

ÚZPI

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

10

VOLUME 40 (LXVIII)

PRAHA

OCTOBER 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. ing. Jiří Brož, CSc., Reinfeld, Switzerland

RNDr. Milan Fránek, CSc., Veterinary Research Institute, 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

M. V. Nermut, MD., PhD., Prof. emeritus, National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom

Prof. MUDr. Leopold Pospíšil, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

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

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

Editor-in-Chief – Vedoucí redaktorka

Ing. Zdeňka Radošová

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

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

Časopis je citován v bibliografickém časopise Current Contents – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, a abstrakty z časopisu jsou zahrnuty v těchto databázích: Agri, 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, e-mail: braun@uzpi.agrec.cz. Den doručení rukopisu do redakce je uváděn jako datum přijetí k publikaci.

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

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

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

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

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

Acceptance of manuscripts: Two copies of manuscript should be addressed to: Ing. Zdeňka Radošová, editor-in-chief, Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/25 75 41–9, fax: 02/25 70 90, e-mail: braun@uzpi.agrec.cz. 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).

LEPTOSPIROSIS IN SLAUGHTER CATTLE – SEROLOGIC AND BACTERIOLOGIC EXAMINATIONS

LEPTOSPIRÓZA JATEČNÉHO SKOTU – SÉROLOGICKÉ A BAKTERIOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

F. Treml, E. Nesňalová

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

ABSTRACT: Antibodies to leptospiras were demonstrated in 91 cases (7.4%) out of 1,239 animals examined by serological assays of blood sera of cattle slaughtered in slaughter-houses and coming from 21 farms of one district. The antibodies were detected in animals coming from eleven out of the farms investigated (52.4%). The most frequent reactions were proved with leptospiras of the serovar *L. grippityphosa* (61.8%) and with leptospiras of the serological group Sejroe (18.9%), rarely with leptospiras of the serovar *L. icterohaemorrhagiae* or *copenhageni* (5.7%). Antibodies to leptospiras of other serovars (*L. canicola*, *L. bulgarica* and *L. hardjo*) were demonstrated only as coagglutinations with the above-mentioned leptospira serovars. We failed to demonstrate leptospiras in the animals examined by culture examinations as well as by bacterioscopy. The results of examinations have shown that the cattle on Czech farms is also exposed to infections by various serovars of leptospiras. The infections are not accompanied by manifest clinical symptoms in many cases nor do they cause significant elimination of leptospiras in urine in the serologically positive animals. On the Czech cattle farms the occurrence of antibodies to leptospiras of the serovar *L. grippityphosa* is prevailing; this serovar seems not to be expressly pathogenic to cattle and does not cause the formation of anthroprurgic foci. Reduction in the occurrence of antibodies to leptospiras of this type is possible to achieve by preventing the contact with natural foci of this type. Hence the prognosis of epizootologic situation in bovine leptospirosis in the conditions of this country is relatively favorable. But special attention should be paid to animals bought and imported from foreign countries. These animals could be a source of some highly pathogenic serovars of leptospiras to cattle.

cattle; leptospirosis; antibodies; bacteriological examination

ABSTRAKT: Sérologickým vyšetřením krevních sér skotu poráženého na jatkách a pocházejícího z 21 zemědělských závodů jednoho okresu byly protilátky proti leptospírám prokázány u 91 případech (7,4 %) z 1 239 vyšetřených zvířat. Protilátky byly zjištěny u zvířat pocházejících z 11 vyšetřovaných zemědělských závodů (52,4 %). Nejčastější reakce byly prokazovány s leptospírami sérovaru *L. grippityphosa* (61,3 %) a leptospírami sérologické skupiny Sejroe (18,9 %), zřídka s leptospírami sérovaru *L. icterohaemorrhagiae* resp. *copenhageni* (5,7 %). Protilátky proti leptospírám ostatních sérovarů (*L. canicola*, *L. bulgarica* a *L. hardjo*) byly prokazovány pouze jako koaglutinace s výše uvedenými sérovary leptospír. Kultivačním vyšetřením ani bakterioskopii moče se nepodařilo u vyšetřovaných zvířat prokázat leptospiry. Výsledky vyšetření prokázaly, že skot i v našich chovech je vystaven infekcím různými sérovary leptospír. Infekce probíhají často bez zjevných klinických příznaků a často nevedou u sérologicky pozitivních zvířat k významnému vylučování leptospír močí. V našich chovech skotu převažuje výskyt protilátek proti leptospírám sérovaru *L. grippityphosa*, který jak se zdá není pro skot výrazně patogenní a nevyvolává vznik antropourgických ohnisek. Ke snížení výskytu protilátek proti leptospírám tohoto typu může dojít především zamezením kontaktu s přírodními ohnisky tohoto typu. Prognóza epizootologické situace v leptospiróze skotu je tedy v našich podmínkách poměrně příznivá. Mimořádnou pozornost je ale třeba věnovat zvířatům nakupovaným a dováženým ze zahraničí. Tato zvířata by mohla být zdrojem některých vysoce patogenních sérovarů leptospír pro skot.

skot; leptospiróza; protilátky; bakteriologické vyšetření

ÚVOD

Leptospiróza skotu je závažně infekční onemocnění značně rozšířené v různých zemích světa.

