Skřivanová<sup>2</sup>, J. Šimůnek<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Praha-Uhřetěves, Czech Republic*

<sup>2</sup> *Research Institute of Animal Production, Praha-Uhřetěves, Czech Republic*

**ABSTRACT:** Virginiamycin is an antibiotic active against grampositive bacteria in the alimentary tract, which is also suitable for supplementation of diets of growing and finishing ruminants. The aim of this work was to specify the effect of virginiamycin on some parameters of rumen fermentation *in vitro* with inoculi taken from wethers adapted or non-adapted to the virginiamycin intake. Incubations were performed anaerobically at 39 °C in serum bottles closed with Bunsen valves. Virginiamycin was added at 0 or 10 mg/l to the rumen fluid diluted with McDougall buffer. Virginiamycin significantly decreased production and utilization of lactic acid, production of methane and decomposition of casein when rumen fluid was taken from non-adapted wethers. Most of its effects disappeared when rumen fluid was sampled from wethers adapted to the virginiamycin intake (100 mg per head daily for 2 months). Adaptation of wethers to virginiamycin was further confirmed by analyses of the rumen fluid which was used for inoculation of *in vitro* cultures. Molar percentages of acetate, propionate, butyrate and valerate were the same before and after the adaptation. Therefore it can be concluded that the effects of virginiamycin on rumen parameters are not stable and its addition to ruminant diets cannot be recommended, with exception of the milk nutrition period. In the last experiment the stability of virginiamycin in the rumen fluid of adapted wethers was investigated. The rumen fluid was diluted with buffer containing glucose and virginiamycin (10 mg/l, final conc.) and incubated in the LF2 fermentor at pH = 6.5. Samples taken at 0, 3, 6 and 9 h were centrifuged and cell-free supernatant was added to the MRS nutrient broth inoculated with *Bacillus stearothersophilus* 794B. Inoculated cultures of this indicator organism were incubated overnight. It was found that the antibiotic activity was stable within 9h incubation interval and, thus, a resistance mechanism other than the direct inactivation of virginiamycin existed in virginiamycin-adapted wethers.

wether; rumen fermentation; virginiamycin; adaptation

**ABSTRAKT:** Při inkubacích bachorové tekutiny skopců virginiamycin (krmné antibiotikum) o koncentraci 10 mg/l významně snížil produkci i využití kyseliny mléčné, tvorbu metanu a štěpení kazeinu. Po adaptaci skopců na příjem virginiamycinu zmíněné účinky nebyly pozorovány, vyjma omezeného vlivu na využití kyseliny mléčné. Usuzujeme, že bachorová mikroflóra se na příjem virginiamycinu adaptuje, což činí jeho použití u přežvýkavců s rozvinutým bachorovým trávením problematické. Na adaptaci mikroflóry ukazuje i stejné molární složení těkavých mastných kyselin v bachorové tekutině skopců před adaptací na virginiamycin a po ní. Adaptační efekt pravděpodobně nespočívá v inaktivaci antibiotika mikroflórou. Zjistili jsme, že v průběhu devítihodinové inkubace bachorové tekutiny adaptovaných skopců s přídatkem virginiamycinu byla aktivita antibiotika vůči indikátorové bakterii *Bacillus stearothersophilus* stálá.

skopec; bachorová fermentace; virginiamycin; adaptace

### ÚVOD

Virginiamycin je osvědčené krmné antibiotikum pro monogastrická zvířata, které lze s úspěchem uplatnit i ve výživě telat. Do značné míry splňuje požadavky na moderní krmná antibiotika, protože kromě účinků růstově stimulačních vyhovuje i požadavkům hygienickým. Jen v malé míře je resorbován z trávicího ústrojí,

nezanechává rezidua ve tkáních a nedochází k přenosu rezistence na patogenní bakterie. Použitím virginiamycinu u telat se zabývá několik autorů, např. Daenicke (1988), Skřivanová a Marounek (1993), Marounek aj. (1992) a Skřivanová aj. (1994). Otázkou zůstává použití virginiamycinu u přežvýkavců s již vyvinutým bachorovým typem trávení, doporučované výrobcem (Delforge, 1988) a v omezené míře

<sup>\*)</sup> Tato práce vznikla díky podpoře z grantu č. 505/93/1283 Grantové agentury AV ČR.

publikované v odborné literatuře (Boucq ue aj., 1990; Kraszewski aj., 1993). V pokusech *in vitro* s bachorovou tekutinou jsme totiž zjistili, že účinek virginiamycinu na bachorovou fermentaci závisí na tom, byl-li virginiamycin pokusným zvířatům pravidelně podáván či nikoliv (Marounek a Skřivanová, 1993).

Cílem níže popsáných experimentů bylo zjistit účinek virginiamycinu na metabolismus kyseliny mléčné, proteolýzu a tvorbu metanu v bachorové tekutině skopců adaptovaných či neadaptovaných na příjem virginiamycinu. Dále jsme chtěli zjistit stabilitu virginiamycinu v bachorové tekutině adaptovaných skopců. Adaptace zvířat a s ní spojená stálost účinku krmných antibiotik má podle našeho názoru pro jejich použití zásadní význam.

## MATERIÁL A METODY

### POKUSNÁ ZVÍŘATA

K pokusům byli použiti dva skopci o hmotnosti asi 60 kg, opatření bachorovou píštělí. Skopci byli krmení koncentrátem, kukuřičnou siláží a vojtěškovým senem dvakrát denně. Adaptace skopců byla provedena po ukončení první části pokusů podáváním 200 mg 50% virginiamycinu denně po dobu dvou měsíců. Virginiamycin byl podáván *per os* v želatinové kapsli po ranním krmení. Bachorová tekutina byla odebrána dvě hodiny po ranním krmení. Virginiamycin byl v tomto případě podán až po odběru.

### INKUBACE

INKUBACE  
Inkubace probíhaly při teplotě 39 °C za anaerobních podmínek. V prvním pokusu byl zjištěn vliv virginiamycinu na produkci kyseliny mléčné, ve druhém vliv na její utilizaci, ve třetím vliv na štěpení proteinu a ve čtvrtém pokusu vliv na produkci metanu. K pokusům byly použity infuzní lahve uzavřené Bunsenovými ventilkami. Každé pokusné či kontrolní uspořádání bylo inkubováno čtyřikrát. Pokusné kultury obsahovaly virginiamycin (Smith Kline Beecham) ve výsledné koncentraci 10 mg/l. Inkubace probíhaly při fyziologických hodnotách pH 6–7, kromě pokusu č. 2 (pH 5–6). Doba inkubace byla 8 hodin, v pokusu č. 4 pak 12 hodin.

### Pokus č. 1

Substrátem pro bachorové mikroorganismy byl laktát sodný rozpuštěný v McDougallově pufru (100 ml) tak, aby po přídatku 50 ml bachorové tekutiny jeho počáteční koncentrace činila 50 mmol/l.

### Pokus č. 2

Substrátem byla sacharóza (1,5 g) a škrob (3 g) přidáné k 100 ml McDougallova pufru a 50 ml bachorové tekutiny.

### Pokus č. 3

Substrátem byl kazein (0,3 g) a glukóza (0,75 g) přidáné k 100 ml McDougallova pufru a 50 ml bachorové tekutiny.

### Pokus č. 4

Substrátem byla směs CM-celulózy (2 g), škrobu (1 g), pektinu (1 g), glukózy (0,25 g) a sušených kvasnic (0,25 g). Objem pufru činil 140 ml a přídatek bachorové tekutiny 70 ml. Místo 300 ml infuzních lahví užitých v předchozích pokusech, byly použity větší o objemu 500 ml. Po inokulaci a promytí volného prostoru lahvi CO<sub>2</sub> byly tyto hermeticky uzavřeny a inkubovány.

### Pokus č. 5

Účelem tohoto pokusu bylo zjistit stabilitu virginiamycinu v bachorové tekutině adaptovaných skopců. K inkubaci bachorové tekutiny (600 ml) zředěné puftrem (1 200 ml) byl použit fermentor LF2 z Vývojových dílen AV ČR vybavený mechanickým míchadlem, regulací otáček, pH a teploty. Substrátem bylo 18 g glukózy. Virginiamycin byl přidán v množství 10 mg/l. Z fermentoru byly odebrány vzorky v časech 0, 3, 6 a 9 hodin inkubace při pH = 6,5 za účelem zjištění aktivity antibiotika a produkce těkavých mastných kyselin (TMK).

### ANALÝZY

Koncentrace kyseliny mléčné byla zjištěna oximetricky v mikrodifuzních nádobkách (Conway, 1957), protein kolorimetrickou metodou (Lowry, 1951) a TMK titračně, po vydestilování vodní párou. Produkce metanu byla zjištěna po změření tlaku v inkubačních nádobách a stanovení metanu ve vzniklém plynu na plynovém chromatografu s detektorem FID. Metoda byla kalibrována standardní směsí plynů, získanou ve VŠCHT Praha. K detekci antibiotické aktivity byl použit *Bacillus stearothermophilus* 794 B, který je součástí soupravy Intest z podniku Mlékárny Klatovy. Vzorek inkubační kapaliny z fermentoru byl odstředěn a bezbuněčný supernatant přidán do živného média MRS (Oxid) v množství 25, 50 a 100 µl na 10 ml. Inokulovaná média byla inkubována přes noc při teplotě 60 °C, pak změřena optická denzita kultur při 640 nm a zkontrolována jejich čistota.

Statistická významnost rozdílů byla hodnocena *t*-testem.

I. Účinek virginiamycinu na metabolismus kyseliny mléčné, rozklad kazeinu a produkci metanu v bachorové tekutině *in vitro* – Effect of virginiamycin on metabolism of lactic acid, decomposition of casein and production of methane in the rumen fluid *in vitro*

Pokus č. <sup>1</sup>	Parametr <sup>2</sup>	Virginiamycin (mg/l)		P
		0	10	
a) neadaptovaní skopci <sup>3</sup>				
1	utilizace laktátu <sup>4</sup> (mmol/l)	34,9 ± 3,1	13,3 ± 3,6	<0,001
2	produkce laktátu <sup>5</sup> (mmol/l)	24,8 ± 5,9	14,1 ± 4,7	<0,05
3	rozklad kazeinu <sup>6</sup> (mg/l)	845 ± 39	430 ± 48	<0,001
4	produkce metanu <sup>7</sup> (mmol/l)	51,0 ± 5,6	37,9 ± 1,9	<0,01
b) adaptovaní skopci <sup>8</sup>				
1a	utilizace laktátu (mmol/l)	28,3 ± 2,9	21,7 ± 1,7	<0,05
2a	produkce laktátu (mmol/l)	27,2 ± 1,6	29,4 ± 1,4	NS
3a	rozklad kazeinu (mg/l)	621 ± 183	556 ± 101	NS
4a	produkce metanu (mmol/l)	37,4 ± 6,3	32,5 ± 4,1	NS

Průměry čtyř inkubací ± SD – means of four incubations ± SD

NS = nesignifikantní rozdíl – nonsignificant difference

<sup>1</sup>experiment no., <sup>2</sup>parameter, <sup>3</sup>non-adapted wethers, <sup>4</sup>utilization of lactate, <sup>5</sup>production of lactate, <sup>6</sup>decomposition of casein, <sup>7</sup>production of methane, <sup>8</sup>adapted wethers

## VÝSLEDKY

Výsledky jsou v tab. I uvedeny zvlášť pro neadaptovanou a adaptovanou zvířata. V bachorové tekutině neadaptovaných skopců virginiamycin významně snížil produkci i využití kyseliny mléčné, metanogenezi a degradaci kazeinu. V bachorové tekutině adaptovaných skopců účinky virginiamycinu nebyly zjištěny, přetrvál pouze omezený vliv na využití kyseliny mléčné.

Při inkubaci bachorové tekutiny adaptovaných skopců s virginiamycinem byla aktivita antibiotika v devítihodinovém časovém intervalu stabilní (tab. II). Nepotvrdil se předpoklad, že aktivita antibiotika v průběhu inkubace klesne natolik, že dovolí růst indikátorové bakterie *B. stearothermophilus*. Pokus byl několikrát opakován se stejným výsledkem. Ve fermentoru byla při inkubaci zaznamenána obvyklá produkce TMK, asi 70 mmol/l. Bachorová tekutina skopců (použitá k inkulacím) měla toto molární složení TMK (hodnoty po adaptaci v závorce): acetat – 64,74 % (64,82 %), propionát – 22,59 % (22,82 %), butyrát – 10,71 % (10,43 %), valerát – 1,70 % (1,83 %).

## DISKUSE

Naše předchozí pokusy ukázaly, že virginiamycin při fermentaci rostlinných sacharidů *in vitro* v bachorové tekutině snižuje celkovou produkci TMK a poměr acetat/propionát (Marounek a Skřivanová, 1993). Působí tudíž podobně jako jiná grampozitivní krmná antibiotika, např. monensin. Bylo-li však inkulacím vzato ze zvířat adaptovaných na příjem virginiamycinu, zmíněné účinky se neprojeví. V podstatě stejný závěr vyplývá i z výsledků obsažených v této práci. Názor, že bachorový mikrobiální systém se na příjem virginiamycinu může adaptovat potvrzuje i zjiš-

tění, že molární složení TMK bachorové tekutiny použité pro inkulaci bylo stejné před i po adaptaci skopců na virginiamycin. Adaptaci bachorových mikroorganismů na příjem krmného antibiotika jsme zaznamenali i v případě tylosinu (Chonaj, 1989), nikoliv však monensinu (Šimůnek aj., 1989). Adaptace mikroorganismů na virginiamycin nebyla spojena s destrukcí antibiotické aktivity, resp. rozklad virginiamycinu v intervalu 9 hodin byl malý (menší než 50 %). Je však známo, že mikroorganismy mají kromě přímé inaktivace i řadu dalších možností k získání rezistence vůči určité antimikrobiální látce (Davies, 1986). Možnost použití virginiamycinu jako krmného aditiva pro přežvýkavce proto podle našeho názoru zůstává omezena pouze na mláďata v období mléčné výživy.

## Poděkování

Autoři děkují ing. Lence Štrosové za stanovení aktivity virginiamycinu v inkubační tekutině.

II. Optická denzita kultur *Bacillus stearothermophilus* v závislosti na době inkubace bachorové tekutiny s virginiamycinem a velikosti přidávku inkubační tekutiny do živného média – Optical density of cultures of *Bacillus stearothermophilus* related to the time of incubation of rumen fluid with virginiamycin and to the size of incubation fluid addition to the nutrient broth

Přídavek inkubační tekutiny <sup>1</sup>	Doba inkubace bachorové tekutiny s virginiamycinem <sup>2</sup> (h)			
	0	3	6	9
25 µl/ml	1,4/1,0/1,0	1,6/1,1/1,2	1,4/1,5/0,9	0,6/1,3
50 µl/ml	0	0	0	0
100 µl/ml	0	0	0	0

<sup>1</sup>addition of incubation fluid, <sup>2</sup>time of incubation of rumen fluid with virginiamycin

## LITERATURA

- BOUCQUE, C. V. – FIEMS, L. O. – COTTYN, B. G. – BUYSSE, F. X.: Response to virginiamycin in finishing beef bulls fed a maize silage diet or a complete dry feed. *Arch. Anim. Nutr.*, 40, 1990: 475.
- CONWAY, E. J.: *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*. London, Crosby Lockwood and Son 1957.
- DAENICKE, R.: Zum Wirksamkeit des Leistungsförderers Stafac Virginiamycin in der Kälberaufzucht. *Rinderwelt*, 1988: 99–101.
- DAVIES, J.: A new look at antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.*, 39, 1986: 363–371.
- DELFORGE, J. L.: Stafac<sup>R</sup> Virginiamycin – the New Cattle Performance Enhancer. Brussels, Smith Kline – AHP 1988.
- CHON, S. B. – SAVKA, O. G. – BŘEZINA, P. – MAROUNEK, M.: Effect of tylosin on rumen fermentation *in vitro*. *Acta Vet. (Brno)*, 58, 1989: 313–321.
- KRASZEWSKI, J. – WAWRZYNCZAK, S. – BLAZIAK, S.: Suitability of virginiamycin as supplement in feeding dairy cows. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 20, 1993: 101–106.
- LOWRY, O. H. – ROSEBROUGH, N. J. – FARR, A. L. – RANDALL, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 1951: 265–275.
- MAROUNEK, M. – SKŘIVANOVÁ, V.: Effect of virginiamycin on production of volatile fatty acids from starch, cellulose, hemicellulose and pectin in mixed cultures of rumen microorganisms. In: FLACHOWSKY, G. – SCHUBERT, R.: Vitamine und weitere Zusatzstoffe bei Mensch und Tier. 4 Symposium, Friedrich-Schiller-Universität Jena, 1993: 277–281.
- MAROUNEK, M. – PODSEDNÍČEK, M. – PETR, O.: Effect of virginiamycin on performance and rumen parameters of young calves. *Živoč. Výr.*, 37, 1992: 721–726.
- SKŘIVANOVÁ, V. – MAROUNEK, M.: Effect of virginiamycin on feed intake, daily gains, ruminal volatile fatty acids and blood parameters in veal calves. *Arch. Anim. Nutr.*, 44, 1993: 41–46.
- SKŘIVANOVÁ, V. – MAROUNEK, M. – ŠIMUNEK, J. – BENDA, V.: Effect of virginiamycin on digestibility of nutrients, blood and immunologic parameters and quality of meat in veal calves. *J. Agric. Sci.*, 123, 1994: 275–278.
- ŠIMUNEK, J. – SAVKA, O. G. – KALACŇNĚK, G. I. – CHON, S. B.: Effect of monensin on production of volatile fatty acids from cellulose, hemicelluloses, pectin and starch in mixed cultures of rumen microorganisms. *Acta Vet. (Brno)*, 58, 1989: 215–223.

Došlo 9. 8. 1994

---

### Kontaktní adresa:

Doc. ing. Milan Marounek, DrSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, 104 00 Praha 10-Uhřetíněves, Česká republika  
Tel. 02/72 05 41, fax 02/75 91 82

---

# ANTIBODIES TO SOME INFECTIONS ON LARGE GOAT FARMS IN THE CZECH REPUBLIC

## PROTILÁTKY PROTI NĚKTERÝM INFEKČÍM VE VELKOCHOVECH KOZ V ČESKÉ REPUBLICE

I. Literák, M. Skřivánek, B. Skalka, V. Celer Jr.

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

**ABSTRACT:** On five newly established large goat farms the incidence of antibodies to some chronic and latent infections (arthritis and encephalitis, Q-fever, caseous lymphadenitis and toxoplasmosis) was investigated in the first six months of the year 1994. Agar-gel immunodiffusion did not reveal any antibodies to arthritis and encephalitis of goats (CAE). Complement fixation test did not demonstrate any antibodies to Q-fever. Neither agar-gel immunodiffusion nor neutralization test confirmed any antibodies to caseous lymphadenitis. Complement fixation test (titer 1 : 8 and more) revealed antibodies to toxoplasmosis at 20.2% of the cases. No clinical symptoms of toxoplasmosis were observed on the investigated goat farms. It was recommended to take a preventive serological examination of goats against CAE, Q-fever and caseous lymphadenitis before they were housed on the given farms. By maintaining high zoohygienic parameters on the large goat farms it is possible to expect a decrease in prevalence of antibodies to toxoplasmosis.

goats; antibodies; arthritis and encephalitis; Q-fever; caseous lymphadenitis; toxoplasmosis

**ABSTRAKT:** V pěti nově založených velkochovech koz byl v prvním pololetí roku 1994 sledován výskyt protilátek proti některým chronickým a latentním infekcím (artritida a encefalitida, Q-horečka, kazeózní lymfadenitida a toxoplazmóza). Celkem bylo vyšetřeno 247 sér od 225 koz. Prottilátky proti artritidě a encefalitidě koz (CAE) nebyly agar-gelovou imunodifuzí zjištěny. Prottilátky proti Q-horečce nebyly komplementfixační reakcí zjištěny. Prottilátky proti kazeózní lymfadenitidě nebyly zjištěny agar gelovou imunodifuzí ani neutralizačním testem. Proti toxoplazmóze byly prottilátky zjištěny komplementfixační reakcí (titr 1 : 8 a vyšší) v 20,2 %. Klinické příznaky toxoplazmózy nebyly u koz ve sledovaných chovech zaznamenány. Před naskladňováním nových koz do sledovaných velkochovů bylo doporučeno jejich preventivní sérologické vyšetření proti CAE, Q-horečce a kazeózní lymfadenitidě. Při zachování vysokých zoohygienických parametrů ve velkochovech koz lze očekávat snížení prevalence prottilátek proti toxoplazmóze.

kozy; prottilátky; artritida a encefalitida; Q-horečka; kazeózní lymfadenitida; toxoplazmóza

### ÚVOD

Efektivní provozování velkochovů koz, které jsou u nás v současné době zakládány, závisí na zdravotním stavu chovaných zvířat. Nezbytným předpokladem udržení zdravých stád koz je prevence infekčních chorob. Mezi nemoci, které se nemusí okamžitě po infekci klinicky projevit patří u koz artritida a encefalitida (CAE), Q-horečka, kazeózní lymfadenitida a toxoplazmóza. Ekonomické důsledky chronických infekcí nebo exacerbací latentních stavů vyvolaných původci těchto chorob však mohou být velmi vážné. V případě zoonóz (Q-horečka, toxoplazmóza) přistupuje navíc riziko ohrožení zdraví člověka.