U dospělých zvířat probíhá leptospirózní infekce často inaparentně nebo v subklinické formě a onemocnění pak charakterizuje pouze nález specifických pro-

tilátek v krevním séru. Při různých sérologických vyšetřeních bylo prokázáno, že onemocnění skotu mohou způsobovat leptospiry až 14 sérovarů (Haláša aj., 1969; Michna, 1970; Dragomir, 1974; Sosova a Čerevatěnko, 1976 a další). Avšak podle Faiana (1982) jsou především leptospiry sérovarů *L. pomona* a *L. hardjo* příčinou výrazných epizootií

s těžkým postižením zdravotního stavu zvířat. Tak např. ve Velké Británii, kde je boviní leptospiróza vyvolaná sérovarem *L. hardjo* endemicky rozšířená, jsou ztráty u skotu a ovcí značně vysoké. Mnoho farmářů udává v průměru finanční ztráty kolem 10 000 liber, ale někde je to i více. Záleží to především na velikosti stáda a prevalenci onemocnění (Bennett, 1991).

Z dřívějších sérologických depistáží je zřejmé, že i v našich chovech se setkáváme se zvířaty infikovanými leptospirami různých sérovarů (Šebek aj., 1979; Trem l aj., 1984, 1985). Z měsíčních hlášení a z výkazů o nákazách zvířat však vyplývá, že v našich chovech nejsou zaznamenávány žádné větší epizootie leptospirózního onemocnění u skotu.

O tom jak probíhá leptospirózní infekce u skotu v našich podmínkách, jsme se chtěli přesvědčit komplexním sledováním jatečných zvířat pocházejících z různých chovů jednoho okresu.

MATERIÁL A METODY

Vzorky k vyšetření byly získávány v průběhu tří let (1986 až 1989) z jatečného skotu poráženého na jatkách ve S. Vyšetřeno bylo 1 239 krevních sér skotu, pocházejícího z 21 zemědělských závodů okresu. Jednalo se o chovy zdravé, bez klinických příznaků leptospirózy i jiných infekčních onemocnění.

Jatečná zvířata byla vyšetřována sérologicky (krev) a kultivačně (ledviny). Tato vyšetření byla doplněna bakterioskopickým vyšetřením moče, pokud se jí podařilo získat z porážených zvířat.

Sérologické vyšetření bylo prováděno standardní metodou za použití reakce mikroaglutinace – lýze s 13 kmeny leptospir následujících sérovarů:

1. *L. grippotyphosa* – P 125; 2. *L. icterohaemorrhagiae* – Fryšava; 3. *L. sejroe* – M 84; 4. *L. canicola* – C 7; 5. *L. bratislava* – Jež Bratislava; 6. *L. pomona* – Šimon; 7. *L. arborea* – M 7; 8. *L. bataviae* – Moldava; 9. *L.*

I. Výsledky sérologického vyšetření jatečného skotu na přítomnost protilátek proti leptospirám v zemědělských závodech jednoho okresu – The results of serological examination of slaughter cattle for the presence of antibodies to leptospira on farms of one district

Zemědělský závod ¹	n	Pozitivní ²	%	Sérovary leptospir ³					
				samostatné reakce ⁴			smíšené reakce ⁵		
				G	Ic	Se	G/Ca	G/Bu	Se/Ha
1. Bě.	10	3	30,0	1	0	1	–	–	1
2. Bl.	8	0	0	–	–	–	–	–	–
3. Čj.	19	2	10,5	1	0	0	1	0	0
4. Čs.	18	3	16,6	2	0	0	0	1	0
5. Dr.	10	1	10,0	1	0	0	–	–	–
6. Dž.	16	1	6,2	1	0	0	–	–	–
7. Ho.	9	0	0	–	–	–	–	–	–
8. Ka.	10	0	0	–	–	–	–	–	–
9. La	437	19	4,3	16	0	0	1	2	0
10. Mi.	12	1	8,3	1	0	0	–	–	–
11. My.	10	0	0	–	–	–	–	–	–
12. Ne.	20	3	15,0	0	0	2	0	0	1
13. No.	6	0	0	–	–	–	–	–	–
14. Pa.	38	3	7,8	2	0	1	–	–	–
15. Pd.	21	1	4,8	1	0	0	–	–	–
16. Pi.	7	0	0	–	–	–	–	–	–
17. Př.	1	0	0	–	–	–	–	–	–
18. Ra.	491	49	9,9	26	6	10	0	5	2
19. Se.	20	3	15,0	3	0	0	–	–	–
20. S.H.	14	2	14,2	0	0	1	0	0	1
21. Zá.	12	0	0	–	–	–	–	–	–
	1 239	91	7,4	55	6	15	2	8	5

G = *L. grippotyphosa*

Ic = *L. icterohaemorrhagiae*

Se = *L. sejroe*

G/Ca = *L. grippotyphosa/L. canicola*

G/Bu = *L. grippotyphosa/L. bulgarica*

Se/Ha = *L. sejroe/L. hardjo*

¹farm, ²positive, ³leptospira serovars, ⁴autonomous reactions, ⁵mixed reactions

bulgarica – Nikolaevo; 10. *L. sorex jalna* – *Sorex Jalna*; 11. *L. pyrogenes* – *Salinem*; 12. *L. tarassovi* – *S 42*; 13. *L. hardjo* – *Hardjoprajtino*;

Séra zvířat reagující v základním ředění 1 : 100 byla vyšetřována do titru se všemi pozitivně reagujícími sérovary, popřípadě i s dalšími sérovary téže sérologické skupiny. Kultivace byla prováděna sterilním odběrem tkáně ledvin do Korthofovy tekuté půdy. Naočkované půdy byly pravidelně kontrolovány mikroskopicky a udržovány po dobu 21 dnů.

Moč získaná z poražených zvířat byla centrifugována a mikroskopicky byl vyšetřován sediment na přítomnost leptospir.