CAE je celosvětově rozšířená infekce koz vyvolávaná lentiviry antigenně velmi podobnými původci Maedi-Visna u ovcí (Dahlberg aj., 1981). Klinicky se onemocnění projevuje zejména záněty kloubů, mastitidami, pneumonií, encefalitidou kůzlat (Crawford

and Adams, 1981). Vzhledem k výrazné antigenní příbuznosti viru Maedi-Visna a viru CAE je v sérologické diagnostice CAE standardně využíván antigen viru Maedi-Visna (Knowles aj., 1994). V některých západoevropských zemích (např. Francie) představuje CAE v chovech koz vážný problém (Vituro a Russo, 1988).

Q-horečka se dnes vyskytuje celosvětově v oblastech s příhodnými ekologickými podmínkami. Mezi tyto oblasti patří i území bývalého Československa (Rehák a Tarasevich, 1988). U koz se onemocnění může klinicky projevit bronchopneumonií, mastitidami a aborty. Častější jsou však latentní infekce. Vyšetření koz bylo dosud na území České republiky, na rozdíl od jiných druhů domácích zvířat, jen ojedinělé. Rehán a Radvan (1957) vyšetřili v KFR 19 koz s negativním výsledkem.

Kazeózní lymfadenitida (pseudotuberkulóza) je rozšířena v mnoha místech světa v oblastech s intenzivním

chovem malých přežvýkavců (Brown a Olander, 1987). Původce infekce *Corynebacterium pseudotuberculosis* způsobuje u koz chronické onemocnění doprovázené především abscedací superficiálních mizních uzlin. Z bývalého Československa je popsána jediná epizootie kazeózní lymfadenitidy koz (Dravec ký aj., 1986). Z České republiky je nově dokumentován případ tohoto onemocnění u ovcí (Literák aj., 1994). O rozšíření kazeózní lymfadenitidy v chovech koz v České republice nejsou dosud žádné dostupné informace.

Toxoplasmóza koz je v latentní formě rozšířena celosvětově (Dubey a Beattie, 1988). Pouze z některých oblastí (ne však z území České republiky) jsou popisovány klinické příznaky onemocnění – nejčastěji aborty. Z území bývalého Československa se zjištění této infekce u koz opírala o nálezy specifických protilátek nebo izolace *Toxoplasma gondii*. Koub a aj. (1974) uvádějí séroprevalenci KFR 27 % a izolaci *T. gondii* u čtyř z 10 jedinců. Hejlíček a Literák (1994) zjistili protilátky v KFR proti *T. gondii* u 21 % z 54 vzorků séra koz pocházejících z pěti malochovů v okrese Strakonice.

S cílem prohloubení prevence zmíněných nákaz jsme sérologicky vyšetřili kozy z několika nově založených velkochovů. Smyslem tohoto sdělení je pak informovat o nákazách, o jejichž výskytu u koz na našem území jsou zprávy dosud jen velmi nedostatečné.

## MATERIÁL A METODY

Vyšetřované kozy pocházely z pěti nově založených velkochovů. Přibližné celkové stavy koz v jednotlivých chovech, počty a termíny vyšetření jsou uvedeny v tab. I. V chovech č. 1, 2, 3 a 5 byly vyšetřovány dospělé kozy plemene koza bílá krátkosrstá. Tyto kozy pocházely z většího počtu malochovů v České republice. V chovu č. 4 byly vyšetřovány kozy kašmírové (pů-

I. Přehled počtu vyšetření ve sledovaných velkochovech koz – An overview of the number of examinations on the investigated large goat farms

Chov č. <sup>1</sup>	Početní stav (ks) <sup>2</sup>	Počty vyšetření <sup>3</sup>			
		2. 3. 1994	6. 4. 1994	květen 1994 <sup>4</sup>	8. 6. 1994
1	300			15	
2	150			15	
3	250	25	30	30	40a
4	80		15	15	10b
5	100		17	15	20c

a = 10 koz bylo vyšetřeno ve dvou termínech – 10 goats were examined on two dates

3 kozy byly vyšetřeny ve třech termínech – 3 goats were examined on three dates

b = 2 kozy byly vyšetřeny ve dvou termínech – 2 goats were examined on two dates

c = 4 kozy byly vyšetřeny ve dvou termínech – 4 goats were examined on two dates

<sup>1</sup>farm no., <sup>2</sup>number of goats, <sup>3</sup>number of examinations, <sup>4</sup>May 94

vodem ze Skotska), kozy angorské a kříženky krátkosrstých plemen (původem z Dánska).

Kozy byly ustájeny volně buď ve stáji na betonové podlaze s přistýláním slámy (chov č. 1), nebo ve stájích s hlubokou podestýlkou. Úroveň zoohygieny byla v jednotlivých chovech hodnocena jako průměrná až velmi dobrá. V létě je kozám naváženo zelené krmivo a přidáváno seno a jadrné krmné směsi. Pouze v chovu č. 5 se kozy pasou. V zimě je krmná dávka založena na seně, přidávají se jadrné krmné směsi, krmná řepa, příp. cukrovarské řízky.

Ve všech chovech byly kozy preventivně odčervovány. V období 1993/1994 se ve chovech ojediněle vyskytly projevy indigescy (všechny chovy), byla zaznamenána kokcidioza kůzlát, listerióza (chov č. 3), hypodermie, svrab (chov č. 4) a paratuberkulóza (chov č. 5). V chovech se během sledování nevyskytly klinické příznaky onemocnění, které by byly dávány do souvislosti s CAE, Q-horečkou, kazeózní lymfadenitidou nebo toxoplasmózou.

## ARTRITIDA A ENCEFALITIDA KOZ (CAE)

K sérologickému vyšetření byla použita metoda agar-gelové imunodifuze. Antigen byl získán kultivací viru Maedi-Visna (kmen OLV) na buněčné kultuře ovcí synoviální membrány a koncentrován (Celer, 1993). K vyšetření byla použita neředěná séra.

## Q-HOREČKA

K sérologickému vyšetření byla použita komplementfixační reakce s antigenem *Coxiella burnetii* ve fázi II (Bodibion, Mevak Nitra, Slovensko) a s komplementem Sevatest toxoplazma komplement (Sevac Praha). Základní ředění séra bylo 1 : 8.

## KAZEÓZNÍ LYMFADENITIDA

Pro sérodiagnostiku se použila agar-gelová imunodifuze a neutralizační test (Skalka a Literák, 1994). Pro agar-gelovou imunodifuzi se používala neředěná séra a antigen fosfolipáza D kmene *Corynebacterium pseudotuberculosis* CNCTC Cor 17/62. Pro neutralizační test byl použit equi-faktor *Rhodococcus equi* kmene CNCTC Cor 91/88, beta-hemolyzin *Staphylococcus aureus* kmene CNCTC Man 126/89 a senzibilizované prané ovcí erytrocyty. Pozitivní neutralizace se projevila inhibicí hemolytického synergismu fosfolipázy D s equi-faktorem. Výchozí hodnocené ředění séra bylo 1 : 10.

## TOXOPLAZMÓZA

K sérologickému vyšetření byla použita komplementfixační reakce s antigenem Sevatest toxoplazma antigen KFR (Sevac Praha), komplementem Sevatest toxoplazma komplement (Sevac Praha). Základní ředění séra bylo 1 : 8.

## VÝSLEDKY

### CAE, Q-HOREČKA, KAZEÓZNÍ LYMFADENITIDA

V žádném z 247 vyšetřovaných sér nebyly zjištěny protilátky proti viru CAE, *Coxiella burnetii* a *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

### TOXOPLAZMÓZA

U koz ze čtyř chovů byly zjištěny protilátky proti *Toxoplasma gondii*. Séroprevalence i průměrný geometrický titer ( $\bar{x}_g$ ) se v jednotlivých chovech lišily (tab. II). Z celkem 247 vyšetřených sér byly protilátky zjištěny u 50 (20,2 %), průměrný geometrický titer byl

II. KFR protilátky proti *Toxoplasma gondii* u koz – KFR antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats

Chov č. <sup>1</sup>	Vyšetřeno <sup>2</sup>	Positivní <sup>3</sup>	Procento pozitivních <sup>4</sup>	$\bar{x}_g$
1	15	0	0	0
2	15	4	27	16
3	125	16	13	24
4	40	3	8	161
5	52	27	52	36
Celkem <sup>5</sup>	247	50	20,2	32

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

<sup>1</sup>farm no., <sup>2</sup>examined, <sup>3</sup>positive, <sup>4</sup>percentage of positive goats, <sup>5</sup>total

32. Nejvyšší titer 1024 byl zjištěn v jednom případě u kozy z chovu č. 4. Tato koza byla vyšetřena v červnu. Z případů, kdy byly některé kozy vyšetřeny opakovaně v měsíčním intervalu, se sérokonverze zjistila pouze jednou (chov č. 3, 1. vyšetření v květnu – 0, 2. vyšetření v červnu – 1 : 32).

## DISKUSE

### ARTRITIDA A ENCEFALITIDA KOZ (CAE)

Informace o výskytu CAE v České republice nebyla dosud publikována v odborném tisku. Vzhledem k tomu, že probíhají importy koz ze západní Evropy do České republiky, považujeme sérologické vyšetření koz před dovozem za nezbytnou součást prevence tohoto onemocnění v České republice.

### Q-HOREČKA

Negativní výsledky našich vyšetření svědčí o tom, že *Coxiella burnetii* ve sledovaných chovech necirkuluje. Tento výsledek je do jisté míry překvapivý, neboť v populacích skotu v České republice je cirkulace

*C. burnetii* běžná (Řeháček aj., 1979, 1987; Lisák aj., 1989; Literák, 1994; Literák a Calvo Rodríguez, 1994). Virulence autochtonních kmenů *C. burnetii* izolovaných v našich chovech skotu je však poměrně nízká (Valková aj., 1994).

Z hlediska prevence Q-horečky v chovech koz prostých této nákazy je nutné zdůraznit význam sérologického vyšetření nově naskládaných koz. Kmen *C. burnetii* zavlečený do stáda koz může totiž být původcem hromadného klinického onemocnění koz a následně původcem vážné epidemie, jak se stalo v roce 1993 na Slovensku (Kováčová aj., 1993; Varga aj., 1993).

### KAZEÓZNÍ LYMFADENITIDA

Negativní výsledky sérologických vyšetření v chovech koz, do nichž byla přesunována zvířata z nejrůznějších chovů v České republice, mohou být podkladem pro poměrně optimistické hodnocení epizootologické situace u této nákazy. Z toho důvodu je nutné doporučit preventivní sérologické vyšetření importovaných zvířat. Výsledky vyšetření koz v chovu č. 4, kde byly kozy pocházející z importů ze Skotska a Dánska, byly rovněž negativní. I zde bylo na místě preventivní sérologické vyšetření, neboť např. ve Skandinávii (Norsko) se kazeózní lymfadenitida u koz vyskytuje (Holstad, 1986).

### TOXOPLAZMÓZA

Protilátky proti *T. gondii* jsme zjistili ve čtyřech z pěti sledovaných chovů, přičemž z chovu, kde protilátky nebyly zjištěny, jsme vyšetřili pouze 15 z celkového stavu 300 jedinců. V jednotlivých chovech, kde protilátky byly zjištěny, se značně lišila séroprevalence protilátek proti *T. gondii*. U séropozitivních jedinců však zpravidla nebylo možné zjistit, zda k jejich infekci došlo v prostředí sledovaného chovu nebo v místě původu. Klinické příznaky toxoplazmózy nebyly u koz zaznamenány a to ani v chovu, kde byla séroprevalence nejvyšší, ani v chovu, kde byly nejvyšší titry ( $\bar{x}_g$ ) nebo kde byla u jedné kozy zjištěna sérokonverze. Dá se očekávat, že po určité době, při dodržování vysokého hygienického standardu ve velkochovech koz, dojde ke snížení séroprevalence protilátek proti *T. gondii*, tak jako k němu došlo ve velkochovech skotu a prasat (Hejliček a Literák, 1992, 1993). Jako rozhodující pro snížení séroprevalence se jeví zamezení přístupu kočky domácí, zkrmování nekontaminovaného krmiva a napájení nekontaminovanou vodou.

Asymptomatický průběh toxoplazmových infekcí u koz, ale i dalších druhů savců a ptáků na našem území, nastoluje otázku virulence kmenů *T. gondii* cirkulujících v populacích vnímavých zvířat a v prostředí. Otázce virulence autochtonních kmenů *T. gondii* se proto bude nutné věnovat v dalším období.

## LITERATURA

- BROWN, C. C. – OLANDER, H. J.: Caseous lymphadenitis of goats and sheep: a review. *Vet. Bull.*, 57, 1987: 1–12.
- CELER, V. Jr.: Příprava precipitačního antigenu k diagnostice Maedi-Visna. *Vet. Med.–Czech*, 38, 1993: 641–646.
- CRAWFORD, T. B. – ADAMS, D. S.: Caprine arthritis-encephalitis: Clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *JAVMA*, 178, 1981: 713–719.
- DAHLBERG, J. E. – GASKIN, J. M. – PERK, K.: Morphological and immunological comparison of caprine arthritis encephalitis and ovine progressive pneumonia viruses. *J. Virol.*, 39, 1981: 914–919.
- DUBEY, J. P. – BEATTIE, C. P.: Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton, Florida, CRC Press 1988.
- DRAVECKÝ, T. – TRÁVNÍČEK, M. – BALAŠČÁK, J. – ZUBRICKÝ, P. – SKALKA, B. – ZELENÝ, I. – SEIDEL, H.: Výskyt kazeózní lymfadenitidy kůz. *Veterinářství*, 36, 1986: 456–457.
- HEJLÍČEK, K. – LITERÁK, I.: Occurrence of toxoplasmosis and its prevalence in cattle in the South Bohemian Region. *Acta Veter. (Brno)*, 61, 1992: 195–206.
- HEJLÍČEK, K. – LITERÁK, I.: Prevalence of toxoplasmosis in pigs in the region of South Bohemia. *Acta Veter. (Brno)*, 62, 1993: 159–166.
- HEJLÍČEK, K. – LITERÁK, I.: Výskyt a rozšíření toxoplazmózy u ovcí a koz v jižních a západních Čechách. *Acta Veter. (Brno)*, 63, 1994, v tisku.
- HOLSTAD, G.: *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats II. The prevalence of caseous lymphadenitis in 36 goat herds in northern Norway. *Acta Veter. Scand.*, 27, 1986: 584–597.
- KNOWLES, D. P. Jr. – EVERMANN, J. F. – SHROPSHIRE, C. – VANDERSCHALIE, J. – BRADWAY, D. – GEZON, H. M. – CHEEVERS, W. P.: Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Clin. Microbiol.*, 32, 1994: 243–245.
- KOUBA, K. – JÍRA, J. – HUBNER, J.: Toxoplazmóza. Praha, Avicenum 1974.
- KOVÁČOVÁ, E. – KAZÁR, J. – ŠIMKOVÁ, A. – LENČUCHOVÁ, L. – ŠRÁMEKOVÁ, R.: Detection and analysis of antibody response to *Coxiella burnetii* in humans and goats involved in an outbreak of acute pulmonary infection in west Slovakia. In: *Abstr. Int. Conf. on Zoonoses*, October 5–7, 1993, Piešťany, Slovak Republic. Bratislava, SMA 1993: 14.
- 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 Veter. (Brno)*, 63, 1994: 65–69.
- LITERÁK, I. – CALVO RODRÍGUEZ, B.: Latent Q-fever in Southern Moravia (Czech Republic). *Centr. Eur. J. Publ. Hlth*, 2, 1994: in press.
- LITERÁK, I. – SKALKA, B. – RYCHLÁ, R.: Kazeózní lymfadenitida (pseudotuberkulóza) ovcí také v České republice. *Veterinářství*, 44, 1994: 149–151.
- REHN, F. – RADVAN, R.: Isolace *Coxiella burnetii* z klíštěte *Ixodes ricinus*. *Českoslov. Epidem.*, 6, 1957: 85–88.
- ŘEHÁČEK, J. – BREZINA, R. – KAŠPAR, H. – PUSTÓWKA, V. – MAĐAR, J.: Příspěvek k infestaci skotu rickettsiemi a chlamydiemi ve dvou oblastech ČSSR. *Veterinářství*, 44, 1994: 149–151.
- 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. – TARASEVICH, I. V.: Acari-borne rickettsiae and rickettsioses in Euroasia. Bratislava, Veda 1988.
- SKALKA, B. – LITERÁK, I.: Sérodiagnostika kazeózní lymfadenitidy (pseudotuberkulózy) ovcí. *Vet. Med.–Czech*, 39, 1994: 533–539.
- VALKOVÁ, D. – KOCIANOVÁ, E. – KOVÁČOVÁ, E. – LITERÁK, I.: Plasmid typing and virulence of *Coxiella burnetii* isolates. In: *Abstr. 7th Int. Cong. of Bacteriology and Applied Microbiology Division, Prague, Czech Republic, July 3rd–8th, 1994*: 217.
- VARGA, V. – ŠIMKOVÁ, A. – ŠRÁMEKOVÁ, R.: An explosive outbreak of Q-fever with an unusual transmission. In: *Abstr. Int. Conf. on Zoonoses, October 5–7, 1993, Piešťany, Slovak Republic. Bratislava, SMA 1993*: 14.
- VITU, C. – RUSSO, P.: L'arthrite-encephalite enzootique caprine en France: recherches epidemiologiques et experimentales. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 11, 1988: 27–34.

Došlo 17. 10. 1994

---

### Kontaktní adresa:

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

---

# PREVALENCE OF ANTIBODIES TO *TOXOPLASMA GONDII* IN ARMY DOGS IN THE CZECH REPUBLIC AND SLOVAK REPUBLIC

## PREVALENCE PROTI LÁTEK PROTI *TOXOPLASMA GONDII* U SLUŽEBNÍCH ARMÁDNÍCH PSŮ V ČESKÉ REPUBLICĚ A VE SLOVENSKÉ REPUBLICĚ

K. Hejlíček<sup>1</sup>, I. Literák<sup>2</sup>, M. Lhoták<sup>3</sup>

<sup>1</sup> VEDIA, Veterinary Laboratory, Strakonice, Czech Republic

<sup>2</sup> University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

<sup>3</sup> Veterinary Base of Czech Army, Grabštejn, Czech Republic

**ABSTRACT:** Army dogs, mostly German Sheep-dogs, were tested for antibodies to *T. gondii* using Sabin-Feldman dye test (DT) and complement fixation test (CFT). Titers greater than or equal to 4 and 10 were considered as positive in DT and CFT, respectively. Seroprevalences in the group of 720 dogs from the civil sector of different areas in the former Czechoslovakia were 39.3% and 15.4% in DT and CFT, respectively. During dogs' stay in army seroprevalences decreased only slowly. The decrease was probably due to less possibility to contact sources of infection – dogs were fed with cooked food, kept in pens with a high level of hygiene, and cats were very rare there. Nevertheless, some dogs in the army training centre were infected by *T. gondii* in that way of dog rearing.

army dogs; *Toxoplasma gondii*; antibodies

**ABSTRAKT:** Služební psi z armády bývalého Československa byli v letech 1982–1984 vyšetřováni na protilátky proti toxoplazmóze. Jednalo se téměř výhradně o psy plemene německý ovčák. K sérologickému vyšetření byla použita Sabin-Feldmanova reakce (DT) a komplementfixační reakce (CFT). Za pozitivní byl považován titer  $\geq 4$  při DT a  $\geq 10$  při CFT. Séroprevalence 720 psů ve věku asi tří let byla po nakoupení v civilním sektoru 39,3 % (DT) nebo 15,4 % (CFT). Během pobytu v armádě došlo jen k velmi mírnému poklesu séroprevalence. Toto snížení séroprevalence bylo dáno do souvislosti s menším kontaktem služebních psů s možnými zdroji infekce – psi byli krmeni převařenou potravou, chováni v kotečích se standardní úrovní hygieny a jejich kontakt s kočkou domácí byl minimální. Přesto však u některých psů v armádním výcvikovém středisku bylo sérokonverzí protilátek prokázáno, že byli infikováni *T. gondii* v prostředí tohoto výcvikového střediska.

služební psi; *Toxoplasma gondii*; protilátky

### INTRODUCTION

Dubey and Beattie (1988) summarized world-wide prevalence of *T. gondii* infection in dogs. The following papers deal with the seroprevalence of antibodies to *T. gondii* (Martínez Maya, 1986; Opel, 1987; Svoboda, 1987; Jackson, 1989; Lindsay et al., 1990; Ugglá et al., 1990; Ulón and Marder, 1990; Pavlína, 1990; Guimarães et al., 1992), clinical canine toxoplasmosis (Svoboda et al., 1987; Svoboda and Hejlíček, 1989; Dubey et al., 1989) and findings of toxoplasmas in dead dogs (Ehrensperger and Pospischil, 1989; Pimenta et al., 1993).

Our objectives were to ascertain the seroprevalence of antibodies to *T. gondii* in army dogs from different

areas of the former Czechoslovakia and to study changes in seroprevalences in these dogs kept in a defined kennel.

### MATERIAL AND METHODS

#### DOGS

In 1982–1984, three groups of army dogs, nearly exclusively German Sheep-dogs, were examined for the presence of antibodies to *T. gondii*.

First, dogs at about 3 years of age that were bought from the civil sector in different areas of the Czech Republic and Slovakia after their drill for the army use. Antibodies to *T. gondii* were tested in dogs mostly

three times: immediately after their buying, one month later when a quarantine had finished and after the next 2 months when the first army training course ended.

In the second and third groups there were dogs of various age that came to the training centre from army formations. In this centre soldiers and their dogs were trained for the army service. Dogs were examined for the antibodies mostly twice: immediately after they started the training course and after one and three months when in the second and third group, respectively, the army training courses ended.

All the dogs were examined in the defined kennel. The kennel for the army training courses is situated in an old castle park, in a slope. Dogs were kept in pens with a concrete floor. The pens were cleaned daily. No raw meat was fed to the dogs. All food was cooked in own kitchen. During the courses, dogs worked only in the park and on a near wet meadow. A few cats occurred in the kennel surroundings and rats (*Ratus norvaegicus*) were common there.

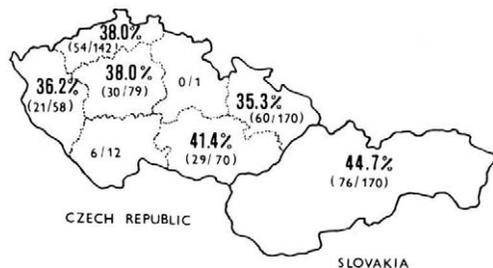
## SEROLOGIC EXAMINATIONS

Serologic examinations consisted of the Sabin-Feldman dye test (DT) as modified by Zástěra et al. (1962) and Kouba et al. (1974), which was carried out in parallel with a complement fixation test (CFT) as modified by Pokorný et al. (1972). The DT was made with a standard human strain of *T. gondii* using methylene blue and basic dilution of serum at 1 : 4. For the CFT, the authors used the Sevatest Toxoplasma Antigen KFR (SEVAC Praha, Czech Republic) and basic dilution of serum at 1 : 10. Statistical evaluation was based on the chi-square test.

## RESULTS

### EXAMINATIONS OF DOGS FROM THE FIRST GROUP

Totals of 702, 687 and 450 dogs were examined after their buying from the civil sector, after the quarantine stay and when the training courses were ending,



1. Seroprevalences of antibodies to *T. gondii* ascertained by DT in army dogs coming from different areas of the former Czechoslovakia (No. positive/No. tested)

respectively. Using DT, seroprevalences in the mentioned terms were 39.3%, 32.0% and 31.8%, resp. Using CFT, seroprevalences were 15.4%, 9.6% and 13.3%, resp. Distribution of positive titers is shown in Tab. I. In DT, the highest detected titer was 64 in five cases. In CFT, it was 80 detected once. Most dogs with antibodies to *T. gondii* had positive titers of the serum basic dilution only.

I. Distribution of titers during the investigation of seroprevalence in the first group of army dogs ( $n = 1,839$ )

DT		CFT	
titer	number	titer	number
<4	1 200	<10	1 605
4	428	10	199
8	136	20	24
16	59	40	10
32	11	80	1
64	5		

DT – Sabin-Feldman dye test

CFT – complement fixation test

Using DT, seroprevalences in dogs from different areas of the Czechoslovakian civil sector ranged between 35.3% and 44.7% according to the first examinations immediately after buying the dogs for army use (Fig. 1). Using CFT, seroprevalences ranged between 6.9% and 24.0%.

All twice three examinations were carried out in 450 dogs (Tab. II). During the courses seroprevalences decreased both in DT and CFT from 42.0% to 31.8% (chi-square = 10.1,  $P < 0.01$ ) and from 17.1% to 13.3% (NSD – no significant difference), respectively.

Changes in the occurrence of antibodies to *T. gondii* in 450 three times repeatedly tested dogs are shown in Tabs. III and IV.

In DT, 16.4% of dogs had antibodies permanently, e.g. in the first, second and third examinations or in the first and third examinations (negative results of the second examinations were evaluated as an antibody decrease under the detectable level), 33.5% of dogs were permanently without antibodies, the disappearance of antibodies was observed in 25.6%. The seroconversion that was probably evoked by the infection before the stay in the defined kennel was observed in 16.2% and the seroconversion evoked unambiguously by the infection in that kennel in 8.2% of dogs. In CFT, the values were 3.5%, 68.2%, 13.6%, 6.8% and 7.8% of dogs, respectively.

### EXAMINATIONS OF DOGS FROM THE SECOND GROUP

Totals of 623 and 617 dogs were tested at start and finish of the one-month courses, respectively (Tab. V). Seroprevalences decreased both in DT and CFT from

II. Seroprevalences of antibodies to *T. gondii* in dogs of the first group during their training course (n = 450)

	DT			CFT		
	positive findings		$\bar{x}_g$	positive findings		$\bar{x}_g$
	number	%		number	%	
Bought in civil sector	189	42.0	5.6	77	17.1	11.2
After 1-month quarantine	153	34.0	5.6	46	10.2	11.3
After 2-month training course	143	31.8	5.3	60	13.3	11.5

DT – Sabin-Feldman dye test

CFT – complement fixation test

$\bar{x}_g$  – mean geometric titer

III. Changes in the occurrence of antibodies to *T. gondii* (DT) in three times repeatedly tested dogs in a defined kennel

Results of examinations								
+ positive; - negative	+++	++-	+-	+-	---	-+-	-++	---
No. of dogs	39	35	41	74	151	41	32	37
Classification to groups	A	A	B	B	C	D	D	E
% of dogs in groups (100% = 450)	A = 16.4; B = 25.6; C = 33.5; D = 16.2; E = 8.2							

A – permanent occurrence of antibodies; B – disappearance of antibodies; C – permanent lack of antibodies; D – seroconversion probably due to the infection before the stay in defined kennel; E – seroconversion due to the infection in defined kennel

IV. Changes in the occurrence of antibodies to *T. gondii* (CFT) in three times repeatedly tested dogs in a defined kennel

Results of examinations								
+ positive; - negative	+++	++-	+-	+-	---	-+-	-++	---
No. of dogs	5	11	10	51	307	22	9	35
Classification to groups	A	A	B	B	C	D	D	E
% of dogs in groups (100% = 450)	A = 3.5; B = 13.6; C = 68.2; D = 6.8; E = 7.8							

For A, B, C, D, E see Tab. III

V. Seroprevalences of antibodies to *T. gondii* in dogs during the one-month training courses

	DT				CFT			
	number of examinations	positive findings		$\bar{x}_g$	number of examinations	positive findings		$\bar{x}_g$
		number	%			number	%	
Start of the course	623	208	33.4	5.25	623	93	14.9	10.9
Finish of the course	617	193	31.3	5.14	617	55	8.9	10.6

VI. Seroprevalences of antibodies to *T. gondii* in dogs during the three-months training courses

	DT				CFT			
	number of examinations	positive findings		$\bar{x}_g$	number of examinations	positive findings		$\bar{x}_g$
		number	%			number	%	
Start of the course	68	24	35.3	5.3	68	8	11.8	10
Finish of the course	67	21	31.3	4.7	67	6	9.0	10

33.4% to 31.3% (NSD) and from 14.9% to 8.9% (chi-square = 10.7,  $P < 0.01$ ), respectively.

EXAMINATIONS OF DOGS FROM THE THIRD GROUP

Totals of 68 and 67 dogs were tested at start and finish of the three-months' courses, respectively (Tab. VI). Seroprevalences decreased both in DT and

CFT from 35.3% to 31.3% (NSD) and from 11.8% to 9.0% (NSD), respectively.

There were lower seroprevalences in dogs of the second and third group coming from the army sector to training courses than in dogs coming from the civil sector. Using DT, 33.4% (a) and 35.3% (b), respectively, versus 39.3% (a, b – NSD). Using CFT, 14.9% (a) and 11.8% (b), respectively, versus 15.4% (a, b – NSD).

## DISCUSSION

Considering that dogs of the same race and similar age were examined, it is possible to eliminate the influence of race and age with the seroprevalence of antibodies to *T. gondii*.

There were the equable seroprevalences in various parts of the Czech Republic and also Slovakia. The mean seroprevalences of 39.3% (DT) and 15.4% (CFT) were mostly accompanied by low titers. We guess *T. gondii* infections with such seroprevalence and titers were due to a frequent but not recent contact of the dog and *T. gondii*.

Other authors, who examined dogs in the territory of the Czech Republic and Slovakia in the last ten years, published seroprevalences using DT of 5% (Šebek, 1985) and 32% (Svoboda, 1987), using CFT 8% (Šebek, 1985), 9% (Svoboda, 1987), 28% (Pavlična, 1990) and 57% (Vokoun, 1982). These results varied probably due to local conditions. The lowest seroprevalences of 5% and 8% in DT and CFT, respectively, were in police border dogs (Šebek, 1985). The police dogs were born and reared in the police kennels and fed with cooked food all the time.

During the stay of dogs in the army, their seroprevalences decreased only slowly. *T. gondii* infection of those dogs came into canine being at their young age when they were kept by their first owners out of army. The reason for a small decrease is a less possibility to contact any source of infection in dogs kept in army than in dogs kept in the civil sector. Army dogs are fed with cooked food and hardly ever with raw meat. There is also a standard hygienic level in army kennels with exceptional occurrence of cats in them.

Strictly adhering to the system of dog feeding, rearing and working in the army training center resulted in a decrease in seroprevalence of *T. gondii* antibodies in dogs. But it is true that some dogs were also infected by *T. gondii* in the conditions of this training center.

## REFERENCES

DUBEY, J. P. – BEATTIE, C. P.: Toxoplasmosis of Animal and Man. Florida, CRC Press, Inc. Boca Raton, 1988.  
DUBEY, J. P. – CARPENTER, J. L. – TOPPER, M. J. – UGGLA, A.: Fatal toxoplasmosis in dogs. J. Amer. Anim. Hosp. Assoc., 25, 1989: 659–664.  
EHRENSBERGER, F. – POSPISCHIL, A.: Spontane Mischinfektionen mit Staupevirus und Toxoplasmen beim Hund. Dtsch. Tierärztl. Wschr., 96, 1989: 184–186.  
GUIMARÃES, A. M. – RIBEIRO, M. F. B. – LIMA, J. D. – CURY, M. C. – SPIEWAK, G.: Freqüência de anticorpos

anti-*Toxoplasma gondii* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais. Arq. Brasil. Med. Veter. e Zoot., 44, 1992: 67–68.  
JACKSON, M. H.: The epidemiology and ecology of toxoplasmosis. Diss. Abstr. Inter., B, 49, 1989: 2577.  
KOUBA, K. – JÍRA, J. – HÜBNER, J.: Toxoplazmóza. Praha, Avicenum 1974.  
LINDSAY, D. S. – DUBEY, J. P. – UPTON, S. J. – RIDLEY, R. K.: Serological prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs from Kansas. J. Helminth. Soc. (Washington), 57, 1990: 86–88.  
MARTÍNEZ MAYA, J. J.: Sondeo serológico para la detección de anticuerpos contra toxoplasmosis en perro de la Ciudad de México y su importancia en salud pública. Veterinaria (México), 17, 1986: 332–333.  
OPEL, V.: Serologische Untersuchungen auf Toxoplasma-Antikörper mit dem Indirekten Immunofluoreszenztest (IFAT) und dem Latexaglutinationstest (LAT) bei Ziegen und Hunden in Neuseeland. [Dissertation.] Hannover 1987. 100 s.  
PAVLÍNA, M.: Premorenosť bratislavských psov pôvodcami niektorých zoonóz. Závěr. Zpr. Rezort. Výzk. MZ SR č. 42-03-05, Bratislava 1990.  
PIMENTA, A. L. – PIZA, E. T. – CARDOSO, R. B. jr. – DUBEY, J. P.: Visceral toxoplasmosis in dogs from Brazil. Veter. Parasitol., 45, 1993: 323–326.  
POKORNÝ, J. – ZÁSTĚRA, M. – ČUŘÍK, B.: Návrh standardizace mikrotechniky vazby komplementu pro diagnostiku toxoplazmózy. Českoslov. Epidem., 21, 1972: 225–234.  
SVOBODA, M.: Incidence of *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs from Brno and its environs. Acta Vet. (Brno), 56, 1987: 475–486.  
SVOBODA, M. – HEJLIČEK, K.: Výskyt klinické toxoplazmózy kočky a psa. Veterinářství, 39, 1989: 312–313.  
SVOBODA, M. – JAGOŠ, P. – KONRÁD, J.: Toxoplazmose in Beziehung zu anderen Infektionskrankheiten der Hunde. Schweiz. Arch. Tierheilk., 129, 1987: 595–604.  
ŠEBEK, J.: Studium epizootologie toxoplazmózy a leptospirózy, výskytu mykobakterií a salmonel u služebních psů. [Kandidátská disertace.] Brno 1985.  
UGGLA, A. – MATTSON, S. – JUNTITI, N.: Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cats, dogs and horses in Sweden. Acta Vet. Scand., 31, 1990: 219–222.  
ULÓN, S. N. – MARDER, G.: Tasas de infección toxoplásmica en el hombre y su relación con los animales domésticos en la ciudad de Corrientes. Veterinaria (Argentina), 7, 1990: 518, 520–522.  
VOKOUN, P.: Depistáž toxoplazmózy u psů a koček ve městě. Veterinářství, 32, 1982: 129–131.  
ZÁSTĚRA, M. – HÜBNER, J. – POKORNÝ, J.: Návrh na standardizaci Sabinovy a Feldmanovy reakce na toxoplazmózu. Českoslov. Epidem., 11, 1962: 122–126.

Arrived on 30th May 1994

Contact Address:

MVDr. Ivan L i t e r á k, 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

# COMPARISON OF A PROOF OF *GIARDIA INTESTINALIS* CYSTS WITH THE PRESENCE OF SPECIFIC ANTIBODIES IN DOGS AND CATS

## SROVNÁNÍ PRŮKAZU CYST *GIARDIA INTESTINALIS* S VÝSKYTEM SPECIFICKÝCH PROTILÁTEK U PSŮ A KOČEK

V. Svobodová, M. Svoboda, J. Konvalinová

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

**ABSTRACT:** We investigated giardiasis of dogs and cats with a view to cysts in fecal samples and antibodies in the blood serum. Cysts were found in 25 fecal samples (5.5%) out of 458. Cysts were excreted frequently in puppies and adolescent dogs. In 15 cases giardiasis was diagnosed together with canine distemper or parvovirus as an opportunistic infection. Indirect immunofluorescence was used for detection of specific antibodies. We tested sera of 588 dogs and specific antibodies were detected in 156 cases (36.5%) in titres 10–160. In basic dilution 1 : 10 antibodies were detected in 61% positive samples. Titres 20–160 were found in 39% of the positive sera. In cats cysts were found only in 1 fecal sample out of 135 due to the difficulties in obtaining fecal samples for repeated examinations. Specific antibodies were detected in 107 cats (56.9%) out of 188 at titres 10–320. In basic dilution 1–10 antibodies were detected only in 30% of the positive sera but on the other hand in 70% we detected higher titres, i.e. 20–320. We did not consider titre 10 as significantly positive in both dogs and cats because cross-parasitic infections frequently occur. The number of serological positive dogs and cats grew with their age because they acquired giardiasis in the course of their life mostly as asymptomatic infection. The detection of specific antibodies cannot be used for the diagnosis because their level in blood serum persists for months. We must treat every dog and cat excreting cysts in fecal samples to stop transmission to other animals and humans—zoonosis.

*Giardia intestinalis*; cysts; antibodies; IFAT; dog; cat

**ABSTRAKT:** Zabývali jsme vyšetřením psů a koček se zaměřením na průkaz cyst *G. intestinalis* ve výkalech a specifických protilátek v krevním séru. Cysty byly nalezeny u 25 psů z 458 vyšetřovaných vzorků výkalů. Vylučování cyst bylo častější u mladších věkových kategorií a v 15 případech doprovázelo oportunně psinku a jednou parvovirozou. Nepřímé imunofluorescenční metodě jsme podrobily 588 vzorků krevního séra psů a specifické protilátky byly detekovány v 156 případech (36,5 %) v titru 10–160. V základním ředění 1 : 10 byly protilátky zjištěny u 61 % pozitivních zvířat. Titry 20–160 se vyskytovaly u 39 % pozitivních jedinců. U koček jsme cysty našly pouze u jednoho zvířete ze 135 vyšetřovaných vzorků výkalů, což bylo pravděpodobně způsobeno obtížným získáváním výkalů pro opakované vyšetření. U 107 koček (56,9 %) ze 188 byly zjištěny specifické protilátky v titrech 10–320. Podíl protilátek v základním ředění 1 : 10 činil jen 30 % a naproti tomu jsme v 70 % zjišťovali vyšší titry 20–320. Vzhledem k často souběžně probíhajícím parazitárním infekcím nepovažujeme titer 10 za signifikantně pozitivní. U psů i koček roste počet sérologicky pozitivních zvířat s věkem, což dokazuje, že se během života setkávají s touto infekcí probíhající často latentně nebo oportunně. Zjištění specifických protilátek nemůže sloužit k přímým diagnostickým účelům, neboť perzistují v krevním séru několik měsíců. Při pozitivním nálezu cyst je nutné pacienta léčit bez ohledu na intenzitu klinických příznaků – rozdílná vnímavost a odezva u hostitele, zoonóza.

*Giardia intestinalis*; cysty; protilátky; nepřímá fluorescence; pes; kočka

### ÚVOD

Giardióza je parazitární onemocnění protozoárního původu postihující tenké střevo zvířat i člověka. Původcem je *G. intestinalis*, někdy označovaná také *Lambliia intestinalis* nebo *G. lambliia*. V roce 1979 byla giardióza zařazena mezi parazitární zoonózy. Infekce se vyskytuje častěji u mladých jedinců a projevuje se průjmy, probíhá však i latentně.

Giardie izolované z domácích zvířat a člověka patří ke skupině *G. intestinalis*, a proto kmeny získané z různých druhů hostitelů nejsou morfologicky rozlišitelné.

Parazit je rozšířen kosmopolitně, ale jeho výskyt výrazně regionálně kolísá (Kulda a Nohýnková, 1978). Incidence v lidské populaci ve střední Evropě je 2–6 % u dospělých a 10–15 % u dětí (Giboda, 1988). Vyšší procento výskytu je v subtropických

a tropických oblastech (Gilman aj., 1985; Eckert, 1989). U psů se pozitivní nálezy pohybují v rozmezí 0,5–18 % a u koček od 2–3 %. Wolf a Eckert (1979) vyšetřili výkaly 2 414 psů a 927 koček. Giardie byly prokázány u 1,6 % psů a 0,6 % koček. Jungmann aj. (1986) uvádějí frekvenci výskytu giardií u psů ve 3,5 %. Vyšší výskyt byl zaznamenán v Austrálii, kde Swan a Thompson (1986) zjistili cysty u 21 % psů a 14 % koček. V našich podmínkách vylučování cyst giardií u psů kolísá v rozmezí 1,36–10,68 % s průměrem 5,65 % (Svobodová aj., 1987; Vokoun, 1988). Častěji jsou postiženi mladí jedinci, zvířata chovaná hromadně a pacienti s poruchami imunitního systému.

Otázka přenosu giardií ze zvířat na člověka je stále otevřená. U jednoho živočišného druhu existují varianty vysoce specifické a jiné, které mohou být infekční pro hostitele odlišného druhu. Záleží rovněž na vnímavosti nového hostitele a jeho imunokompetentnosti. Při výzkumu musíme mít na zřeteli rozdíly mezi experimentálními infekcemi a infekcemi v přirozených podmínkách (Kirkpatrick, 1987; Svobodová a Nevoľe, 1988; Eckert, 1989). Ukazuje se, že k nakažení člověka většinou dochází fekálně orální cestou a zdrojem infekce je nejčastěji zase člověk.