VÝSLEDKY

Protilátky proti leptospirám různých sérovarů byly prokázány u zvířat z 11 (52,4 %) zemědělských závodů (tab. I). Celkem byly protilátky zjištěny v 91 případech, tj. 7,4 %. Výskyt protilátek se pohyboval od 4,3 % (*La.*) do 30,0 % (*Bě.*). Samostatně signifikantní titry byly prokazovány s leptospirami sérovarů *L. grippotyphosa*, *L. icterohaemorrhagiae* a *L. sejroe* v 76 (6,1 %) případech. V 15 (1,3 %) případech byly zjišťovány reakce dvou sérovarů leptospir.

Nejčastěji byly prokazovány protilátky proti leptospirám sérovaru *L. grippotyphosa*, a to v 65 případech (61,3 %) a leptospirám sérovaru *L. sejroe* v 20 případech (18,9 %). Výskyt protilátek proti leptospirám sérovaru *L. bulgarica* a *L. canicola* byl prokazován pouze jako koaglutinace při současně vyšších titrech s *L. grippotyphosa*. Obdobně i výskyt protilátek proti leptospirám sérovaru *L. hardjo* byl zjišťován pouze jako

koaglutinace při současně vyšších titrech s leptospirami sérovaru *L. sejroe*. Reakce s uvedenými sérovary leptospir byl prokazovány pouze v nízkých titrech (100 a 200) – tab. II. Z tabulky je dále patrná i výše titru jednotlivých sérovarů leptospir zjišťovaná při sérologickém vyšetření, která se pohybovala v rozmezí 100 až 12 800. Nejvyšší procento reagujících zvířat bylo zjištěno v rozmezí titru 100 až 400 (62,8 %). V titru 800 a výše, který se podle metodik považuje za pozitivní, reagovalo 37,2 % sér. V nejvyšším ředění séra (titr 12 800) byly reakce zjišťovány pouze ojediněle, a to ve dvou případech (1,9 %) s leptospirami sérovaru *L. grippotyphosa*.

Protilátky proti leptospirám byly prokazovány u všech vyšetřovaných kategorií skotu kromě telat (tab. III). Zde je třeba vzít v úvahu, že telata byla vyšetřována pouze v malém počtu (čtyři zvířata). Nejvyšší promoření vykazovaly krávy, a to 10,1 %, dále pak býci 6,9 % a jalovice 4,1 %. Kultivačním vyšetřením ledvin, ani bakterioskopickým vyšetřením moče z poražených zvířat se nepodařilo prokázat leptospiry.

DISKUSE

Sérologickým vyšetřením 1 239 kusů jatečného skotu byly prokázány protilátky proti leptospirám různých sérovarů v 7,4 % případů. Nejčastěji byly prokazovány protilátky proti leptospirám sérovaru *L. grippotyphosa*, a to v 61,3 %. Méně často proti leptospirám sérovaru *L. sejroe* (18,9 %) a leptospirám sérovaru *L. icterohaemorrhagiae*, resp. *copenhageni* (5,7 %). Jatečný skot s výskytem protilátek se vyskytoval v 11 z 21 vyšetřovaných zemědělských závodů okresu, tj. 52,4 %, při-

II. Výskyt sérovarů a výška titrů zjišťované při sérologickém vyšetření jatečného skotu – The occurrence of serovars and titer levels determined at serological examinations of slaughter cattle

Sérovar leptospir ¹	Počet reakcí ²	Titry ³							
		100	200	400	800	1 600	3 200	6 400	12 800
<i>L. grippotyphosa</i>	65	20	6	10	13	7	5	2	2
%	61,3	30,7	9,3	15,3	20,0	10,7	7,8	3,1	3,1
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	6	4	1	0	1	0	0	0	0
%	5,7	66,6	16,7	0	16,7	0	0	0	0
<i>L. sejroe</i>	20	5	1	4	6	2	2	0	0
%	18,9	25,0	5,0	20,0	30,0	10,0	10,0	0	0
<i>L. hardjo</i>	5	3	1	1	0	0	0	0	0
%	4,7	60,0	20,0	20,0	0	0	0	0	0
<i>L. bulgarica</i>	8	6	2	0	0	0	0	0	0
%	7,5	75,0	25,0	0	0	0	0	0	0
<i>L. canicola</i>	2	2	0	0	0	0	0	0	0
%	1,9	100	0	0	0	0	0	0	0
	106	40	11	15	20	9	7	2	2
	100,0	37,8	10,3	14,2	18,8	8,5	6,6	1,9	1,9

¹leptospira serovar, ²number of reactions, ³titers

Kategorie skotu ¹	Počet vyšetřených ⁶								
	sérologicky ⁷			kultivací ledvin ⁸			mikroskopicky v moči ⁹		
	<i>n</i>	pozitivní ¹⁰	%	<i>n</i>	pozitivní	%	<i>n</i>	pozitivní	%
Telata ²	4	0	0	4	0	0	–	–	–
Jalovice ³	444	18	4,1	410	0	0	260	0	0
Krávy ⁴	584	59	10,1	505	0	0	315	0	0
Býci ⁵	203	14	6,9	165	0	0	83	0	0
	1 239	91	7,4	1 084	0	0	658	0	0

¹cattle category, ²calves, ³heifers, ⁴cows, ⁵bulls, ⁶number of animals examined, ⁷serologically, ⁸by kidney tissue cultivation, ⁹microscopically in urine, ¹⁰positive

čemž protilátky proti leptospirám sérovaru *L. grippityphosa* dominovaly v těchto vyšetřeních. Sérologické reakce však nebyly provázeny klinickými příznaky.