V naší práci jsme se zaměřili na giardiózu psů a koček z hlediska přímého nálezu cyst ve výkalech a specifických protilátek v krevním séru. Vzhledem k úzkému soužití domácích zvířat s lidmi se nám tato problematika jeví velmi aktuální.

## MATERIÁL A METODY

V období od října 1989 do prosince 1991 bylo na I. interní klinice Veterinární a farmaceutické univerzity (VFU) v Brně prováděno vyšetřování psů a koček zaměřené na výskyt giardií. Celkem bylo vyšetřeno 588 psů a 188 koček. Většinu souboru tvořila zvířata ošetřovaná ambulantně nebo hospitalizovaná (533 psů a 126 koček).

V celkovém počtu vyšetřených psů bylo zastoupeno 49 plemen a kříženci. Nejčastějšími plemeny byli němečtí ovčáci, jezevčáci a pudlí. V celém souboru bylo 332 psů (56,5 %) a 256 fen (43,5 %). Věk zvířat se pohyboval v rozmezí 7 dní až 16 let. Hmotnost psů byla od 400 g do 80 kg s nejvíce zastoupenou hmotnostní kategorií 2,1–10 kg. Téměř 71 % vyšetřených psů pocházelo z městského prostředí, především z Brna a 29 % bylo chováno na venkově. Do této skupiny byli začleněni i psi ministerstva vnitra, převážně němečtí ovčáci.

Vyšetřené kočky byly zastoupeny pěti plemeny a kříženci. Nejčastějšími plemeny byly evropská kočka krátkosrstá a perská. V souboru bylo zahrnuto 85 kocourů (45,2 %) a 95 koček (50,5 %). Kastrátů samčích bylo šest (3,2 %) a kastrátů samičích dva (1,1 %). Věk koček se pohyboval od jednoho dne do 12 let a hmotnost od 80 g do 6 kg. Nejvíce zastoupená byla hmot-

nostní kategorie 2,1–4 kg. Zvířata pocházející z městského prostředí, hlavně z brněnské aglomerace, tvořila 94 % a zvířata chovaná na venkově 6 %.

U každého jedince jsme sledovali nacionále, tj. plemeno, pohlaví, věk, hmotnost, data vyšetření a jméno a adresu majitele. Vlastní klinické vyšetření bylo orientováno na zjištění hlavních klinických příznaků onemocnění s cíleným zaměřením na poruchy trávicího ústrojí. Výsledky doplňkových vyšetření a diagnostické závěry byly převzaty z chorobopisů a evidenčních karet kliniky.

Vzorky výkalů k parazitologickému vyšetření byly odebrány u 458 psů (78 %) a 135 koček (72 %). Výkaly byly získány během hospitalizace, přineseny majitelem nebo byl proveden odběr rektální tyčinkou. Vlastní parazitologické vyšetření výkalů bylo prováděno na Ústavu parazitologie VFU flotační metodou. Jako flotační roztok byl používán roztok cukru o měrné hmotnosti 1 150. Pokud to bylo možné, opakovali jsme vyšetření třikrát, ale jednalo se pouze o menší část souboru psů. U koček se nám tento způsob nepodařilo zajistit. Vzorky byly vyšetřovány v optickém mikroskopu při zvětšení 200x. Vzorky krve k sérologickému vyšetření byly u psů odebírány z v. *cephalica antebraclii*, popřípadě z v. *saphena* a u koček z v. *jugularis* nebo z v. *cephalica antebraclii*. Získané sérum bylo uchováváno v plastových zkuševkách při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ . Sérologické vyšetření bylo prováděno nepřímou imunofluorescenční reakcí (NFR). Ve spolupráci s Biovetou Ivanovice na Hané jsme získali antigamaglobulinový konjugát králíčí proti psím nebo kočičím gamaglobulinům značený fluoresceinizoithiocyanátem. Korpuskulární antigen giardií jsme izolovali z lidské stolice flotací a následným opakovaným promýváním v pufrovaném fyziologickém roztoku. Tyto pozitivní vzorky pocházeli z Krajské hygienické stanice v Brně. Antigen byl po nanesení na podložní sklíčka fixován acetonem a uchováván při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ . Při vlastním sérologickém vyšetření byla krevní séra ředěna od titru 10 až do výše pozitivního titru. Spolehlivost reakce jsme ověřovali systémem kontrol: negativní kontrola bez séra a pozitivní kontrola s vysoce pozitivními séry (titr 320). Preparáty jsme vyhodnocovali na fluorescenčním mikroskopu Jenalunar 30–60 050 imerzjí při zvětšení 630x. Kvantitativní hodnocení vyšetřovaných vzorků jsme prováděli podle Jírovce (1977).

## VÝSLEDKY

Vyšetřili jsme celkem 588 psů, z nichž bylo 55 bez klinických příznaků onemocnění, zatímco u 533 bylo zjištěno 123 různých diagnóz. Nejčastěji byla zastoupena infekční onemocnění (psinka, parvoviroza). Celkový přehled parazitárních nálezů 458 vyšetřených psů je uveden v tab. I. Cysty giardií byly zjištěny u 25 psů (5,5 %). Současné infekce více druhů parazitů byly prokázány v 66 případech. U 15 psů probíhala giardióza společně s parvovirozou a v jednom případě

I. Přehled parazitů zjištěných ve výkalech psů (n = 458) – A survey of parasites detected in the feces of dogs (n = 458)

Parazit <sup>1</sup>	Pozitivní nálezy <sup>2</sup>	
	Počet <sup>3</sup>	%
<i>Giardia intestinalis</i>	25	5,5
<i>Cryptosporidium</i> sp.	21	4,6
<i>Isospora ohioensis</i>	55	12,0
<i>Hammondia heydorni</i>	4	0,9
<i>Sarcocystis</i> sp.	2	0,4
<i>Toxocara canis</i>	74	16,2
<i>Toxascaris leonina</i>	3	0,7
<i>Trichocephalus vulpis</i>	5	1,1
<i>Ancylostoma caninum</i>	1	0,2
<i>Taenia</i> sp.	3	0,7
Celkem <sup>4</sup>	193	42,3

<sup>1</sup>parasite, <sup>2</sup>positive findings, <sup>3</sup>number, <sup>4</sup>total

II. Kombinace parazitologických a sérologických výsledků vyšetření u psů (n = 458) – Combinations of parasitological and serological results of examinations in dogs (n = 458)

Parazit <sup>1</sup>	Parazitologické vyšetření <sup>2</sup>	Sérologické vyšetření <sup>3</sup>	Počet <sup>4</sup>	%
<i>Giardia intestinalis</i>	–	–	317	69,1
	–	+	117	25,5
	+	–	18	3,9
	+	+	7	1,5

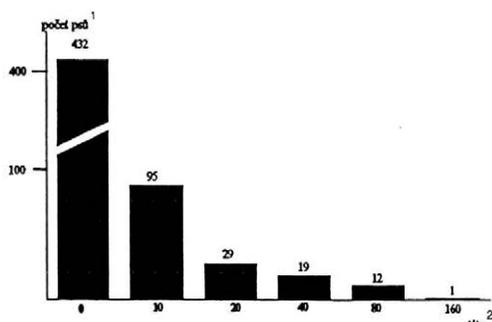
<sup>1</sup>parasite, <sup>2</sup>parasitological examination, <sup>3</sup>serological examination, <sup>4</sup>number

III. Přehled parazitů zjištěných ve výkalech koček (n = 135) – A survey of parasites detected in the feces of cats (n = 135)

Parazit <sup>1</sup>	Pozitivní nálezy <sup>2</sup>	
	Počet <sup>3</sup>	%
<i>Giardia intestinalis</i>	1	0,7
<i>Cryptosporidium</i> sp.	8	5,9
<i>Isospora felis</i>	14	10,4
<i>Isospora rivolta</i>	5	3,7
<i>Toxoplasma gondii</i>	9	6,7
<i>Sarcocystis</i> sp.	4	3,0
<i>Toxocara cati</i>	24	17,8
<i>Toxascaris leonina</i>	1	0,7
Celkem <sup>4</sup>	66	48,9

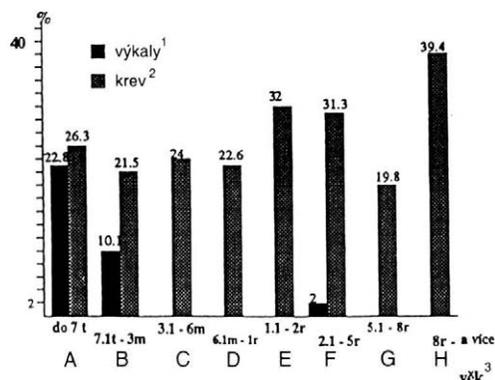
<sup>1</sup>parasite, <sup>2</sup>positive findings, <sup>3</sup>number, <sup>4</sup>total

s psinkou. Protilátky proti giardiím byly detekovány u 156 psů (36,5 %) z celkového počtu vyšetřených zvířat. Titry dosahovaly hodnot 10–160. Nejčastěji byla séra pozitivní v základním ředění 1 : 10 (60,9 %). Výsledky NFR jsou přehledně zřazovány na obr. 1. Srovnání přímého nálezu cyst ve výkalech s hodnotami titrů protilátek v krevním séru je uvedeno v tab. II. Z celkových výsledků vyplývá, že shoda obou vyšetření, tj. obě negativní byla v 317 případech (69,1 %) a obě pozitivní v sedmi případech (1,5 %). Výrazný rozdíl obou



1. Protilátky proti giardiím u psů (n = 588) – Antibodies to giardiasis in dogs (n = 588)

<sup>1</sup>dog number, <sup>2</sup>titre

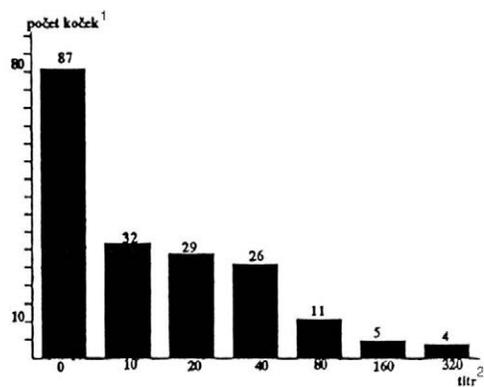


2. Přehled pozitivních nálezů vyšetření výkalů a krve u jednotlivých věkových kategorií psů – *G. intestinalis*; A = do 7 týdnů, B = 7,1 týdně–3 měsíce, C = 3,1–6 měsíců, D = 6,1 měsíce–1 rok, E = 1,1–2 roky, F = 2,1–5 roků, G = 5,1–8 roků, H = 8 roků a více – A survey of positive findings from examination of feces and blood in the particular age categories of dogs – *G. intestinalis*; A = under 7 weeks, B = 7.1 weeks–3 months, C = 3.1–6 months, D = 6.1 months–1 year, E = 1.1–2 years, F = 2.1–5 years, G = 5.1–8 years, H = 8 years and more

<sup>1</sup>feces, <sup>2</sup>blood, <sup>3</sup>age

metod se projevilo ve prospěch sérologického vyšetření ve 117 případech (25,5 %). Vztah věku zvířat k pozitivnímu nálezu cyst ve výkalech a protilátek v krevním séru ukazuje obr. 2. Cysty vylučovali nejčastěji psi nejmladších věkových kategorií do tří měsíců, zatímco s věkem se zvyšoval záchyt specifických protilátek.

Koček jsme vyšetřili 188, z toho 62 bez klinických příznaků onemocnění a 126 nemocných, u kterých bylo zjištěno 43 různých diagnóz. Nejčastěji se jednalo o nemoci parazitárního původu. Přehled nálezů zjištěných při vyšetření výkalů 135 koček je uveden v tab. III. Giardie byly diagnostikovány v jednom případě (0,7 %). Smíšené infekce více druhů parazitů byly prokázány ve 21 případech. Z celkového počtu 188 vzorků krevního séra koček byly protilátky proti giardiím de-



3. Protilátky proti giardiám u koček ( $n = 188$ ) – Antibodies to giardiasis in cats ( $n = 188$ )

<sup>1</sup>cat number, <sup>2</sup>titre

tekovány ve 107 vzorcích, tj. 56,9 % z celkového počtu. Titry dosahovaly hodnot 10–320. Séra byla nejčastěji pozitivní v základním ředění 1 : 10 (29,9 %). Výsledky sérologického vyšetření jsou znázorněny v obr. 3. Srovnání parazitologických nálezů s hodnotami titrů protilátek je přehledně uvedeno v tab. IV. Pozorujeme rovněž výrazný rozdíl (53,3 %) ve prospěch sérologické metody. Vztah pozitivních nálezů NFR k věku koček ukazují obr. 4 a 5. Nezjistili jsme žádnou dispozici k infekci danou pohlavím nebo plemennou příslušností.

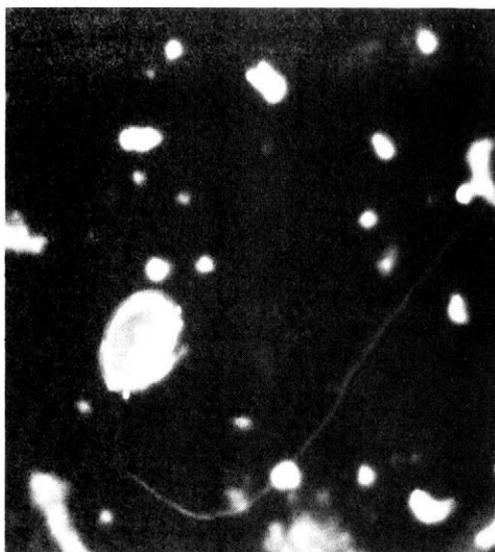
## DISKUSE

V naší práci jsme prokázali cysty *G. intestinalis* u 5,5 % vyšetřených psů s výrazně vyšším záchytem u zvířat nejmladších věkových kategorie (štěňata do sedmi týdnů vylučovala cysty v 23 %). Naše výsledky jsou v souladu s nálezy autorů Kulda a Nohýnková (1978), Jungmann aj. (1986), Svobodová aj. (1987) a dalších, kteří referují o záchyty v rozmezí od 0,5 do 18 %, s častějším výskytem u mláďat, např. Hahn aj. (1988) zjistili u štěňat incidenci cyst giardií až v 35,9 %.\*U koček jsme zachytili cysty ve výkalech pouze jednou, tj. 0,7 %, podobně jako Kulda a Nohýnková (1978) a Wolf a Eckert

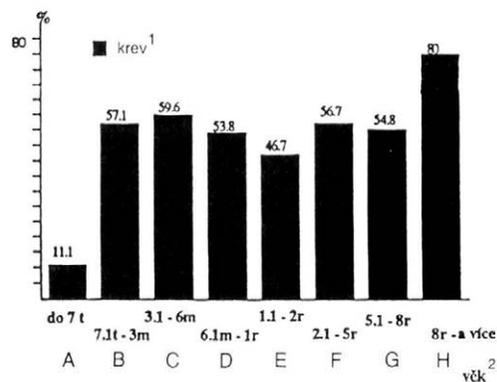
IV. Kombinace parazitologických a sérologických výsledků vyšetření u koček ( $n = 135$ ) – Combinations of parasitological and serological results of examinations in cats ( $n = 135$ )

Parazit <sup>1</sup>	Parazitologické vyšetření <sup>2</sup>	Sérologické vyšetření <sup>3</sup>	Počet <sup>4</sup>	%
<i>Giardia intestinalis</i>	–	–	61	45,2
	–	+	73	54,1
	+	–	0	0
	+	+	1	0,7

<sup>1</sup>parasite, <sup>2</sup>parasitological examination, <sup>3</sup>serological examination, <sup>4</sup>number



4. Cysta *G. intestinalis* při pozitivní NFR – A cyst of *G. intestinalis* at positive NFR



5. Přehled pozitivních nálezů vyšetření krve u jednotlivých věkových kategorií koček – *Giardia intestinalis*; A = do 7 týdnů, B = 7,1 týdne–3 měsíce, C = 3,1–6 měsíců, D = 6,1 měsíce–1 rok, E = 1,1–2 roky, F = 2,1–5 roků, G = 5,1–8 roků, H = 8 roků a více – A survey of positive findings from examination of blood in the particular age categories of cats – *G. intestinalis*; A = under 7 weeks, B = 7.1 weeks–3 months, C = 3.1–6 months, D = 6.1 months–1 year, E = 1.1–2 years, F = 2.1–5 years, G = 5.1–8 years, H = 8 years and more

<sup>1</sup>blood, <sup>2</sup>age

(1979), kteří uvádějí 0,6–3 % pozitivních záchyťů a Kirkpatrick (1986) popisující incidenci 1–11 %. S ohledem na skutečnost, že *G. intestinalis* je charakteristická intermitujícím vylučováním cyst (Faubert, 1988) a naše odběry byly prováděny často jednorázově, můžeme předpokládat vyšší záchytnost při opakovaných odběrech, především u koček. Giardióza se řadí mezi typická oportunní onemocnění (Eckert, 1989)

často doprovázející závažné infekce. Rovněž v našem souboru 25 psů vylučujících cysty byla primárně u 15 diagnostikována parvoviroza a u jednoho psinka (celkem u 64 %). Klinické příznaky giardiózy bylo v případech oportunní infekce těžké posoudit vzhledem k primárnímu onemocnění. V ostatních případech byly pozorovány střídavé průjmy a zhoršená kondice. Tyto klinické příznaky byly výraznější u mladých zvířat, u dospělých proběhla infekce často latentně.

Protilátky proti giardiím byly zjištěny u 156 psů (36,5 %) s titry v rozmezí 10–160, přičemž v základním ředění 1 : 10 byly zjištěny protilátky asi u 61 % sérologicky pozitivních zvířat. Protilátky v ředění 20–160 byly u 61 pozitivních zvířat (39 %). U koček byly specifické protilátky proti giardiím prokázány ve 107 vzorcích krevního séra (57 %). Titry dosahovaly hodnot 10–320. Podíl výskytu protilátek v základním ředění 1 : 10 byl ve srovnání se psy podstatně nižší a činil 30 %. Naproti tomu jsme častěji zjišťovali vyšší titry 20–320 (70 %). Haralabidis (1984) i jiní autoři upozorňují na možnost zkřížených reakcí, a proto vzhledem k často souběžně probíhajícím jiným parazitárním nákazám nepovažujeme ani my titr 10 za signifikantně pozitivní. Předpokládáme však, že v tomto nízkém titru jsou zahrnuty i zbytkové protilátky po dřívější infekci giardiemi. Značný rozdíl mezi přímým nálezem cyst a výskytem protilátek ve vyšším titru v krevním séru koček může souviset s větší citlivostí na použitý antigen. Nash aj. (1988) a Archibald aj. (1991) zjistili různé antigenní vlastnosti giardií izolovaných ze zvířat a člověka, které vykazují větší nebo menší shodu. U psů i koček rostl počet sérologicky pozitivních zvířat s věkem, neboť se v průběhu života setkávají s touto infekcí, která často proběhne latentně nebo oportunně, zvláště u dospělých a starších jedinců. Hautus aj. (1987) upozorňuje na neadekvátní tvorbu protilátek u dětí a typickou protilátkovou odpověď u dospělých. Protilátky v séru perzistují v diagnostickém titru téměř 15 měsíců a jejich titr stoupá s opakovanou infekcí (Giboda, 1988). Zjištění specifických protilátek nám proto nemůže sloužit k přímé diagnostice onemocnění. Jak dokazují Farthing a Goka (1987), má právě tvorba protilátek klíčový význam při odpovědi hostitele na infekci giardiemi. Jejich tvorba je indikátorem imunitních vlastností organismu a úzce souvisí s odolností každého jedince vůči giardióze a s jejím klinickým průběhem, protilátky však samy před reinfekcí nechrání (Smith, 1985). V naší práci jsme potvrdili, že psi a kočky se během svého života často nakazí giardiemi a infekce proběhne s různou intenzitou v závislosti na věku a imunitním stavu organismu, popřípadě oportunně doprovázejí primární onemocnění. K mezidruhovému přenosu však dochází jen za určitých, poměrně vzácných okolností, takže nebezpečí pro člověka by nemělo být přeceňováno (Bemrick aj., 1988; Svobodová aj., 1990; Castor a Lindquist, 1990) Je však samozřejmé, že vždy při pozitivním nálezu cyst je důležité pacienta léčit bez ohledu na klinické příznaky.