Dosažené výsledky sérologického vyšetření odpovídají výsledkům, které byly na území ČR publikovány již dříve. Tak např. Kadlíček aj. (1969), Pokorný a Starošík, (1971), Šebek aj. (1979), Tremel aj. (1984) při sérologickém vyšetření skotu opakovaně prokazovali výskyt protilátek proti leptospirám uvedených sérovarů; nejčastěji bývají postižovány starší věkové kategorie zvířat. Z předchozích literárních údajů, ale i z našich výsledků je zcela zřejmé, že na území ČR u skotu převažuje výskyt protilátek hlavně proti leptospirám sérovaru *L. grippityphosa*. Obdobné výsledky publikují Mauer mann (1987), Brem a Schreyser (1988) u jatečného skotu v Německu. V jejich vyšetřeních také převažují protilátky proti leptospirám sérovaru *L. grippityphosa* a leptospirám sérologické skupiny *Sejroe*, zatímco infekce s leptospirami sérovaru *L. icterohaemorrhagiae*, resp. *copenhageni* se vyskytují zřídka. Naproti tomu Halaša (1977) ve Slovenské republice u skotu prokazoval nejčastěji reakce s leptospirami sérovaru *L. sejroe*. K obdobným výsledkům jsme dospěli i my při vyšetřování krevních sér skotu ze Slovenské republiky (Pospíšil aj., 1993). Z toho je patrné, že mohou existovat ve výskytu protilátek proti leptospirám rozdíly i na poměrně malém území.

Podle sdělení autorů Šebek a Rosický (1974) leptospiry uvedených sérovarů vytvářejí v našich podmínkách ohniska přírodního či synantropního typu. Zdrojem infekce pro hospodářská zvířata pak mohou být především hlavní nebo potenciální rezervoárová zvířata (myšovití hlodavci) uvedených sérovarů leptospir, častěji však jimi kontaminované prostředí, voda, popř. zelená píče pocházející z těchto ohnisek. V důsledku rozdílných technologií chovu je to právě skot, který se může častěji infikovat přímým kontaktem, především na pastvinách nebo ve výbězích, popřípadě kontaminovanou zelenou píčí ve stájích. Přežívání a vylučování leptospir těchto typů u skotu je však pouze krátkodobé a nevede ke vzniku antropourgických ohnisek závažných na tyto chovy. V případě probíhajících epizootií v chovech by byla séropozitivita u vyšetřovaných zvířat pravděpodobně podstatně vyšší, což

jsme v našich šetřeních neprokázali. Naše výsledky též potvrzují již dříve popisované skutečnosti, že středoevropské murinní kmeny *L. grippityphosa* jsou pro hospodářská zvířata méně patogenní, než původně izolované asijské varianty, jak na to upozornili po experimentálních infekcích Fennestad (1963) a Šebek aj. (1980).

V žádném případě námi nebyl potvrzen výskyt protilátek proti leptospirám sérovaru *L. pomona*. Výskyt protilátek proti leptospirám sérovaru *L. hardjo* v našich šetřeních je třeba z hlediska diagnostického chápat pouze jako koaglutinace s příbuznými antigeny leptospir sérologické skupiny *Sejroe*. Toto je velice důležité zjištění především proto, že tyto dva sérovary, které jsou uváděny řadou autorů jako vysoce patogenní pro skot, se v námi sledovaných chovech nevyskytují. To svědčí celkově o příznivé situaci jak z hlediska epizootologického, tak i epidemiologického.

Výsledky sérologických vyšetření potvrzují i další šetření, kdy kultivačně ani bakterioskopii moče se nepodařilo leptospiry prokázat. Negativní výsledky vyšetření ledvin a moče tedy podporují naše předpoklady, že kmeny leptospir sérovaru *L. grippityphosa*, nejčastěji se vyskytující se na našem území, nejsou pro hospodářská zvířata příliš patogenní. Při kontaktu s nimi pravděpodobně dochází pouze k vyvolání krátkodobé imunologické reakce bez následného nosičství nebo vylučování leptospir. K podobným závěrům dospěl i Šebek (1972) při sérologickém a bakteriologickém vyšetřování vzorků ze skotu na Českomoravské vrchovině. Naopak dochází-li k infekci vysoce patogenními typy leptospir (*L. hardjo*, *L. pomona*), bývají tyto i často izolovány z ledvin (Ellis aj., 1986; Grégoire aj., 1987; Miller aj., 1991).

Stejně tak leptospirurie je jedním ze závažných průvodních jevů leptospirózního onemocnění. Vylučování leptospir močí skotu není pravidelné a patrné k němu dochází pouze při infekci některými sérovary leptospir. Leptospiry v moči sérologicky pozitivních i sérologicky negativních zvířat prokazovali mnozí autoři (Witting aj., 1965; Sosov a Čerevatěnko, 1976 a další). Kmeny, které byly od zvířat izolovány, byly převážně určeny jako sérovary *L. pomona* a *L. hardjo*. I tyto skutečnosti poukazují na důležitou úlohu vyšet-

řování moče v diagnostice leptospirózy. Tímto vyšetřením lze zjistit vylučovatele a nosiče leptospir i při bezsymptomním průběhu infekce.