## LITERATURA

- ARCHIBALD, S. C. – MITCHELL, R. W. – UPCROFT, J. A. – BOREHAM, P. F. L. – UPCROFT, P.: Variation between human and animal isolates of *Giardia* as demonstrated by DNA fingerprinting. *Int. J. Parasit.*, 21, 1991: 123–124.
- BEMRICK, W. J. – ERLANDSEN, S. L.: Giardiasis – is it really zoonosis? *Parasit. Today*, 4, 1988: 69–71.
- CASTOR, S. B. – LINDQUIST, K. B.: Canine giardiasis in Sweden: no evidence of infectivity to man. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 84, 1990: 249–250.
- ECKERT, J.: New aspects of parasitic zoonoses. *Vet. Parasit.*, 32, 1989: 37–55.
- FARTHING, M. J. G. – GOKA, A. J. K.: Immunology of giardiasis. *Baill. Clin. Gastroenterol.*, 1, 1987: 589–603.
- FAUBERT, G. M.: Evidence that giardiasis is a zoonosis. *Parasit. Today*, 4, 1988: 66–68.
- GIBODA, M.: Jednobuněční paraziti lidského střeva. Praha, Avicenum 1988: 65–71.
- GILMAN, R. H. – BROWN, K. H. – VISVESVARA, G. S. – MONDAL, G. – GREENBERG, B. – SACK BRADLEY, R. – BRANDT, F. – KHAN, M. U.: Epidemiology and serology of *Giardia lamblia* in a developing country: Bangladesh. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 71, 1985: 469–473.
- HAHN, N. E. – GLASER, C. A. – HIRD, D. W. – HIRSH, D. C.: Prevalence of *Giardia* in the feces of pups. *J. A. V. M. A.*, 192, 1988: 1428–1429.
- HARALABIDIS, S. Th.: Immunodiagnosis of giardiasis by ELISA and studies on cross-reactivity between the anti-*Giardia lamblia* antibodies and some heterologous parasitic antigens and fractions. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 78, 1984: 295–300.
- HAUTUS, M. A. – ABDILLAH, H. – LAARMAN, J. J.: Circulating IgG and IgA anti-*Giardia lamblia* antibodies in sera of symptomatic giardiasis patients. *Acta Leidensia*, 56, 1987: 47–55.
- JUNGMANN, R. – HIEPE, Th. – SCHEFFLER, C.: Zur parasitären intestinalen fauna bei Hund und Katze mit einem speziellen Beitrag zur *Giardia*-Infektion. *Mh. Vet. – Med.*, 41, 1986: 309–311.
- KIRKPATRICK, C. E.: Feline giardiasis: a review. *J. Small Anim. Pract.*, 27, 1986: 69–80.
- KIRKPATRICK, C. E.: Giardiasis. *J. Small Anim. Pract.*, 17, 1987: 1377–1387.
- KULDA, J. – NOHÝNKOVÁ, E.: Flagellates of the human intestines and intestines of other species. In: KREIER, J. (ed.): *Parasitic Protozoa II*. New York, Academic Press 1978: 69–104.
- NASH, T. E. – AGGARWAL, A. – ADAM, R. D. – CONRAD, J. T. – MERRITT, J. W. Jr.: Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *J. Immunol.*, 141, 1988: 636–641.
- SMITH, P. D.: Pathophysiology and immunology of giardiasis. *Ann. Rev. Med.*, 36, 1985: 295–307.
- SVOBODOVÁ, V. – SVOBODA, M. – NEVOLE, M.: Giardióza u psů. *Veterinářství*, 37, 1987: 506–508.
- SVOBODOVÁ, V. – NEVOLE, M.: Druhová specifita rodu *Giardia*. In: Ref. Konf. Problematika humánních parazitologů, 22.–24. 6. 1988. *Zpr. Českoslov. Společ. Parazit.* 28/3, 1988: 26.

SVOBODOVÁ, V. – POSPÍŠILOVÁ, D. – SVOBODA, M.:  
Giardióza psů a koček – nebezpečí pro člověka? Veteri-  
nářství, 40, 1990: 457–458.  
SWAN, J. M. – THOMPSON, R. C. A.: The prevalence of  
Giardia in dogs and cats in Perth, Western Australia. Aust.  
Vet. J., 63, 1986: 110–112.

VOKOUN, P.: Ke giardióze psů a koček. Veterinářství, 38,  
1988: 505–507.

WOLFF, K. – ECKERT, J.: Giardia – Befall bei Hund und  
Katze und dessen mögliche Bedeutung für den Menschen.  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 92, 1979: 484–490.

Došlo 23. 5. 1994

---

*Kontaktní adresa:*

MVDr. Vlasta S v o b o d o v á, CSc., Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1–3, 612 42 Brno, Česká republika  
Tel. 05/41 32 12 41, fax 05/41 21 12 41

---

## INZERCE

Redakce časopisu nabízí tuzemským i zahraničním firmám možnost inzerce na stránkách časopisu VETERINÁRNÍ MEDICÍNA. Prostřednictvím inzerátů uveřejňovaných v našem časopise budou o Vašich výrobcích informováni pracovníci z výzkumu a provozu u nás i v zahraničí.

Bližší informace získáte na adrese:

Redakce časopisu VETERINÁRNÍ MEDICÍNA  
k rukám ing. Z. Radošové  
Ústav zemědělských a potravinářských informací  
Slezská 7  
120 56 P r a h a 2

# THE EFFECT OF HIGHER GRAVITATION ON EMBRYONIC DEVELOPMENT OF BIRDS

## VPLYV ZVÝŠENEJ GRAVITÁCIE NA EMBRYONÁLNY VÝVOJ VTÁKOV

V. Sabo, K. Boďa, V. Chrappa

*Institute of Animal Biochemistry and Genetics Slovak Academy of Sciences, Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic*

**ABSTRACT:** An experiment was conducted on Japanese quail and hen hatching eggs that had been incubated, and the embryos were subjected to hypergravitation of 10 G for 10 min on days 1 to 9 of embryonic development. Both the experimental group and the control contained each 20 hatching eggs every day of the experiment (360 eggs in total). A centrifuge of the diameter 1,300 mm was used to create overload (hypergravitation) at the speed of 118 rotations per min. Tab. 1 shows the layout of the experiment. Embryonic mortality in Japanese quail was investigated during incubation by egg candling on days 1 to 8 and 9 to 14 while suffocated embryos were investigated on days 15 to 17. As for chicks, embryonic mortality was determined by egg candling on days 1 to 8 and 9 to 18, suffocated embryos were determined on days 19 to 21. After incubation was terminated, hatchability in per cent of the fertilized eggs was determined. The results were processed in two stages of development: the first stage days 1 to 5, the second stage days 6 to 9. As can be seen in Fig. 1, hypergravitation did not influence the hatchability of quail eggs in the first stage. But this experimental treatment resulted in a steep fall of hatchability in the second stage of observation in comparison with the control group (the difference is significant  $P < 0.01$ ). Fig. 2 shows chick hatchability. It was considerably lower in the experimental group in the first stage of development if compared with the control group, while in the second stage of development it was on the level of control group. Embryonic mortality in Japanese quail, as can be seen in Fig. 3, was higher in the experimental group in the second stage on all days of observation. As for chicks, embryonic mortality was higher in the experimental group in the first stage of development (Fig. 4). The results described seem to document various responses of quail and hen embryos to hypergravitation in dependence upon their stage of development. The determined differences in hatchability and mortality of quail and hen embryos could indicate specifically different responses to the used physical treatment.

Japanese quail; chicks; gravitation; hatchability; mortality

**ABSTRAKT:** Sledoval sa vplyv zvýšenej gravitácie (10 G v priebehu 10 min) v 1.–5. a 6.–9. deň inkubácie na liahnivosť z oplodnených vajec a mortalitu embryí u prepeličích a slepačích násadových vajec. Zistili sme, že tento zásah ovplyvňuje vývoj embryí a ich mortalitu rozdielne v sledovaných štádiách embryogenézy. Bol preukázaný druhový rozdiel v reakcii prepeličích a slepačích embryí na zvýšené preťaženie a následný pokles. U prepeličích embryí pôsobil na zníženie liahnivosti v neskorších časových intervaloch, u kurčiat v skorších intervaloch. Mortalita embryí bola u prepelíc v skorších časových intervaloch nižšia, u kurčiat bola naopak vyššia. Získané výsledky obohacujú gravitačnú embryológiu o nové poznatky.

japonské prepelice; kurčatá; gravitácia; liahnivosť; mortalita

### ÚVOD

Pri štúdiu embryonálneho vývoja vtákov v podmienkach mikrogravitácie v automatickej biologickej družici Kosmos 1129 v pokuse Inkubátor 1 (Sabo a i., 1992) na palube orbitálnej stanice MIR v pokuse Inkubátor 2 (Boďa a i., 1992; Meleško a i., 1991) a na palube raketoplánu Discovery v pokuse STS-29 (Hullinger a i., 1990) sa pozorovali rozdiely v liahnivosti a mortalite v jednotlivých štádiách ich vývoja.

V pokuse Inkubátor 1, kde sa sledovala embryogenéza japonských prepelíc do 12. dňa vývoja, sa zo

60 naložených vajec zistila najvyššia mortalita u letovej skupiny v 1.–4. deň – 56,4 % a iba 33 % embryí dosiahlo 9.–12. deň vývoja (Sabo, 1980).

V pokuse Inkubátor 2 zo 43 naložených vajec v priebehu celej embryogenézy dosiahla mortalita 74,0 % (Boďa a i., 1992). V pokuse STS 29, kde sa študoval vplyv 5-dňovej mikrogravitácie na kuracie embryá inkubované 2 a 9 dní na Zemi, sa zo 16 slepačích vajec, inkubovaných 2 dni na Zemi, po návrate na Zem a následnej inkubácii nevylihlo ani jedno kurča a zo 16 vajec inkubovaných 9 dní na Zemi sa po návrate vylihli všetky kurčatá (Hullinger a i., 1990).

Nakoľko tento jav nebol pozorovaný v synchronnej kontrole, môžeme vylúčiť vplyv preťaženia a vibrácií pri transporte inkubovaných vajíčok na orbitu. Je možné, že na náhly prechod do stavu beztiaže z podmienok zvýšenej gravitácie reagujú zárodok v ranom vývoji, v tomto prípade 2-dňovým, citlivejšie ako 9-dňové.

V našich experimentoch, prezentovaných v predkladanej práci, sme sa pokúsili dať odpoveď na dve otázky: Pôsobí náhly pokles zvýšenej gravitácie v určitých štádiách vývoja embryí rozdielne na ich vývoj a mortalitu? Existujú druhové rozdiely medzi kuracími a prepeličmi embryami v ich reakcii na hypergravitáciu?

## MATERIÁL A METÓDA

V pokuse sa použili prepeličie a slepačie násadové vajíčka. U pokusných skupín v prvý až deviaty deň embryonálneho vývoja boli vajíčka vystavené preťaženiu 10 G v priebehu 10 min, čo z hľadiska gravitácie predstavuje prechod rakety cez stratosféru a následnému poklesu na 1 G.

Pokus sa uskutočnil na centrifúge o priemere 1 300 mm pri 118 otáčkach/min. Na začiatku pokusu bolo z každého druhu naložených do liahne po 40 ks násadových vajíčok. Pokus sa uskutočnil súčasne na prepeličích a kuracích embryách.

V oboch pokusných skupinách bolo použitých každý deň (1.–9. deň) 20 násadových vajíčok, ktoré boli vystavené preťaženiu 10 G v priebehu 10 min na centrifúge.

Celkovo v priebehu deviatich dní bolo použitých 180 vajíčok. Pri nakladaní do liahne a centrifugovaní bola dodržaná rovnaká denná hodina (12 h).

Kontrolné skupiny tvorilo taktiež 20 násadových vajíčok – celkovo za 9 dní 180 vajíčok. Tieto vajíčka neboli centrifugované. Kontrolná skupina bola spolu s pokusnou skupinou v čase centrifugovania prenesená do priestoru, kde bola centrifúga v izolovanej prenoske, aby nedošlo k zachladeniu vajíčok. Schéma pokusu je v tab. I.

V priebehu inkubácie sa sledoval úhyn embryí u prepelíc od 0. do 8. dňa pri prvom presvecovaní, od 9. do 14. dňa pri druhom presvecovaní a od 15. do 17. dňa udusené; u kurčiat od 0. do 8. dňa pri prvom presvecovaní, od 9. do 18. dňa pri druhom presvecovaní a od 19. do 21. dňa udusené. Po ukončení inkubácie sa sledovalo percento liahnutia z oplodnených vajíčok. Tieto údaje sme sledovali v dvoch časových etapách inkubácie:

1. etapa: 1.–5. deň inkubácie,
2. etapa: 6.–9. deň inkubácie.

## VÝSLEDKY

Na obr. 1 sú uvedené priemerné výsledky získané u sledovaných skupín embryí prepelíc preťažených 10 G v priebehu 10 min v 1.–5. a 6.–9. dni ich vývoja. Ako vidno z grafu liahnivosť po preťažení embryí 1.–

I. Schéma pokusu – Experiment layout

Dni inkubácie <sup>1</sup>	Skupina <sup>2</sup>	Vajcia (ks) <sup>3</sup>
21. 17.	absolútna kontrola <sup>4</sup>	40
1.	kontrolná <sup>5</sup>	20
	pokusná <sup>6</sup>	20
2.	kontrolná	20
	pokusná	20
3.	kontrolná	20
	pokusná	20
4.	kontrolná	20
	pokusná	20
5.	kontrolná	20
	pokusná	20
6.	kontrolná	20
	pokusná	20
7.	kontrolná	20
	pokusná	20
8.	kontrolná	20
	pokusná	20
9.	kontrolná	20
	pokusná	20

<sup>1</sup>days of incubation, <sup>2</sup>group, <sup>3</sup>eggs (number), <sup>4</sup>absolute control, <sup>5</sup>control, <sup>6</sup>experimental

5. deň ich vývoja nebola týmto zásahom ovplyvnená a dosahovala úroveň kontrolnej skupiny.

Preťaženie embryí 6.–9. deň vývoja malo za následok prudký pokles liahnivosti (44,45 %)/v porovnaní s kontrolnou skupinou (70,34 %). Rozdiel je signifikantný ( $P < 0,01$ ).

Na obr. 2 uvádzame výsledky liahnivosti u kurčiat, ktorých embryá boli preťažené 10 G v priebehu 10 min v 1.–5. a 6.–9. dni ich vývoja.

Z grafu je vidno, že liahnivosť v porovnaní s kontrolnou skupinou (54,05 %) bola po preťažení embryí v 1.–5. deň inkubácie podstatne nižšia (35,57%). Po preťažení v 6.–9. deň inkubácie liahnivosť u pokusnej i kontrolnej skupiny bola na rovnakej úrovni.

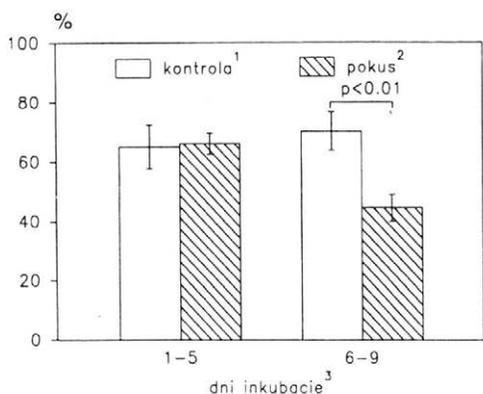
Na obr. 3 je uvedený priemerný úhyn embryí prepelíc po preťažení 1.–5. a 6.–9. deň inkubácie.

Úhyn embryí v porovnaní s kontrolou bol po preťažení v 6.–9. deň inkubácie vyšší vo všetkých sledovaných dňoch vývoja. Signifikantný rozdiel bol pri preťažení v 6.–9. dni inkubácie v 15.–17. dni vývoja ( $P < 0,05$ ).

U kurčiat, ako to vidno na z obr. 4, bol úhyn embryí vyšší v porovnaní s kontrolou po preťažení v 1.–5. deň inkubácie.

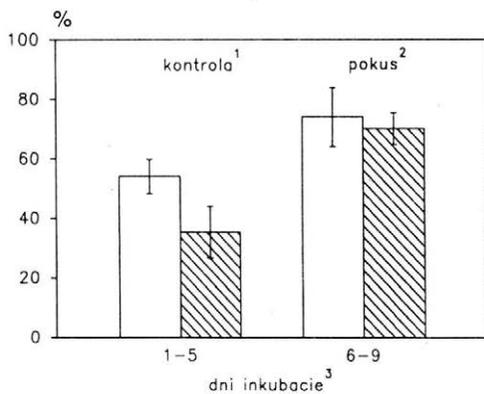
## DISKUSIA

Zistenie o znížení liahnivosti a zvýšení mortality po preťažení v 6.–9. deň inkubácie u prepelíc je v súlade s výsledkami S a b a (1980), ktorý zistil, že preťaženie



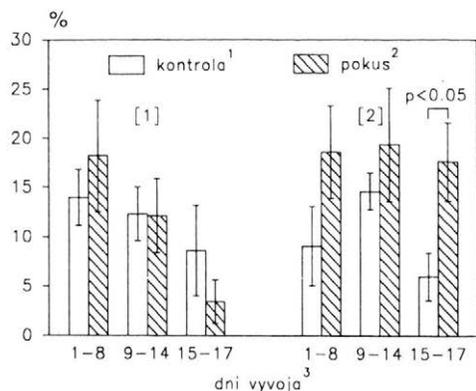
1. Liahnivosť z násadových vajec Japonských prepelíc po pôsobení preťaženia 10 G/10 min v priebehu inkubácie – Hatchability of hatching eggs of Japanese quail after their exposure to hypergravitation of 10 G/10 min during incubation

<sup>1</sup>control group, <sup>2</sup>experimental group, <sup>3</sup>days of incubation



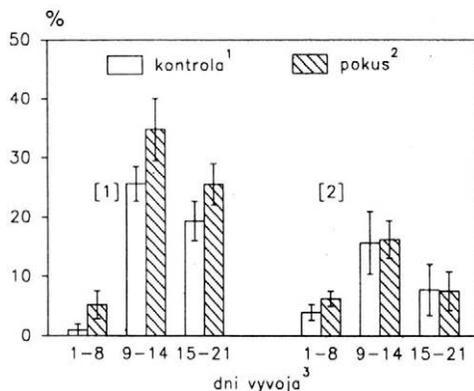
2. Liahnivosť zo slepačích násadových vajec po pôsobení preťaženia 10 G/10 min v priebehu inkubácie – Hatchability of hatching eggs of hens their exposure of hypergravitation of 10 G/10 min during incubation

<sup>1</sup>control group, <sup>2</sup>experimental group, <sup>3</sup>days of incubation



3. Mortalita embryí Japonských prepelíc po pôsobení preťaženia 10 G/10 min v priebehu inkubácie – Embryonic mortality in Japanese quail after exposure to hypergravitation of 10 G/10 min during incubation

<sup>1</sup>control group, <sup>2</sup>experimental group, <sup>3</sup>days of development



4. Mortalita slepačích embryí po pôsobení preťaženia 10 G/10 min v priebehu inkubácie – Embryonic mortality in hens after exposure to hypergravitation of 10 G/10 min during incubation

<sup>1</sup>control group, <sup>2</sup>experimental group, <sup>3</sup>days of development

10 G v priebehu 10 min v 12. deň inkubácie prepelícich vajec malo za následok zníženie liahnivosti.

Výsledky o nepriaznivom vplyve preťaženia v 1.–5. deň inkubácie na liahnivosť a prežívanie embryí kurčiat korešpondujú s výsledkami pokusu STS-29 (Hullinger, 1990), v ktorom boli vystavené preťaženiu dvojďňové embryá. Náhly prechod embryí do stavu bezťažie predisponične podmienený zvýšenou gravitáciou mohol ovplyvniť úhyn embryí.

Zo získaných výsledkov vyplýva, že náhly pokles zvýšenej gravitácie v určitých štádiách vývoja embryí

má vplyv na úroveň liahnivosti a mortality. Nižšia liahnivosť a vyššia mortalita boli zistené u prepelíc po preťažení v 6.–9. deň inkubácie, u kurčiat po preťažení v 1.–5. deň inkubácie.

Dosiahnuté výsledky ako sa zdá poukazujú na rozdielnu reakciu prepelícich a slepačích embryí na pôsobenie hypergravitácie v závislosti od ich vývojového štádia. Pozorované rozdiely v liahnivosti i v mortalite prepelícich a slepačích embryí by mohli svedčiť o druhovo rozdielnej odpovedi na použitý fyzikálny zásah.

## LITERATÚRA

BOĎA, K. – SABO, V. – JURÁNI, M. – GURYEVA, T. S. – KOČIŠOVÁ, J. – KOŠTÁL, L., – LAUKOVÁ, A. – DADASHEVA, O. A.: Embryonic development and behaviour of Japanese quail exposed to microgravity. *Acta Vet.*, 61, 1992: 99–107.

HULLINGER, R. L. – VELLINGER, J. C. – SHARP, P. E.: Avian embryogenesis in microgravity aboard Shuttle STS-29: Embryonic survival and measurement of developmental age. *ASGSB – Bull.*, 4, 1990: 27.