LITERATURA

- BENNETT, R. M.: A survey of dairy farmers' decisions concerning the control of leptospirosis. *Vet. Rec.*, 129, 1991: 118.
- BREM, S. – SCHREYSER, K.: Untersuchungen an Rindseren aus Bayern über des Auftreten von Leptospirenantikörperen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 101, 1988: 416–419.
- DRAGOMIR, A. V.: Izučeniye epizootologičeskoj i epidemiologičeskoj struktury leptospiroza. *Veterinarija*, 1974. 49.
- ELLIS, W. A. – O'BRIEN, J. J. – NEILL, S. D. – BRYSON, D. G.: Bovine leptospirosis: experimental serovar hardjo infection. *Vet. Microbiol.*, 11, 1986: 293–299.
- FAINE, S.: Guidelines for the control of Leptospirosis. Geneva, WHO 1982. 169.
- FENNESTAD, K. L.: Experimental Leptospirosis in Calves. Copenhagen, Munkagaarg 1963: 146.
- GRÉGOIRE, N. – HIGGINS, R. – ROBINSON, Y.: Isolation of leptospire from nephritic kidneys of beef cattle at slougher. *Amer. J. Vet. Res.*, 48, 1987: 370–371.
- HALAŠA, M.: Leptospiroza hovädzieho dobytku v podmienkach Slovenskej socialistickej republiky. *Veterinárstvi*, 27, 1977: 109–111.
- HALAŠA, M. – PLEŠKO, I. – HRÚZIK, J.: Leptospirozy zvierat a ľudí. Bratislava, 1969. 169.
- KADLČÍK, K. – KRAMÁŘ, R. – POLEDNÍKOVÁ, I. – TONDL, F. – VYCHODIL, J.: K výskytu původců některých antropozoonů u drobných savců a domácích zvířat. *Českoslov. Epidem. Mikrobiol. Imunol.*, 18, 1969: 199–204.
- MAUERMANN, U.: Epidemiologische Untersuchungen zur Verbreitung der Leptospireninfektion des Rindes im Regierungsbezirk Giessen. [Dissertation.] Giessen, 1987. 179.
- MICHNA, S. W.: Leptospirosis. *Vet. Rec.*, 86, 1970: 484–496.
- MILLER, D. A. – WILSON, M. A. – BERAN, G. W.: Survey to estimate prevalence of leptospira interrogans infection in nature cattle in the United States. *Amer. J. Vet. Res.*, 52, 1991: 1761–1765.
- POKORNÝ, B. – STAROŠTÍK, L.: Zkušenosti s makroaglutinační reakcí v sérologické diagnostice leptospiroz hospodářských zvířat. *Veter. Med. (Praha)*, 16, 1971: 295–302.
- POSPÍŠIL, Z. – TREML, F. – LITERÁK, I. – ČÍHAL, P. – POSPÍŠIL, L.: Ochrana životního prostředí ve VVP před původci zoonóz a vybranými infekcemi hospodářských zvířat. [Závěrečná zpráva.] Brno, Veterinární a farmaceutická univerzita 1993. 36.
- SOSOV, R. F. – ČEREVATĚNKO, L. N.: O bezsymptomnom leptospiroze krupnogo rogatogo skota. In: Tezisy dokladov VI. Všeosojuz. Nauč. Konf. po leptospirozu. Moskva, 1976: 182–183.
- ŠEBEK, Z.: Leptospiroza skotu na Českomoravské vysočině. *Vlastivěd. Sbor. Vysoč. (Jihlava)*, odd. Věd Přír., 7, 1972: 147–156.
- ŠEBEK, Z. – ROSICKÝ, B.: K rozšíření, charakteristice a struktuře ohnisek leptospirozy v ČSSR. *Českoslov. Epidem. Mikrobiol. Imunol.*, 23, 1974: 10–21.
- ŠEBEK, Z. – ROSICKÝ, B. – TREML, F.: Snížení proměnitelnosti leptospirozou u skotu a prasat v důsledku velkokapacitní technologie chovu. In: Sbor. Ref. Hygienická problematika zemědělství. Chlum u Třeboně, 1979: 171–180.
- ŠEBEK, Z. – TREML, F. – BOUDA, J. – VALOVÁ, M.: Experimentální infekce skotu virulentním středoevropským kmenem *Leptospira grippotyphosa*. In: Zoonoses congress with International participation. Štrbské Pleso, 1980.
- TREML, F. – ŠEBEK, Z. – HEJLÍČEK, K.: Výsledky komplexního vyšetření na leptospirozu různých věkových kategorií skotu. *Veterinárstvi*, 34, 1984: 170–172.
- TREML, F. – HEJLÍČEK, K. – ŠEBEK, Z.: Výskyt protilátek proti leptospirám u nutně porážených zvířat ve srovnání s jatečnými nálezy. *Veterinárstvi*, 35, 1985: 82–84.
- WITING, W. – HORSCH, F. – ZIMMERHACKEL, W. – HASSE, H.: Leptospira pomona Infection bei Jungindern. *Mh. Veter.-Med.*, 20, 1965: 685–691.

Došlo 12. 1. 1995

Kontaktní adresa:

Doc. MVDr. František Tr e m l, CSc., Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1–3, 612 42 Brno, Česká republika
Tel. 05/41 32 11 07, 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

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

THE EFFECT OF *LACTOBACILLUS SALIVARIUS* ADMINISTRATION ON COLIFORMS AND ENTEROCOCCI IN THE CROP AND CAECA OF CHICKEN BROILERS

VLIV APLIKACE *LACTOBACILLUS SALIVARIUS* NA KOLIFORMNÍ BAKTERIE A ENTEROKOKY VE VOLETI A SLEPÝCH STŘEVECH KUŘECÍCH BROJLERŮ*

V. Rada, I. Rychlý

Czech University of Agriculture, Praha, Czech Republic

ABSTRACT: A rifampicin-resistant *Lactobacillus salivarius* 51R was isolated from chicken caeca and administered orally to newly hatched broiler chickens. The resistance to rifampicin enabled us to differentiate the administered organism from indigenous strains. First day after inoculation, *L. salivarius* 51R dominated among lactobacilli in the crop and caeca of inoculated chickens and its counts were slightly over $7 \log$ c.f.u. per 1 g of digesta even after 10 days. *L. salivarius* significantly ($P < 0.01$) lowered counts of enterococci and coliforms in the crop during the whole experimental period (10 days). Effects of *L. salivarius* administration on caecal counts other than lactobacilli were generally small. The influence of *Lactobacillus* strain used to species composition of enterococci and coliforms were also observed. 105 strains of enterococci and 96 strains of coliforms isolated from the crop and caeca of both control and experimental groups were characterized using identification sets and computer program. Regarding, enterococci, 63% was identified to the species level, 31% to the genus level, and 6% was not identified. Regarding coliforms, 48% was reported to the species level, 25% to the genus level, and 26% was not identified. The most prevalent species among the enterococci was *E. faecalis* and among the coliforms *E. coli*. 24 h after the administration of *L. salivarius* 51R there was significantly higher ($P < 0.05$) occurrence of *E. faecalis* (57% out of all enterococcal isolates) in experimental group than those in the control group (31% out of all enterococcal isolates). The perspectives in the control of pathogens in young chickens via probiotics was discussed.

chicken; lactobacilli; enterococci; coliforms; identification

ABSTRAKT: *Lactobacillus salivarius* 51R rezistentní vůči rifampicinu, původně izolovaný ze slepých střev kuřat, byl podán per os jednodenním kuřatům. Rezistence vůči antibiotiku umožnila zpětnou detekci kmene v trávicím ústrojí po aplikaci. *L. salivarius* 51R dominoval mezi laktobacily jak ve voleti, tak ve slepých střevech jeden den po podání a ještě po 10 dnech dosahoval počtů vyšších než 10^7 v 1 g tráveniny. Kuřata ošetřená tímto kmenem měla ve voleti signifikantně nižší ($P < 0,01$) počty enterokoků a koliformních bakterií v porovnání s kontrolní skupinou po celou dobu experimentu (10 dní). Ve slepých střevech byl vliv *L. salivarius* 51R na jiné skupiny bakterií než laktobacily obecně malý. Dále byl sledován vliv aplikace *L. salivarius* 51R na druhové složení enterokoků a koliformních bakterií. Z volat a slepých střev obou skupin bylo izolováno a pomocí identifikačních setů a počítačového programu charakterizováno celkem 105 kmenů enterokoků a 96 kmenů koliformních bakterií. Z izolovaných enterokoků bylo 63 % identifikováno na úroveň druhu, 31 % na úroveň rodu a 6 % nebylo identifikováno. Z koliformních bakterií bylo 48 % určeno na úroveň druhu, 25 % na úroveň rodu a 26 % nebylo identifikováno. Mezi enterokoky převažoval *E. faecalis* a mezi koliformními bakteriemi *E. coli*. *E. faecalis* měl signifikantně větší podíl ve střevě kuřat pokusné skupiny (57 % z celkového počtu izolovaných enterokoků) než skupiny kontrolní (31 % z celkového počtu izolovaných enterokoků) 24 hodin po ošetření. V práci jsou diskutovány možnosti praktického využití *L. salivarius* 51R jako probiotika.

kuře; laktobacily; enterokoky; koliformní bakterie; identifikace

ÚVOD

Laktobacily hrají důležitou roli v regulaci střevní mikroflóry drůbeže (Sarra aj., 1992). Jejich počty

jsou nejvyšší ve voleti a slepých střevech, kde se blíží hodnotám 10^9 živých buněk v 1 g tráveniny (Smith, 1965). Do trávicího ústrojí pronikají tyto mikroorganismy po prvním požití potravy (Barnes aj., 1972;

* Práce byla sponzorována grantem č. 508/93/0317 Grantové agentury České republiky.

Mead a Adams, 1975). Avšak jednodenní kuřata přicházející z lhní, která dosud nepřišla do styku s krmivem, bývají často bohatě kolonizována koliformními bakteriemi a enterokoky. Tyto mikroorganismy bývají nejčastější příčinou úhyňů na nespecifické bakteriémie v období od 2. do 10. dne života kuřat (Leitner a Heller, 1992).

Cílem naší práce bylo ověřit možnost kolonizace trávicího ústrojí jednodenních kuřat kmenem *L. salivarius*. Tento bakteriální druh převažuje nad počty dalších mikroorganismů ve voleti kura domácího (Dutta a Devriese, 1981; Sarra aj., 1992). Dále jsme sledovali počty a druhové složení koliformních bakterií a enterokoků ve voleti a slepých střevech.

MATERIÁL A METODY

MIKROORGANISMUS

Lactobacillus salivarius 51R byl izolován ze slepých střev kuřat. Kultura byla vybrána ze souboru 60 kmenů na základě dobrých růstových vlastností testovaných metodou podle Fullera (1973) ve zvlhčené krmné směsi ($\mu = 1,54$). Kmen byl rezistentní vůči rifampicinu, čehož bylo využito ke zpětné detekci ve střevech po podání *per os*. Stabilita tohoto znaku byla testována podle autorů Pedersen a Tannock (1989). Kultura byla identifikována pomocí sady API 50 CHL (bioMérieux, Francie) jako *L. salivarius* a označena 51R.

Před aplikací byla kultura inkubována v MRS bujónu (De Man aj., 1960) 24 hodin při teplotě 37 °C, odstředěna a resuspendována ve fyziologickém roztoku.

POKUSNÁ ZVÍŘATA

Ze souboru 45 kusů jednodenních kuřat (Ross) byly utvořeny dvě skupiny (pokusná a kontrolní) po 20 kusích. Zbýlých pět jedinců bylo mikrobiologicky vyšetřeno ještě před počátkem experimentu. Zvířata byla krmena směsí BR I (kukuřičný šrot 40 %, pšeničný šrot 24,5 %, sójový extrahovaný šrot 25 %, rybí moučka 3,1 %, masokostní moučka 2,2 %, kvasnice 1 %, krmný vápenec 1,2 %, dicalciumfosfát 1,6 %, krmná sůl 0,1 %, aminovitan BR I 1,3 %). Krmivo neobsahovalo žádná antibiotika ani kociodiostatika.