MELEŠKO, G. I. – ŠEPELEV, E. JA. – GURYEVA, T. S. – BOĎA, K. – SABO, V.: Embryonic development in fowls

under weightlessness (in Russian). *Space Biol. Aerospace Med.*, 25, 1991: 37–39.

SABO, V.: Influence of weightlessness upon embryogenesis of production poultry. Institute of Animal Biochemistry and Genetics, SAS, Ph. D. thesis, Ivanka pri Dunaji, Slovakia 1980.

SABO, V. – BOĎA, K. – SHEPELEV, E. YA. – PETER, V. – NOSKIN, A. D.: Development of Japanese quail embryos under the conditions of weightlessness. *Sci. Agric. Bohemoslov.*, 14, 1982: 141–146.

Došlo 5. 8. 1994

---

### *Kontaktná adresa:*

Ing. Vladimír S a b o, CSc., Ústav biochémie a genetiky živočíchov SAV, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovenská republika  
Tel. 07/94 38 81, fax 07/94 33 17

---

## ADVERTISEMENT

The Editors of the journal offer to the Czech as well as foreign firms the possibility of advertising on pages of the *VETERINÁRNÍ MEDICÍNA* (Animal Production) journal. Through your adverts published in our journal, the specialists both from the field of research and production will be informed about your products.

For more detailed information, please contact:

**VETERINÁRNÍ MEDICÍNA**  
attn. ing. Zdeňka Radošová  
Ústav zemědělských a potravinářských informací  
Slezská 7  
120 56 P r a h a 2

# APPLICATION OF NEFERM-TEST TO IDENTIFICATION OF PSYCHROTROPHIC BACTERIA ISOLATED FROM FOODS

## UPLATNĚNÍ NEFERM-TESTU V IDENTIFIKACI PSYCHROTROFNÍCH BAKTERIÍ IZOLOVANÝCH Z POTRAVIN

E. Urbanová<sup>1</sup>, Z. Páčová<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic*

<sup>2</sup> *Czech Collection of Microorganisms, Faculty of Science at Masaryk University, Brno, Czech Republic*

**ABSTRACT:** Identification of gramnegative nonfermentative bacteria by traditional methods requires much labor and time consumption. Therefore in this study we tested the use of an available commercial diagnostic kit and processing of its results by computerized numerical identification systems. Identification involved 83 gramnegative, psychrotrophic, nonfermentative, oxidase-positive bacteria isolated from just slaughtered and deep-frozen chickens. The strains were isolated from primary cultures in Pseudomonas F and Endo agar, Violet Red Bile agar (IMUNA, OXOID) and King B agar (King et al., 1954), under two cultivation regimes (room temperature for three days and 7 °C for 10 days). A commercial kit for diagnostics of nonfermentative bacteria in clinical microbiology under the name NEFERM-test (Lachema a.s., Brno) containing 12 biochemical assays was used for strain identification: GLU, AGR, IND, ESL, SCI, PHS, URE, MAN, XYL, MLT, LAC, NIT. All these assays were conducted parallelly by traditional methods. Additional tests involved the use of OXI and ONPG commercial strips (Lachema a.s., Brno), gelatin and Tween 80 hydrolysis (Páčová and Kocur, 1984) and fluorescein production (King et al., 1954). These identification systems were used to process the results of all tests: index and differentiation table (Lachema a. s., Brno) and numerical computerized systems TNW (Czech Collection of Microorganisms, Brno) and IDENTI (Z. Svoboda, Jihlava). Various shortened procedures, identification keys and systems are used to speed up identification of gramnegative nonfermentative bacteria. Available commercial identification kits (API NE20) in form of microassay have been developed particularly for diagnostics of bacteria from clinical materials, which applies to NEFERM-test of the Czech make. We tested the use of NEFERM-test for identification of psychrotrophic bacterial contaminants isolated from raw material of animal source. Processing of the results of the assays obtained from a NEFERM-test plate only and reactions of ONPG strips brought about absolutely unsatisfactory identification of the investigated bacteria in all evaluated types of identification systems. Tab. I shows that the IDENTI system, TNW system and differentiation table had 35%, 31% and 11% abilities, respectively, to identify the tested strains correctly. Nortje et al. (1990) reported on similar experience, that means on a large failure of the API NE20 system to identify psychrotrophic bacteria in meat. On the basis of literary references (Molin and Ternström, 1982, 1986) and of our own practical experience we supposed that the tested psychrotrophic nonfermentative strains isolated from meat would be mainly fluorescent pseudomonas difficult to discriminate by NEFERM-test. Three additional tests (gelatin, Tween 80, King B) were chosen to facilitate differentiation of our isolates. Applying the results of the latter tests, identification was very satisfactory. It involved the identification system TNW only since only this test can be used together with additional tests. Tab. II shows the resultant identification. It is apparent from this procedure that generic identification was successful in 100% out of 83 tested strains, and specific identification was successful in 84.3% of the strains. TNW program classified 13 isolated strains as intermediary, but further tests confirmed correct specific identification in eight (9.7%) out of these strains. It is to note that the additional tests we used highly expressly increased the percentage of successful specific identification (94%). Tab. III shows an overview of isolated and identified bacteria which documents that the species of *Pseudomonas* genus, *P. fluorescens* 54 strains (65.1%) and *P. fragi* 13 strains (15.7%), were present most frequently in the set of psychrotrophic bacteria. Species representation of the bacteria we isolated from chickens (89% pseudomonads) is in keeping with literary data on meat and poultry contamination. Molin and Ternström (1982, 1986) tested 200 psychrotrophic pseudomonas isolated from meat (mainly from pork and beef). Unlike our study, the strains *P. fragi* (58%), *P. fluorescens* (24%) and *P. lundensis* (18%) were mainly represented in their set of bacteria. Even though the identification ability of the NEFERM-test used alone was very low, the results obtained with the kit cannot be evaluated negatively. Tab. IV shows a comparison of the results of the particular assays from a NEFERM-test microplate with the results of traditional methods. It documents a very high goodness of fit of the investigated tests ranging from 82 to 100%. To a lesser extent there occurred some falsely positive and/or negative results in comparison with the traditional tests, particularly in sugar fermentation where largest discrepancies were observed in lactose having 18.1% of falsely negative results in NEFERM-test. As mentioned by Rojíčková (1994) the results of sugar fermentation often contain discrepancies.

gramnegative nonfermentative bacteria; diagnostic kit NEFERM-test; numerical identification systems; pseudomonads

**ABSTRAKT:** Bylo identifikováno 83 gramnegativních psychrotrofních nefermentujících bakterií izolovaných z čerstvých a zamražených kuřat s využitím komerčního setu – NEFERM-test a numerických identifikačních programů. Výsledky samotného NEFERM-testu neposkytly dostatečně rozlišené testovaných bakterií (11–35 % správně taxonomicky zařazených kmenů). Po přiřazení tří dalších diagnosticky průkazných testů byly při použití numerického počítačového systému (TNW) získány velmi dobré výsledky (94 % kmenů správně taxonomicky zařazeno). V souboru 83 kmenů byl nejčastěji zastoupen rod *Pseudomonas* a to druhy *P. fluorescens* (65 % testovaných kmenů) a *P. fragi* (16 % testovaných kmenů).

gramnegativní nefermentující bakterie; diagnostický set NEFERM-test; numerické identifikační systémy; pseudomonády

## ÚVOD

Do skupiny psychrotrofních bakterií, které jsou schopny normálních metabolických projevů za nízkých teplot, při nichž se skladují suroviny a potraviny živočišného původu, náleží jak gramnegativní fermentující i nefermentující tyčky, tak grampozitivní tyčky i koky. Převaha jedné nebo druhé je závislá od druhu potraviny a je ovlivňována především vodní aktivitou a skladovacími podmínkami. Během uchovávání surovin, jejich zpracování a následném skladování a distribuci za nízkých teplot (chlazení a mrazení) bývá potlačena původní mikroflóra a dominantní se stávají psychrotrofní druhy rodů *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Shewanella* a *Flavobacterium* (Gill a Newton, 1977; Venugopal, 1990; Prieto aj., 1992, 1993). Extracelulární enzymy, především proteázy a lipázy, produkované těmito bakteriemi, jsou převážně termorezistentní a jejich rezidua mohou ovlivňovat i jakost tepelně opracovaných výrobků. Výsledkem jsou senzorké změny, např. hořknutí, rosolovatění, defektní aroma, případně i technologické potíže při zpracování suroviny. U masa mají významnou roli extracelulární proteázy těchto bakterií i v tom, že umožňují penetraci kontaminujících patogenních mikroorganismů do svalů, neboť přirozená rezistence sarkoplazmatických proteinů mezi pouzdrem a svalovými vlákny je porušována proteolytickou aktivitou psychrotrofů. Následky se tedy mohou odrazit i v oblasti alimentárních onemocnění.

Mnozí autoři prokázali, že na nutričních i senzorkých změnách syrového mléka a mléčných výrobků se především podílí gramnegativní psychrotrofní bakterie svojí lipolytickou a proteolytickou aktivitou (Cousin, 1982; Muir a Phillips, 1984). Jiné literární zdroje dokazují dominantní postavení psychrotrofních druhů rodu *Pseudomonas* i u masa a masných výrobků (Carr a Marchello, 1987; Nortje aj., 1990). Nortje aj. (1990) uvádějí, že na jatkách při bourání masa tvořily pseudomonády 36 % mikroflóry, ale na mase v chladírně již 51 %. Rovněž jsou popsány četné projevy degradace rybího masa druhu rodu *Pseudomonas* (*P. fragi* a *P. fluorescens*) a *Shewanella putrefaciens*. Mnoha autory je studována dekarboxylace histidinu kontaminujícími bakteriemi a následná možnost organoleptických změn (Peconek, 1991). Dominantní postavení druhů rodu *Pseudomonas* izolovaných z kuřat udává řada autorů (Barnes a Impey, 1968;

Urbanová, 1991; Barnes, 1994; Hamilton a Ahmad, 1994; Kakouri a Nychas, 1994).

Z uvedeného je patrné, že jedním z důležitých momentů pro další prognózu suroviny a potraviny z hlediska jakosti a skladovatelnosti je vedle stanovení počtů kontaminujících psychrotrofních bakterií i jejich rychlá a spolehlivá identifikace. Určení gramnegativních nefermentujících bakterií klasickými metodami je záležitost velmi pracná a časově náročná. Proto jsme v této práci ověřily možnost použití dostupného komerčního diagnostického setu a vyhodnocení jeho výsledků numerickými identifikačními systémy na počítači.

## MATERIÁL A METODY

Bylo testováno 83 gramnegativních, psychrotrofních, nefermentujících, oxidáza pozitivních bakterií izolovaných z čerstvě poražených (Drůbežářské závody, Modřice u Brna) a zamražených (14 dní) kuřat. Kmeny byly izolovány z primokultur na *Pseudomonas* F a Endo agaru (Imuna, Šarišské Michalany), Violet Red Bile agaru (OXOID), King B agaru (King aj., 1954), ze dvou kultivačních režimů (pokojová teplota/3 dny a 7 °C/10 dní).

K identifikaci izolovaných kmenů byl použit komerční set pro diagnostiku nefermentujících bakterií v klinické praxi NEFERM-test (Lachema a. s., Brno) obsahující 12 biochemických testů: glukóza (GLU), arginin (ARG), indol (IND), eskulin (ESL), Simmons citrát (SCI), fosfatáza (PHS), ureáza (URE), manitol (MAN), xyulóza (XYL), maltóza (MLT), laktóza (LAC), nitráty (NIT). Souběžně byly tyto testy provedeny klasickými konvenčními metodami. Jako doplňkové testy byly provedeny: oxidáza (OXI) a β-galaktosidáza (ONPG) komerčními proužky (Lachema a. s. Brno), dále hydrolyza želatiny a Tweenu 80 (Páčová a Kocur, 1984) a produkce fluoresceinu (King aj., 1954).

K vyhodnocení výsledků testů byly použity tři dostupné identifikační systémy: index a diferenciací tabulka (Lachema a. s. Brno) a numerické počítačové systémy – TNW (Česká sbírka mikroorganismů, Brno) a IDENTI (Z. Svoboda, Jihlava).

Testované bakteriální kmeny nerostly při teplotě 37 °C. Každý kmen byl testován dvakrát k ověření spolehlivosti komerčního setu a vyloučení technických chyb při inokulaci kytu.

## VÝSLEDKY

Po zhodnocení výsledků testů pouze z desky NEFERM-testu a reakcí ONPG-proužků jsme získaly naprosto nedostatečnou identifikaci testovaných bakterií u všech hodnocených typů identifikačních systémů. Z tab. I je patrné, že systém IDENTI prokázal 35%, TNW 31% a diferenciační tabulka jen 11% schopnost správně identifikovat testované kmeny.

Na základě těchto výsledků byly vybrány tři dodatkové testy (želatina, Tween 80, King B) pro umožnění identifikace našich izolátů. Po doplnění o výsledky těchto testů bylo dosaženo velmi dobré identifikace. Tato identifikace byla provedena pouze identifikačním systémem TNW, neboť ten umožnil identifikaci rozšířit o dodatkové testy. Druhý program IDENTI lze rozšířit jen o test katalázy a pigmentu. Výsledná identifikace získaná po rozšíření diferenciace o tři testy je uvedena v tab. II. Z tabulky je patrné, že z 83 testovaných kmenů bylo správně rodově zařazeno 100 % kmenů a jednoznačně druhově 84,3 % (70) kmenů. 13 izolovaných kmenů bylo programem TNW označeno jako intermediární, u osmi (9,7 %) z nich však bylo potvrzeno dalšími testy správné druhové zařazení. Lze tedy konstatovat 94% úspěšnost druhové identifikace (78 kmenů).

Přehled izolovaných a identifikovaných bakterií je uveden v tab. III. Z tohoto přehledu vyplývá, že nejčastěji v souboru psychrotrofních bakterií byly zastou-

peny druhy rodu *Pseudomonas* a to *P. fluorescens* 54 kmenů (65, 1 %) a *P. fragi* 13 kmenů (15,7 %).

Porovnání výsledků jednotlivých testů z mikrodesetičky NEFERM-testu oproti výsledkům konvenčních metod je uvedeno v tab. IV. Vyplývá z ní velmi dobrá shoda mezi sledovanými testy, která se pohybuje od 82 % do 100 %. V menší míře se vyskytovaly některé falešně pozitivní, resp. negativní výsledky oproti konvenčním testům, zejména u fermentace cukrů, kde největší diskrepance se prokázaly u laktózy (LAC) v NEFERM-testu dávající 18,1 % falešně negativních výsledků.

III. Druhové zastoupení v souboru 83 testovaných psychrotrofních bakterií – Species percentages in the set of 83 tested psychrotrophic bacteria

Kmen <sup>1</sup>	Počet <sup>2</sup>	%
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	54	65,1
<i>Pseudomonas fragi</i>	13	15,7
<i>Pseudomonas putida</i>	2	2,4
<i>Pseudomonas</i> sp.	5	6,0
<i>Shewanella putrefaciens</i>	1	1,2
<i>Flavobacterium indologenes</i>	3	3,6
<i>Flavobacterium odoratum</i>	2	2,4
<i>Flavobacterium mizutaii</i>	2	2,4
<i>Moraxella lacunata</i>	1	1,2

<sup>1</sup>strain, <sup>2</sup>number

I. Identifikace 83 psychrotrofních bakterií na základě výsledků NEFERM-testu – Identification of 83 psychrotrophic bacteria on the basis of NEFERM-test results

Identifikační systém <sup>1</sup>	Správně určené kmeny <sup>2</sup>	
	počet <sup>3</sup>	%
Index + tabulka výrobce <sup>4</sup>	9	10,8
TNW	26	31,3
IDENTI	29	34,9

\* = 21 vypočítaných indexů nebylo v tabulce nalezeno – 21 calculated indexes were not found in the table

<sup>1</sup>identification system, <sup>2</sup>successfully identified strains, <sup>3</sup>number, <sup>4</sup>index + manufacturer's table

II. Identifikace 83 psychrotrofních bakterií s použitím doplňkových testů systémem TNW – Identification of 83 psychrotrophic bacteria by TNW system and additional tests

Zařazení <sup>1</sup>	Počet <sup>2</sup>	%
Rodové <sup>3</sup>	83	100,0
Druhové <sup>4</sup>	70	84,3
Intermediární – rodové <sup>5</sup>	13	15,7
Správný druh <sup>6</sup>	8	9,7
Pouze rodové <sup>7</sup>	5	6,0
Celkem druhové <sup>8</sup>	78	94,0

<sup>1</sup>identification, <sup>2</sup>number, <sup>3</sup>generic, <sup>4</sup>specific, <sup>5</sup>intermediary – generic, <sup>6</sup>correctly identified species, <sup>7</sup>only generic, <sup>8</sup>specific in total

IV. Srovnání výsledků biochemických testů konvenčních a z NEFERM-testu při identifikaci psychrotrofních bakterií – Comparison of results of traditional biochemical tests and those of NEFERM-test obtained in the course of identification of psychrotrophic bacteria

Test <sup>1</sup>	Shodné výsledky <sup>2</sup>		Falešně pozitivní <sup>3</sup>		Falešně negativní <sup>4</sup>	
	počet <sup>5</sup>	%	počet	%	počet	%
ARG	83	100,0				
IND	83	100,0				
ESC	83	100,0				
PHS	82	98,8			1	1,2
SCI	82	98,8	1	1,2		
URE	80	96,4	3	3,6		
NIT	74	89,2	5	6,0	4	4,7
Cukry:*						
GLU	82	98,8			1	1,2
XYL	82	98,8	1	1,2		
MAN	79	95,2	3	3,6	1	1,2
MLT	76	91,6			7	8,4
LAC	68	81,9			15	18,1

\* Cukry: konvenční metoda (O-F médium), NEFERM-test (ASS médium) – Sugars: traditional method (O-F medium), NEFERM-test (ASS medium)

<sup>1</sup>test, <sup>2</sup>goodness of fit of the results, <sup>3</sup>falsely positive, <sup>4</sup>falsely negative, <sup>5</sup>number

Pro urychlení identifikace gramnegativních nefermentujících bakterií jsou používány různé zkrácené postupy, identifikační klíče a systémy. V současnosti jsou dostupné komerční identifikační sety (např. API NE20) ve formě mikrotěst, vyvinuté především pro diagnostiku bakterií z klinických materiálů. I u nás je v posledních letech na trhu NEFERM-test určený k diagnostice této skupiny bakterií. V práci byla ověřena možnost využít NEFERM-test k identifikaci psychrotrofních bakteriálních kontaminantů izolovaných ze suroviny živočišného původu. Současně byly posouzeny tři dostupné identifikační systémy pro vyhodnocení výsledků komerčního setu – index a tabulka výrobce setu a dva počítačové numerické systémy. Výsledné procento úspěšné identifikace ve všech případech bylo nedostačující (11–35 %). Na základě literárních údajů (Molin a Ternström, 1982, 1986) a našich praktických zkušeností jsme předpokládaly, že testované psychrotrofní nefermentující oxidáza pozitivní kmeny izolované z masa budou především fluorescentní pseudomonády, které se NEFERM-testem rozlišují jen obtížně. Po rozšíření NEFERM-testu o doplňkové testy (hydrolyza želatiny a Tweenu 80, produkce fluoresceinu) se výrazně zvýšilo výsledné procento druhové identifikace (úspěšnost 84 resp. 94%). Vyplýval z toho jednoznačný závěr, že identifikaci psychrotrofních nefermentujících bakterií nelze úspěšně provést pouze na základě výsledků NEFERM-testu, v tomto případě i identifikace počítačovými systémy byla hodnocena jako intermediární. Obdobně značnou nedostatečnost systému API NE20 pro identifikaci psychrotrofů z masa publikovali Nortje aj. (1990). Vzhledem k tomu, že se jedná o psychrotrofní bakterie (37 °C – negativní), izolované z kuřat (manit-negativní), docházelo při vyhodnocení identifikačního skóre a T-indexu k mírným odchylkám, neboť TNW program je koncipován na klinický materiál. Tyto odchylky však výrazně neovlivnily správnost zařazení kmene.