Každé kuře pokusné skupiny dostalo ihned po ustájení 0,2 ml suspenze (asi $1 \cdot 10^8$ živých buněk) *L. salivarius* 51R ve fyziologickém roztoku.

MIKROBIOLOGICKÉ ROZBORY

Z pokusné a kontrolní skupiny bylo první a 10. den po aplikaci (první a druhý rozbor) usmrceno po pěti kuřatech. Obsahy volat a slepých střev byly individu-

álně vyšetřeny na celkový počet laktobacilů (CPL) s použitím Rogosa agaru a celkový počet rifampicin-rezistentních laktobacilů (CPLR) pomocí stejného prostředí s přidavkem rifampicinu (100 mg/l). Dále jsme stanovili počty koliformních mikroorganismů (na Endo agaru) a enterokoků (na Slanetz a Bartley agaru). Všechna použitá média byla od firmy Oxoid. Laktobacily byly kultivovány anaerobně v CO₂/H₂ atmosféře (Anaerobic Plus System HP 11, Oxoid), enterokoky a koliformní bakterie byly inkubovány aerobně. Kulti-vační doba byla 24 hodin pro koliformní bakterie a 48 hodin pro ostatní skupiny mikroorganismů, vše při teplotě 37 °C. Pět kuřat bylo stejným způsobem mikrobiologicky vyšetřeno ještě před rozdělením do skupin (nultý rozbor). Výsledky byly statisticky zpracovány a rozdíly mezi skupinami byly posuzovány Studentovým *t*-testem.

Z misek s Endo agarem z nultého a prvního rozboru bylo ze všech vzorků poměrným způsobem izolováno celkem 96 kmenů. Izoláty byly suspendovány v 5 ml fyziologického roztoku a bezprostředně identifikovány pomocí ENTEROtestu I a II (Lachema a.s., Brno). Enterokoky izolované ze Slanetz a Bartley agaru stejným způsobem byly subkultivovány v GTK bujónu (Imuna). Pouze grampozitivní, katalázonegativní kultury schopné růst v 6,5% NaCl (w/v) a 40% (v/v) žluči (testováno podle autorů Devriese aj., 1991) byly následně testovány pomocí STREPTOtestu (Lachema a.s., Brno). Jako doplňkové testy jsme provedli růst v GTK bujónu při teplotě 10 a 45 °C. Celkem bylo charakterizováno 105 kmenů enterokoků. Konečná identifikace obou skupin mikroorganismů byla provedena pomocí TNW systému (Česká sbírka mikroorganismů, Brno). Rozdíly mezi skupinami byly posuzovány χ^2 -testem

VÝSLEDKY

Výsledky mikrobiologických rozborů jsou uvedeny v tab. I. *L. salivarius* 51R dominoval jak ve voletí, tak i ve slepých střevech kuřat pokusné skupiny 24 hodin po podání, neboť CPL a CPLR ve střevě pokusných kuřat byly prakticky totožné, zatímco rifampicin-rezistentní laktobacily nebyly u kontrolní skupiny vůbec detekovány. Vysoké CPLR (více jak 10^7 živých buněk v 1 g tráveniny) byly v pokusné skupině nalezeny ještě 10 dní po aplikaci. Počty enterokoků a koliformních bakterií byly ve voleti kuřat pokusné skupiny statisticky významně nižší ($P < 0,01$) oproti kontrolní skupině jak první, tak 10. den po aplikaci. Mikroflóra slepých střev nebyla podáním *L. salivarius* 51R ovlivněna.

Pomocí identifikačních testů bylo charakterizováno celkem 105 kmenů enterokoků (tab. II.) a 96 kmenů koliformních bakterií (tab. III.). Výsledky jsou uvedeny odděleně pro vole a slepá střeva. Mezi enterokoky měl největší podíl *E. faecalis* a mezi koliformními bakteriemi *E. coli*. Z celkového počtu enterokoků (ve voletí i slepých střevech dohromady) jeden den po aplikaci

I. Počet bakterií v trávicím ústrojí kuřat po inokulaci *L. salivarius* 51R – The numbers of bacteria in the alimentary tract of chickens after inoculation *L. salivarius* 51R

	Dny ¹	Vole ²		Slepá střeva ³	
		K	P	K	P
CPL	0	1,51 ± 1,41	1,51 ± 1,41	0,46 ± 1,03	0,46 ± 1,03
	1	8,37 ± 0,37	8,24 ± 0,45	8,29 ± 1,09	8,79 ± 0,23
	10	8,26 ± 0,27	8,99 ± 0,12**	8,55 ± 0,42	9,25 ± 0,12*
CPLR	0	0	0	0	0
	1	0	8,20 ± 0,34**	0	8,79 ± 0,24**
	10	0	7,15 ± 0,45**	0	7,01 ± 0,28**
EC	0	5,22 ± 1,09	5,22 ± 1,09	9,17 ± 1,02	9,17 ± 1,02
	1	7,23 ± 0,35	4,65 ± 0,34**	9,74 ± 0,15	9,76 ± 0,31
	10	5,57 ± 1,05	3,22 ± 0,38**	7,44 ± 0,35	7,61 ± 0,31
ENT	0	5,64 ± 0,81	5,64 ± 0,81	7,68 ± 1,71	7,68 ± 1,71
	1	7,14 ± 0,54	5,56 ± 0,28**	9,38 ± 0,37	9,56 ± 0,28
	10	4,36 ± 0,70	2,80 ± 0,17**	6,77 ± 0,57	5,90 ± 0,35

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

průměr ± SD – mean ± SD (\log_{10} cfu/g chymus)