Druhové zastoupení námi izolovaných psychrotrofních bakterií z kuřat (89 % pseudomonád) odpovídá literárním údajům o kontaminaci masa a drůbeže. Převahu druhů rodu *Pseudomonas* u izolátů z kuřat skladovaných při nízkých teplotách potvrzují práce autorů Hamilton a Ahmad, (1994); Kakouri a Nychas, (1994) a Barnes (1994). Autoři udávají, že rychlost degradace kuřecího masa závisí na výchozím počtu a typu psychrotrofních kontaminantů. Důležitým zdrojem psychrotrofních pseudomonád je v tomto případě voda, případně voda s ledem v celém průběhu opracování drůbeže. Jak uvádí Barnes (1994) voda i studniční, i když hygienicky nezávadná, může obsahovat i několik set pseudomonád v 1 ml. Mnozí autoři prokázali rezistenci pseudomonád vůči chlóru a jódu a jejich proliferaci po suboptimální desinfekci vody těmito halogeny (Ridway a Olson, 1982; Pyle a McFeters, 1990). Molin a Ternström (1982, 1986) testovali 200 psychrotrof-

ních pseudomonád izolovaných z masa (převážně vepřového a hovězího). Hlavní zastoupení měly kmeny druhů *P. fragi* (58 %), *P. fluorescens* (24 %) a *P. lundensis* (18 %). V našem souboru kmenů izolovaných z kuřat jsme nejčastěji identifikovaly *P. fluorescens* (65 %) a *P. fragi* (16 %).

Přestože identifikační schopnost samostatného NEFERM-testu byla velmi nízká, nelze hodnotit výsledky v kitu negativně. Byla prokázána vysoká shoda mezi testy z kitu a konvenčními, která je částečně ovlivněna tím, že byla hodnocena velká skupina kmenů jednoho druhu a rodu nefermentujícího cukry, resp. s nízkou fermentací cukrů. Právě u těchto testů se vyskytují časté diskrépance (Rojíčková, 1994).

Závěrem lze hodnotit identifikaci gramnegativních nefermentujících psychrotrofních bakterií pomocí NEFERM-testu s dodatkem tří diferenačních testů a identifikačního programu TNW jako racionální krok k zrychlení a zpřesnění identifikace těchto kontaminantů.

## LITERATURA

- BARNES, E. M.: Personal recollection of development in food microbiology. *J. Appl. Bact.*, 74, 1994: 5–12.
- BARNES, E. M. – IMPEY, C. S.: Psychrophilic spoilage bacteria of poultry. *J. Appl. Bact.*, 31, 1968: 97–107.
- CARR, T. P. – MARCHELLO, J. A.: Growth of aerobic psychrotrophs and color changes of precooked beef slices as affected by packaging procedure. *J. Fd. Protect.*, 50, 1987: 733–736.
- COUSIN, M. A.: Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. *J. Fd. Protect.*, 45, 1982: 172–207.
- GILL, C. C. – NEWTON, K. G.: The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. *J. Appl. Bact.*, 43, 1977: 189–195.
- HAMILTON, M. A. E. – AHMAD, M. H.: Isolation and characterisation of *Pseudomonas* from processed chicken in Jamaica. *Lett. Appl. Microbiol.*, 18, 1994: 21–23.
- KAKOURI, A. – NYCHAS, G. J. E.: Storage of poultry meat under modified atmospheres or vacuum packs: possible role of microbial metabolites as indicator of spoilage. *J. Appl. Bact.*, 76, 1994: 163–172.
- KING, E. O. – WARD, M. K. – RANAY, D. J.: Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.*, 44, 1954: 301.
- MOLIN, G. – TERNSTRÖM, A.: Numerical taxonomy of psychrotrophic pseudomonads. *J. Gen. Microbiol.*, 128, 1982: 1249–1264.
- MOLIN, G. – TERNSTRÖM, A.: Phenotypically based taxonomy of psychrotrophic *Pseudomonas* isolated from spoiled meat, water, and soil. *Int. J. Syst. Bact.*, 36, 1986: 257–274.
- MUIR, D. D. – PHILLIPS, J. D.: Prediction of the shelf life of raw milk during refrigerated storage. *Milchwissenschaft*, 39, 1984: 7–11.
- NORTJE, G. L. – NEL, L. – JORDAAN, E. – BADENHORST, K. – GOEDHART, E. – HOLZAPFEL, W. H.: The

- aerobic psychrotrophic populations on meat and meat contact surfaces in a meat production system and on meat stored at chill temperatures. *J. Appl. Bact.*, 68, 1990: 335-344.
- PÁČOVÁ, Z. – KOCUR, M.: New medium for detection of esterase and gelatinase activity. *Zbl. Bakt. Hyg., R. A.*, 258, 1984: 69-73.
- PECONEK, J.: The role of some groups of psychrophilic bacteria in the fish spoil age process. *Roczn. PZH*, 42, 1991: 407-413.
- PRIETO, M. – GARCÍA-ARMESTO, M. R. – GARCÍA-LÓPEZ, M. L. – ALONSO, C. – OTERO, A.: Species of *Pseudomonas* obtained at 7 °C and 30 °C during aerobic storage of lamb carcasses. *J. Appl. Bact.*, 73, 1992: 317-323.
- PRIETO, M. – GARCÍA-LÓPEZ, M. L. – GARCÍA-ARMESTO, M. R. – OTERO, A. – LÓPEZ, T. M. – MORENO, B.: Factors affecting spoilage microflora succession on lamb carcasses at refrigeration temperatures. *J. Appl. Bact.*, 74, 1993: 521-525.
- PYLE, B. H. – McFETERS, G. A.: Population dynamics of pseudomonads after iodination. *Can. J. Microbiol.*, 36, 1990: 801-803.
- RIDGWAY, H. F. – OLSON, B. H.: Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems. *Appl. Envir. Microbiol.*, 44, 1982: 972-987.
- ROJÍČKOVÁ, R.: Využití soupravy NEFERMtest pro identifikaci gramnegativních nefermentujících tyčků vyskytujících se v klinickém materiálu. [Diplomová práce.] Brno 1994: 40 s. – Přirodovědecká fakulta MU.
- URBANOVA, E.: Podíl psychrotrofních bakterií na mikroflóře čerstvě poražených a zamražených kuřat. *Živoč. Vyr.*, 36, 1991: 283-288.
- VENUGOPAL, V.: Extracellular proteases of contaminant bacteria in fish spoilage: A review. *J. Fd. Protect.*, 53, 1990: 341-350.

Došlo 9. 8. 1994

---

*Kontaktní adresa:*

RNDr. Eva Urbanová, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika  
Tel. 05/41 32 12 41, fax 05/41 21 12 29

---

## 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) zasílali 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*

# DEVITALIZATION OF BACTERIAL AND PARASITIC GERMS IN SEWAGE SLUDGE DURING AEROBIC DIGESTION UNDER LABORATORY CONDITIONS\*

## DEVITALIZÁCIA BAKTERIÁLNYCH A PARAZITÁRNYCH ZÁRODKOV PRI AERÓBNEJ STABILIZÁCII TEKUTÝCH KALOV V LABORATÓRNYCH PODMIENKACH

P. Juriš<sup>1</sup>, P. Plachý<sup>1</sup>, A. Lauková<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Parasitological Institute, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic

<sup>2</sup>Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic

**ABSTRACT:** The survival of 8 bacterial species (*Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* sp., *Escherichia coli*) was detected in municipal sewage sludge up to 37 hours of mesophilic aerobic digestion under laboratory conditions. The model strain *Enterococcus faecium* CCM 4231 survived almost twice as long as the above-mentioned isolates. Similar findings, regarding the viability of the microorganisms studied, were also determined during thermophilic aerobic digestion of municipal sewage sludges. The final reduction in the total count of bacteria was not directly dependent on the temperature during aerobic digestion. It may be supposed that *E. faecium* CCM 4231 strain as a bacteriocin-producing strain with a broad antimicrobial spectrum, inoculated into the sludges, could inhibit the growth of microorganisms in the sludges by the way of its bacteriocin activity. Studying the effect of aerobic digestion on the viability of helminth eggs, the observed negative effect of higher temperatures was more expressive in comparison with bacterial strains. During thermophilic digestion process all helminth eggs (*Ascaris suum*, *Toxocara canis*) were devitalized. All eggs of *T. canis* were killed in experiments under mesophilic temperature. However, 32% of nonembryonated *A. suum* eggs remained viable.

devitalization; bacterial and parasitic germs; sewage sludge; aerobic digestion

**ABSTRAKT:** Pri laboratórnych experimentoch s aeróbnou stabilizáciou tekutých komunálnych kalov sa zistilo, že prežívanie bakteriálnych inokulantov izolovaných z kalov (*Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., zástupcovia čeľade *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* sp., *E. coli*) bolo počas aeróbnej stabilizácie v mezofilnom teplotnom pásme zaznamenané do 37. hodiny. Prežívanie priamo inokulovaného modelového kmeňa *Enterococcus faecium* CCM 4231 bolo v porovnaní s vyššie uvedenými izolantmi takmer dvojnásobné. Podobné zistenia, ktoré sa týkajú prežívania sledovaných mikroorganizmov sme zaznamenali aj pri aeróbnej termofilnej stabilizácii tekutých komunálnych kalov. Dokázalo sa, že totálna redukcia celkových počtov sledovaných baktérií nie je priamo závislá ma teplote procesu aeróbnej stabilizácie. Domnievame sa, že modelový kmeň *E. faecium* CCM 4231, ktorý sme do kalov inokulovali, mohol produkciou bakteriocínu urýchliť devitalizáciu mikroorganizmov obligátne sa vyskytujúcich v kaloch. Pri sledovaní vplyvu aeróbnej stabilizácie na vitalitu vajčiek helmintov sa v porovnaní s bakteriálnymi kmeňmi výraznejšie prejavil negatívny účinok vyšších teplôt. V experimentoch v termofilnej teplotnej oblasti boli devitalizované všetky vajčeka modelových helmintov (*Ascaris suum*, *Toxocara canis*). V experimentoch v mezofilnom teplotnom pásme boli devitalizované všetky vajčeka *T. canis*, ale z neembryonovaných vajčiek *A. suum* po prebnehute stabilizácii bolo ešte 32 % vitálnych.

devitalizácia; bakteriálne a parazitárne zárodky; tekuté exkrementy; aeróbná stabilizácia

### INTRODUCTION

Sedimentation, mesophilic aerobic and anaerobic digestion of sludges are the main technological processes of wastewater treatment. They prove effective from the aspect of water management. However, from the hygiene-epidemiological point of view they are unable to

eliminate the biological pathogens and toxic materials present in municipal sewage (Persson, 1973; Hotař, 1974; Hays, 1977; Venglovský et al., 1990). The sewage sludges, including pathogenic microorganisms, represent a potential health hazard. One of the ways of pathogen reduction is a possibility to use technologies including biological, physical and chemi-

\* This study was partially supported by the Grant Agency for Science, grant No. 132/93.

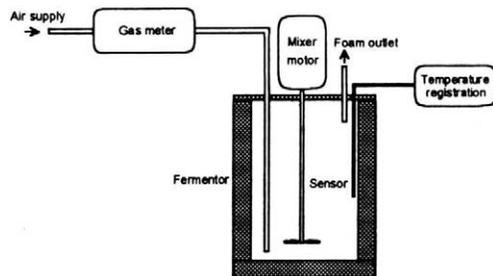
cal methods capable to destroy the pathogens. The aerobic digestion of sewage sludges (sludge composting) represents one of those methods.

The aim of our study was to assess the effect of aerobic digestion of raw sludges from municipal sewage treatment plants (STP) on the survival of the directly inoculated model strain *E. faecium* CCM 4231, the other obligate pathogenic bacteria in sludges, as well as of nonembryonated *A. suum* eggs and infective *T. canis* eggs.

## MATERIAL AND METHODS

### DIGESTION CONDITIONS

The aerobic digestion of raw sludges was performed in a laboratory digester (fermentor, volume of 5,000 ml) consisting of a metallic, heat-insulated, double-shell tank with a removable lid cover (Fig. 1). The sludges were continually stirred with a double-arm mixer at 2,770 r.p.m., pH and temperature were recorded by a Bioblock Scientific 93317 device. The air volume supplied into the digester from a pressure vessel, with the compressor-maintained overpressure of 0.2–0.35 MPa, was measured by a gas meter G 01 (Východočeské plynárny k.p. Skuteč, Czech Republic). The digester was operating in a discontinual-single charge mode. It was placed in a laboratory at 17–25 °C. The content of the digester – raw primary sludges were collected from the STP collection tanks following the primary sedimentation and they were used untreated. The sludge dry matter, organic matters and pH were assessed according to CSN 83 0550 standard Chemical and Physical Analysis of Sludges.



1. Laboratory aerobic fermentor

### MEDIA, MODEL STRAIN, EGGS OF MODEL NEMATODE, GROWTH CONDITIONS

The sludges were directly inoculated with 500 ml of *E. faecium* CCM 4231 strain ( $10^{10}$  cfu from a 24h culture in Todd – Hewitt Broth, Imuna, Šarišské Michaľany). The total count and viability of microor-

ganisms in municipal sludges were detected at the time intervals of 2, 24, 37, 48, 72, 74 and 120 hours. The samples were diluted in a saline buffer pH 7 (dilutions  $10^{-1}$ – $10^{-12}$ ). The selective media were inoculated with 0.1 ml of sample from each dilution and incubated at 37 °C for 24–48 h. The survival of the bacterial strain CCM 4231 was examined on Selective agar for faecal streptococci (Imuna) with the addition of 60 g sodium chloride and 10% defibrinated sheep blood per 1 l. *Escherichia coli* germs were detected on MacConkey agar (Imuna). To isolate enterobacteria, Simmons – citrate agar (Imuna) was used. *Pseudomonas* agar F was used to determine *Pseudomonas* sp. The colonies of *Salmonella* sp. were detected on Selenite agar (Imuna). To obtain *Streptococcus* sp. the same medium was used as for the cultivation of CCM 4231 strain; blood and sodium chloride excepting.

The raw primary sludges used in the experiments were subjected to an oviscopic examination. The low number of eggs (from 1 to 7 eggs per 1,000 ml of sludge) was increased by inoculation of the eggs of the model nematode *T. canis* and *A. suum* directly into the sludges. *T. canis* eggs were isolated from faeces of naturally infected pups and inoculated into the sludges after the 28th day of incubation at 26 °C to reach their infectivity. The nonembryonated eggs of *A. suum* were recovered from the distal uteri ends of adult females obtained from slaughtered pigs. The untreated sludge, stored at the ambient temperature of 18–21 °C, was used as control for the survival of microorganisms and model helminth eggs.

Two types of municipal sludges of different composition, obtained from mechanical biological sewage treatment plants, were used during the aerobic digestion process. The sewage sludges taken at STP Poprad were used in experiments No. 1 and 4; those from STP Košice in experiments No. 2 and 3. The sludges differed from each other in the amount of dry matter, organic substances and pH. The sludges in experiments No. 1, 2 and 3 were inoculated with the CCM 4231 strain and *T. canis* infective eggs. In experiments No. 3, 4 nonembryonated eggs of *A. suum* were also added. The model helminth eggs were isolated from the samples of stabilized sludges using a flotation-sedimentation method according to Romanenko (1968) with a saturated sucrose solution. The effect of aerobic digestion on *T. canis* eggs was tested in a biological experiment using mice SPF, strain ICR, aged 28 days. Three experimental groups were used, each of 6 mice. Larvae were isolated from the brain and muscles 28 days post infection using digestive method and their counts were evaluated by standard deviation ( $\pm$  SD). The viability of *A. suum* eggs was studied by their cultivation at 26 °C for 21 days until embryonation. The standard deviation of the development ability of eggs (*A. suum*, *T. canis*) in experimental or control groups was assessed in three parallel samples taken at the same time from the control (eggs were placed in un-aerated sludge) or the experimental group.

# I. Physico-chemical sludge analysis

Experiment	Temperature		pH		Dry matter (%) (n = 2)			Organic substances (%) (n = 2)		
	I	max.	I	O	I	O	% red.	I	O	% red.
1	13.5	52.5	5.1	9.4	4.3	3.7	14	-	-	-
2	15.2	38.3	6.8	7.9	3.6	3.1	13.9	62.6	58.2	7.1
3	15.2	36.9	6.7	8.5	3.2	2.5	21.9	70.1	66.4	5.3
4	16.8	58.5	5.6	9.1	5.1	1.3	74.5	83.9	77.9	7.2

Note: I – inlet; O – outlet; % red. – % reduction; max. – max. temperature achieved

Experiments No. 2 and 3 were conducted in the mesophilic range. Thermophilic aerobic digestion process was used in experiments 1 and 4 (Tab. I).

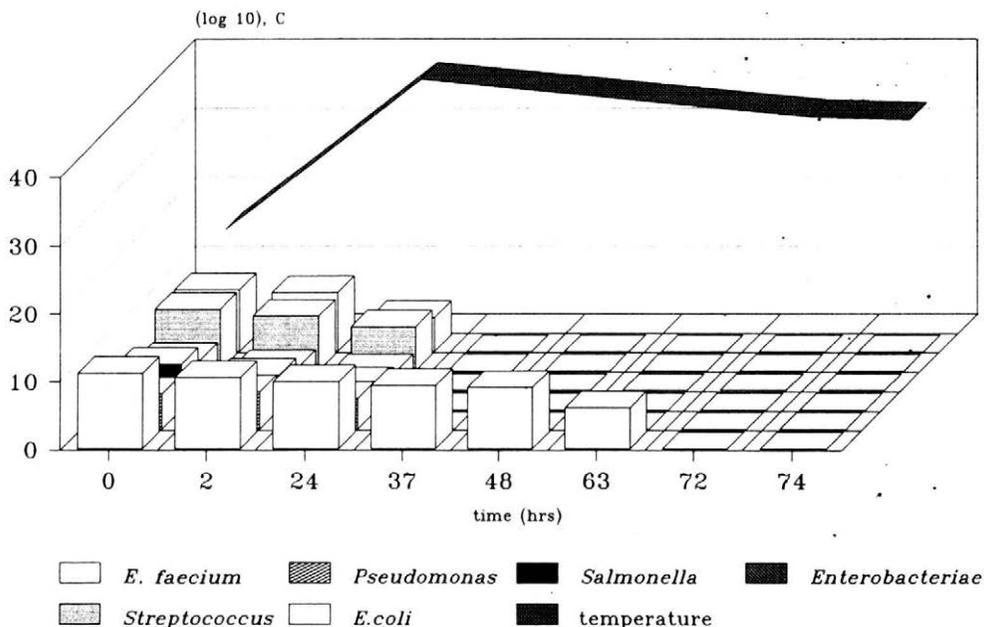
## RESULTS

36.9 °C and 38.3 °C are the maximum temperature values that were reached during the fermentation in experiments No. 2 and 3 (the sludge from STP Košice). Higher maximum temperatures were reached during the aerobic digestion (52.5 °C and 58.5 °C) in experiments No. 1 and 4 using the sludges from STP Poprad. The different intensity of the stabilization (digestion) process, manifested also by the values of temperature maximum in the individual experiments, could be a result of different composition and properties of the sludges applied (organic substances, sludge dry residues, chemical compounds, pH, etc.). Values of pH at the onset and

termination of the experiment varied, depending on the sludge used (pH 5.1–9.6). The increase in pH was lower than that in temperature. Stabilized sludges were shown as slightly alkaline at the end of the experiments.

The stabilized sludge dry residues (Tab. I) at the outlet varied in comparison with the values at the inlet depending on the intensity of the stabilization process (activation temperature increase) and on the time of the sludge retention in the digester. Maximum reduction was found in experiment No. 4 (74.5%), with the highest aerobic digestion temperature (58.5 °C). The dry matter in the other experiments was reduced from 13.9 to 21.9%.

The content of organic substances in sludges at the onset and at the end of aerobic digestion is presented in Tab. I. The raw primary sludges taken from STP Košice and Poprad yielded the following groups of potentially or strictly pathogenic bacteria: *Streptococcus* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp.



## 2. Viability of *E. faecium* CCM 4231 and bacteria isolated from raw sludge during aerobic mesophilic digestion

II. Infection ability of *T. canis* eggs – biological experiment

Experiment	Infective dose	Control		Post stabilization		
		No. of isolated larvae	% of infective eggs	No. of isolated larvae	% of infective eggs	% of devitalized eggs
1	100	65.7 ± 7.63	66	0	0	100
2	50	38.8 ± 4.38	78	3	6	94
3	100	63.0 ± 6.51	63	1	1	99

n = 6

Arithmetic mean ± standard deviation

In addition, other enterobacteria were also isolated including *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Klebsiella* sp., *Citrobacter intermedius*, *Proteus* sp.

The helminth eggs in the raw primary sludges were most often allotted to genera *Ascaris*, *Toxocara*, *Hymenolepis* and *Taenia*.

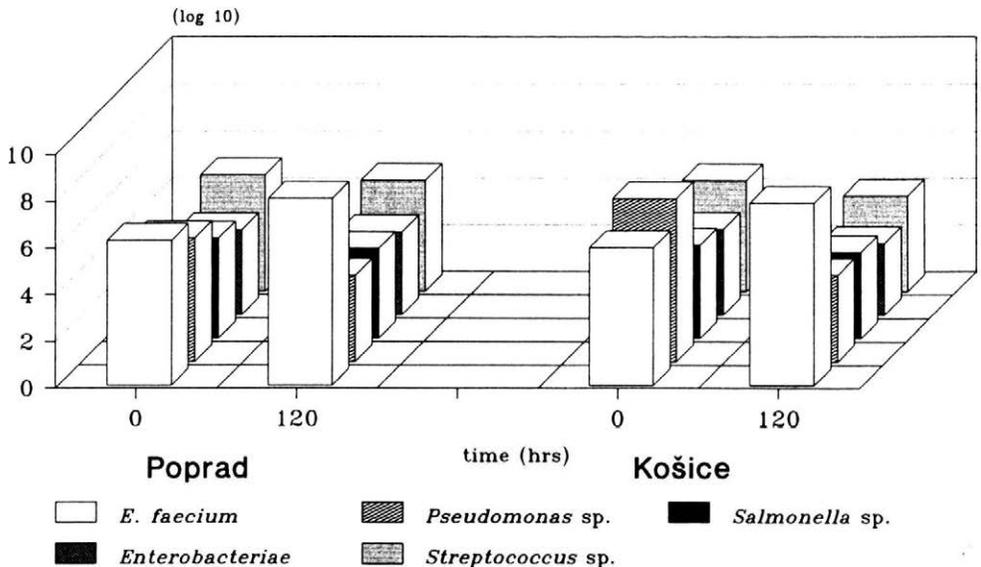
During the whole mesophilic aerobic digestion of municipal sludges (experiments No. 2 and 3 – Fig. 2) no considerably varied numbers of CCM 4231 strain were determined within 63 h. The complete elimination of CCM 4231 strain was detected only after 72 h. Other bacteria persisted during 37 h of mesophilic digestion. However, a decrease in total counts of bacteria was observed mainly after 24 h. In unacrated sludges (control), the counts of bacteria detected in the initial sampling remained similar after 120 h of exposure (Fig. 3).

During the thermophilic aerobic stabilization, the directly inoculated model strain CCM 4231 as well as other obligate pathogenic bacteria were reduced as early as after 24 h. The growth of CCM 4231 strain was fully inhibited after 72 h. The inhibition of other bacteria detected in sludges was found within 37 h of

thermophilic aerobic digestion (Fig. 4). All experiments conducted within the two temperatural ranges indicated the survival of *E. faecium* CCM 4231 strain for a longer time in comparison with other sludge bacteria studied.

Experiments No. 2 and 3, performed in the mesophilic range (Tabs. II and III), showed a significant destruction of most *Toxocara canis* eggs in comparison with the control. However, no complete devitalization of eggs was detected. It was found on the basis of biological experiments that 94% of *T. canis* eggs were killed in experiment No. 2 and 99% in experiment No. 3 (Tab. II). Experiments with helminthic pathogens proved higher tenacity of nonembryonated *A. suum* eggs, with 32% of them remaining vital following the aerobic digestion – experiment No. 3 (Tab. III). In the control group, 79% of eggs developed to the stage of embryonation (Tab. III).

Thermophilic aerobic digestion of sludges in experiments No. 1 and 4 killed all infective eggs of *T. canis* and nonembryonated eggs of *A. suum* (Tabs. II and III).



3. Viability of *E. faecium* CCM 4231 and bacteria isolated from raw sludge in control

### III. Developmental ability of *A. suum* nonembryonated eggs

Experiment	Control		Post stabilization		
	No. of vital eggs	% of vital eggs	No. of vital eggs	% of vital eggs	% of devitalized eggs
3	79.1 ± 2.8	79	32.3 ± 8.1	32	68
4	78.2 ± 3.4	78	0	0	100

$n = 6$

Arithmetic mean ± standard deviation

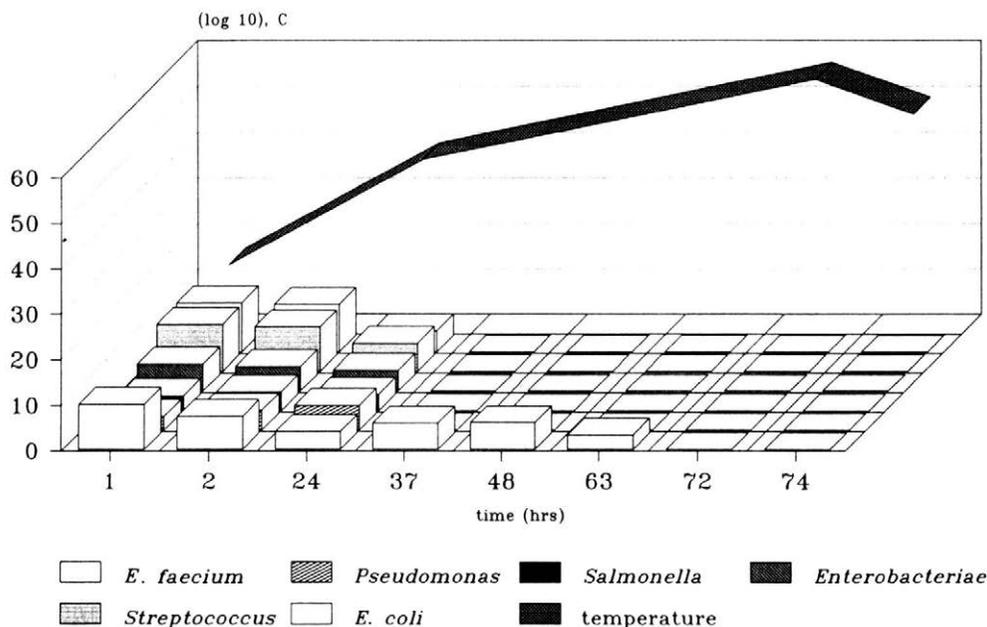
## DISCUSSION

The factors determining the negative effect on the viability of microbial and parasitic pathogens in various components of the environment include high temperatures, alkaline pH, the amount of free ammonia and oxygen (Enigk, 1979; Strauch et al., 1980; Plachý and Juriš, 1993; Lauková et al., 1993). Our experiment showed that the production of heat during the aerobic digestion of municipal sludges is determined by their composition, content of dry matter and carbon as well as nitrogen ratio in the dry matter. Under favourable conditions the temperature of activation processes may rise up to 70 °C. From the qualitative point of view, two different types of sludges were used. This was also reflected in the temperature of activation process. Using the sludges from STP Poprad, the temperature reached the thermophilic range. Only the mesophilic range of temperature was detected using the sludges from STP Košice. However, mesophilic temperatures proved sufficient to eliminate microorganisms as *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Escherichia*

*coli*, *Streptococcus* sp. and other enterobacteria. Their elimination was not dependent on the digestion process temperature so much as may be the case of more tenacious bacteria (sporulating bacteria, fungi, parasitic propagative stages). On the other hand, it is possible to anticipate certain dependence on the presence of oxygen in sludges. This result was found in un-aerated controls. After 120 h of exposure only a minimum decrease of bacteria was detected.

The presence of *E. faecium* CCM 4231, which is a bacteriocin substance producing strain with a broad antimicrobial spectrum, as well as aerobic digestion could probably expedite the destruction of the inoculants isolated from the municipal sludges. This presumption may be connected with the fact that CCM 4231 strain has survived both types of digestion for much longer than the other bacteria studied.

These results correspond with our previous findings of decimation periods for various pathogenic bacteria in aerated pig slurry (Juriš et al., 1993). The mesophilic aerobic digestion of pig liquid excrements (maximum 44.5 °C) resulted in a 90% elimination of *Salmo-*



4. Viability of *E. faecium* CCM 4231 and bacteria isolated from raw sludge during aerobic thermophilic digestion

nella typhimurium within 32 hours. The aerobic thermophilic fermentation destroyed 100% of *T. canis* and *A. suum* eggs. The effect of temperature, as the main destructive factor, as well as the changed pH, reduced significantly the infectivity of *T. canis* eggs in experiments No. 2 and 3 (6 and 1%, respectively). However, the viability of *A. suum* nonembryonated eggs was preserved for most of the experiment. This was the manifestation of the generally known higher tenacity of *A. suum* eggs in the environment.

Comparable results were also reported by Carrington et al. (1990). They studied the viability of *A. suum* eggs during thermophilic aerobic digestion of municipal sludges. The eggs were killed at 55 °C in 4 hours. Our results from the experiments with municipal sludge are comparable with those obtained from studies of pig slurry digestion. During the aerobic mesophilic digestion of pig slurry only 32% of nonembryonated eggs *A. suum* were devitalized (Juriš et al., 1993).

It can be concluded from the hygienic aspects that the common microflora of municipal sludges (bacteria tested in our study) is safely devitalized by the way of laboratory aerobic digestion. On the other hand, the mesophilic aerobic digestion has not proved reliable for devitalization of model parasitic pathogens. Therefore it is very important to obstruct the import of municipal sludges treated in this way to agricultural areas for fertilizing purposes. Parasitic model germs are present commonly in the municipal sludges and they also survive there long time. They can be the cause of atypical verminous pneumonia in grazing animals. In addition, they also affect the other symptoms characterized in the framework of the complex *larva migrans visceralis*.

## REFERENCES

- CARRINGTON, E. G. – PIKE, E. B. – AUTY, D. – MORRIS, R.: Destruction of faecal bacteria, enteroviruses and ova parasites in wastewater sludge by aerobic thermophilic and aerobic mesophilic digestion. In: IAWPRC Symp. on Health Related Water Microbiology, Tubingen, 1–6 April, 1990.
- ENIGK, K.: Resistenz der Dauerformen von endoparasiten der Haustiere. Berl. Münch. Tierarztl. Wschr., 92, 1979: 491–497.
- HAYS, B.: Potential for parasitic diseases transmission with land application of sewage plant effluents and sludges. Water. Res., 11, 1977: 583–595.
- HOTAŘ, Z.: Tekuté kompostování, nový způsob úpravy kejdy prasat. Vod. Hosp., 8, 1974: 212–217.
- JURIŠ, P. – PLACHÝ, P. – DUBINSKÝ, P. – VENGLOVSKÝ, J. – TÓTH, F.: The effect of laboratory aerobic stabilization of liquid excrements of pigs on vitality of *Salmonella typhimurium* and *Ascaris suum* germs. Vet. Med. – Czech, 38, 1993: 553–558.
- LAUKOVÁ, A. – MAREKOVÁ, M. – JAVORSKÝ, P.: Detection and antimicrobial spectrum of a bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* CCM 4231. Lett. Appl. Microbiol., 16, 1993: 257–260.
- PERSSON, L.: The destruction of parasites in liquid cattle manure by aeration using the Licom system. Zbl. Vet.–Med., R. B, 20, 1973: 289–303.
- PLACHÝ, P. – JURIŠ, P.: Hygienization of community waste water of the urban Košice area from the point of view of helminthology. Českoslov. Hyg., 38, 1993: 27–33.
- ROMANENKO, N. A.: Methods for the examination of soil and sediment of wastewater on helminth eggs. Med. Parazit. Parazit. Bol., 6, 1968: 723–729.
- STRAUCH, D. – BAADER, W. – TIETJEN, C.: Odpady zo živočíšnej výroby. Bratislava, Príroda 1980.
- VENGLOVSKÝ, J. – JURIŠ, P. – VARGOVÁ, M.: Hygienic aspects of pig feedlot waste management. In: Proc. Sem. Stuttgart – Hohenheim, 1990: 38–48.

Arrived on 21st November 1994

---

### Contact Address:

MVDr. Peter Juriš, CSc., Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovenská republika  
Tel. 095/314 11–13, fax 095/314 14

---

**Nejčerstvější informace o časopiseckých článcích  
poskytuje automatizovaný systém**

**Current Contents**

**na disketách**

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna odebírá časopis „**Current Contents**“ řadu „**Agriculture, Biology and Environmental Sciences**“ a řadu „**Life Sciences**“ na disketách. Řada „**Agriculture, Biology and Environmental Sciences**“ je od roku 1994 k dispozici i s abstrakty. Obě tyto řady vycházejí 52krát ročně a zahrnují všechny významné časopisy a pokračovací sborníky z uvedených oborů.

Uložení informací z **Current Contents** na disketách umožňuje nejrozmanitější referenční služby z prakticky nejčerstvějších literárních pramenů, neboť báze dat je **doplňována každý týden** a neprodleně expedována odběratelům. V systému si lze nejen prohlížet jednotlivá čísla **Current Contents**, ale po přesném nadefinování sledovaného profilu je možné adresně vyhledávat informace, tisknout je nebo kopírovat na disketu s možností dalšího zpracování na vlastním počítači. Systém umožňuje i tisk žádanek o separát apod. Kumulované vyhledávání v šesti číslech **Current Contents** najednou velice urychluje rešeršní práci.

**Přístup k informacím Current Contents je umožněn dvojím způsobem:**

- 1) **Zakázkový přístup** – po vyplnění příslušného zakázkového listu (objednávky) je vhodný především pro mimopražské zájemce.

Finanční podmínky: – použití PC – 15 Kč za každou započatou půlhodinu  
– odborná obsluha – 10 Kč za 10 minut práce  
– vytištění rešerše – 1 Kč za 1 stranu A4  
– žádanky o separát – 1 Kč za 1 kus  
– poštovné + režijní poplatek 15 %

- 2) **„Self-service“** – samoobslužná práce na osobním počítači v ÚZLK.

Finanční podmínky jsou obdobné. Vzhledem k tomu, že si uživatel zpracovává rešerši sám, je to maximálně úsporné. (Do kalkulace cen nezapočítáváme cenu programu a databáze **Current Contents**.)

V případě Vašeho zájmu o tyto služby se obraťte na adresu:

**Ústřední zemědělská a lesnická knihovna**

Dr. Bartošová

Slezská 7

120 56 Praha 2

Tel.: 02/25 75 41, l. 520, fax: 02/25 70 90

Na této adrese obdržíte bližší informace a získáte formuláře pro objednávku zakázkové služby. V případě „self-servisu“ je vhodné se předem telefonicky objednat. V případě zájmu je možné si objednat i průběžné sledování profilu (cena se podle složitosti zadání pohybuje čtvrtletně kolem 100 až 150 Kč).

# ÚSTŘEDNÍ ZEMĚDĚLSKÁ A LESNICKÁ KNIHOVNA, PRAHA 2, SLEZSKÁ 7

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna v Praze (dále jen ÚZLK), která je jednou z největších zemědělských knihoven na světě, byla založena v roce 1926. Již od počátku šlo o knihovnu veřejnou. Knihovna v současné době obsahuje více než jeden milion svazků knih, cestovních zpráv, dizertací, literatury FAO, svázaných ročníků časopisů z oblasti zemědělství, lesnictví, veterinární medicíny, ekologie a dalších oborů. V letošním roce knihovna odebrala 750 titulů domácích a zahraničních časopisů. Informační prameny získané do fondu jsou v ÚZLK zpracovávány do systému katalogů – je budován jmenný katalog a předmětový katalog jako základní katalogy knihovny a dále různé speciální katalogy a kartotéky. Počátkem roku 1994 přistoupila ÚZLK k automatizovanému zpracování knihovního fondu v systému CDS/ISIS.

Pro informaci uživatelů o nových informačních pramenech ve fondech ÚZLK zpracovává a vydává knihovna následující publikace: Přehled novinek ve fondu ÚZLK, Seznam časopisů objednaných ÚZLK, Přehled rešerší a tematických bibliografií z oboru zemědělství, lesnictví a potravinářství, AGROFIRM – zpravodaj o přírůstcích firemní literatury (je distribuován na disketách).

V oblasti mezinárodní výměny publikací knihovna spolupracuje s 1 200 partnery ze 60 zemí světa. Knihovna je členem IAALD – mezinárodní asociace zemědělských knihovníků. Od září 1991 je členem mezinárodní sítě zemědělských knihoven AGLINET a od 1. 1. 1994 je depositní knihovnou materiálů FAO pro Českou republiku.

Knihovna poskytuje svým uživatelům následující služby:

## Výpůjční služby

Výpůjční služby jsou poskytovány všem uživatelům po zaplacení ročního registračního poplatku. Mimopražští uživatelé mohou využít možnost meziknihovní výpůjční služby. Vzácné publikace a časopisy se však půjčují pouze prezenčně.

## Reprografické služby

Knihovna zabezpečuje pro své uživatele zhotovování kopií obsahů časopisů a následné kopie vybraných článků. Na počkání jsou zhotovovány kopie na přání uživatelů. Pro pražské a mimopražské uživatele jsou zabezpečovány tzv. individuální reproslužby.

## Služby z automatizovaného systému firemní literatury

Jsou poskytovány z databáze firemní literatury, která obsahuje téměř 13 000 záznamů 1 700 firem.

## Referenční služby

Knihovna poskytuje referenční služby vlastních databází knižních novinek, odebíraných časopisů, rešerší a tematických bibliografií, vědeckotechnických akcí, firemní literatury, videotéky, dále z databází převzatých – Celostátní evidence zahraničních časopisů, bibliografických databází CAB a Current Contents. Cílem je podat informace nejen o informačních pramenech ve fondech ÚZLK, ale i jiné informace zajímavé zemědělskou veřejnosti.

## Půjčování videokazet

V AGROVIDEU ÚZLK jsou k dispozici videokazety s tematikou zemědělství, ochrany životního prostředí a příbuzných oborů. Videokazety zasílá AGROVIDEU mimopražským zájemcům poštou.

Uživatelům knihovny slouží dvě studovny – všeobecná studovna a studovna časopisů. Obě studovny jsou vybaveny příručkovou literaturou. Čtenáři zde mají volný přístup k novinkám přírůstků knihovního fondu ÚZLK.

## Adresa knihovny:

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna  
Slezská 7  
120 56 Praha 2

## Výpůjční doba:

pondělí, úterý, čtvrtek:	9.00–16.30
středa	9.00–18.00
pátek	9.00–13.00

## Telefonické informace:

vedoucí:	25 23 92
referenční služby:	25 90 96, 25 75 41/linka 520
časopisy:	25 32 25
výpůjční služby:	25 75 41/linka 415
meziknihovní výpůjční služby:	25 75 41/linka 304
Fax:	25 70 90
E-mail:	IHOCH@uzpi.agric.cz

## POKYNY PRO AUTORY

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Literatura** musí odpovídat státní normě ČSN 01 0197. Citace se řadí abecedně podle jména prvních autorů. Odkazy na literaturu v textu uvádějí jméno autora a rok vydání. Do seznamu se zařadí jen práce citované v textu. Na práce v seznamu literatury musí být odkaz v textu.

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

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

## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# VETERINARY MEDICINE – CZECH

---

Volume 40, No. 5, May 1995

## CONTENTS

Marounek M., Skřivanová V., Šimůnek J.: The effect of virginiamycin on rumen fermentation <i>in vitro</i> after adaptation of inoculum donors.....	129
Literák I., Skřivánek M., Skalka B., Celer V. Jr.: Antibodies to some infections on large goat farms in the Czech Republic.....	133
Hejlíček K., Literák I., Lhoták M.: Prevalence of antibodies to <i>Toxoplasma gondii</i> in army dogs in the Czech Republic and Slovak Republic.....	137
Svobodová V., Svoboda M., Konvalinová J.: Comparison of a proof of <i>Giardia intestinalis</i> cysts with the presence of specific antibodies in dogs and cats.....	141
Sabo V., Boďa K., Chrappa V.: The effect of higher gravitation on embryonic development of birds	147
Urbanová E., Páčová Z.: Application of NEFERM-test to identification of psychrotrophic bacteria isolated from foods.....	151
Juriš P., Plachý P., Lauková A.: Devitalization of bacterial and parasitic germs in sewage sludge during aerobic digestion under laboratory conditions.....	157

# VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

---

Ročník 40, č. 5, Květen 1995

## OBSAH

Marounek M., Skřivanová V., Šimůnek J.: Účinek virginiamycinu na bacherovou fermentaci <i>in vitro</i> po adaptaci donoru inokula.....	129
Literák I., Skřivánek M., Skalka B., Celer V. Jr.: Protilátky proti některým infekcím ve velkochovech koz v České republice.....	133
Hejlíček K., Literák I., Lhoták M.: Prevalence protilátek proti <i>Toxoplasma gondii</i> u služebních armádních psů v České republice a ve Slovenské republice.....	137
Svobodová V., Svoboda M., Konvalinová J.: Srovnání průkazu cyst <i>Giardia intestinalis</i> s výskytem specifických protilátek u psů a koček.....	141
Sabo V., Boďa K., Chrappa V.: Vplyv zvýšenej gravitácie na embryonálny vývoj vtákov.....	147
Urbanová E., Páčová Z.: Uplatnění NEFERM-testu v identifikaci psychrotrofních bakterií izolovaných z potravin.....	151
Juriš P., Plachý P., Lauková A.: Devitalizácia bakteriálnych a parazitárnych zárodkov pri aeróbnej stabilizácii tekutých kalov v laboratórnych podmienkach.....	157

---

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