K – kontrolní skupina – control group

P – pokusná (inokulovaná) skupina – test (inoculated) group

CPL – celkový počet laktobacilů – total counts of lactobacilli

CPLR – celkový počet laktobacilů rezistentních k rifampicinu – total counts of rifampicin-resistant lactobacilli

EC – koliformní bakterie – coliforms

ENT – enterokoky – enterococci

¹days, ²crop, ³caeca

II. Procentový podíl enterokoků ve voleti a slepých střevěch jednodenních kuřat (0 hodin po aplikaci) a kuřat dvoudenních (24 hodin po aplikaci) ošetřených kulturou *L. salivarius* 51R (pokus) a bez aplikace (kontrola) – Percentage occurrence of enterococci in the crop and caeca of 1-day-old chickens (0 h after the administration) and 2-day-old chickens (24 h after the administration) treated with *L. salivarius* 51R (experimental group) or without the treatment (control group)

Druh (rod) ¹	Doba po aplikaci (h) ²					
	0		24			
	vole ³	slepá střeva ⁴	vole		slepá střeva	
kontrola ⁵			pokus ⁶	kontrola	pokus	
<i>E. faecalis</i>	94	83	56	83	11	29
<i>E. durans</i>	–	–	–	–	5	–
<i>E. malodoratus</i>	–	–	6	–	–	–
<i>E. raffinosus</i>	–	–	–	–	–	6
<i>E. solitarius</i>	–	–	–	–	5	–
<i>Enterococcus</i> sp.	6	17	32	17	53	59
<i>Streptococcus</i> sp.	–	–	–	–	5	–
Neidentifikováno ⁷	–	–	6	–	21	6
Celkem ⁸	100	100	100	100	100	100
Počet kmenů ⁹	17	18	16	19	18	17

¹species (genus), ²time after the administration (h), ³crop, ⁴caeca, ⁵control group, ⁶experimental group, ⁷not identified, ⁸total, ⁹number of strains

tvořily u pokusných kuřat *E. faecalis* 57 %, *E. raffinosus* 3 % a *Enterococcus* sp. 37 % (3 % nebyly identifikovány) a u kontrolních kuřat *E. faecalis* 31 %, *E. durans* 3 %, *E. malodoratus* 3 %, *E. solitarius* 3 % a *Enterococcus* sp. 43 % (3 % byly *Streptococcus* sp., 14 % nebylo identifikováno. Vyšší podíl *E. faecium* na

celkovém počtu enterokoků v pokusné skupině byl statisticky významný ($P < 0,01$). Z celkového počtu koliformních bakterií u pokusné skupiny ve stejnou dobu tvořila *E. coli* 52 %, *Escherichia* sp. 9 %, *Enterobacter cloacae* 3 % a *Proteus mirabilis* 6 % (30 % neidentifikováno) a u kontrolních kuřat *E. coli* 23 %, *Escherichia*

III. Procentový podíl koliformních bakterií ve voleti a slepých střevě jednodenních kuřat (0 hodin po aplikaci) a kuřat dvoudenních (24 hodin po aplikaci) ošetřených kulturou *L. salivarius* 51R (pokus) a bez aplikace (kontrola) – Percentage occurrence of coliforms in the crop and caeca of 1-day-old chickens (0 h after the administration) and 2-day-old chickens (24 h after the administration) treated with *L. salivarius* 51R (experimental group) or without the treatment (control group)

Druh (rod) ¹	Doba po aplikaci (h) ²					
	0		24			
	vole ³	slepá střeva ⁴	vole		slepá střeva	
kontrola ⁶			pokus ⁵	kontrola	pokus	
<i>E. coli</i>	29	33	24	47	21	56
<i>Escherichia</i> sp.	15	39	29	7	43	11
<i>Citrobacter koseri</i>	14	17	–	–	–	–
<i>Enterobacter cloacae</i>	21	–	–	6	7	–
<i>Enterobacter</i> sp.	–	–	6	–	–	–
<i>Proteus mirabilis</i>	–	–	–	–	–	11
Neidentifikováno ⁷	21	11	41	40	29	22
Celkem ⁸	100	100	100	100	100	100
Počet kmenů ⁹	14	18	17	15	14	18

¹species (genus), ²time after the administration (h), ³crop, ⁴caeca, ⁵control group, ⁶experimental group, ⁷not identified, ⁸total, ⁹number of strains

sp. 35 %, *Enterobacter cloacae* 3 % a *Enterobacter* sp. 3 % (35 % neidentifikováno). Pomocí ENTEROTestu I a II ve spojení s numerickým identifikačním programem TNW se podařilo určit 48 % izolátů na úroveň druhu, 25 % na úroveň rodu a 26% nebylo identifikováno. Pomocí STREPTOTestu bylo stejným způsobem určeno 63 % kmenů na úroveň druhu, 31 % na úroveň rodu a 6 % nebylo identifikováno.

DISKUSE

Laktobacily jsou nejčastější účinnou složkou probiotik pro monogastry (Fuller, 1992). *L. salivarius* 51R prokázal dobré schopnosti kolonizovat trávicí ústrojí jednodenních kuřat. Rezistence vůči rifampicinu se ukázala jako vhodná pro zpětnou detekci perorálně aplikované kultury. Uvedená vlastnost je chromozomálně kódována (Salvat aj., 1992) a je tudíž stabilním znakem. U kontrolních zvířat se podle našich zkušeností CPLR pohybují obvykle na velmi nízké úrovni (méně než 10^2 v 1 g tráveniny), zpravidla jsou však zjišťovány nulové hodnoty. Rozhodující vlastností pro přežití *L. salivarius* 51R ve střevě byla zřejmě schopnost rychle se množit ve zvlhčené krmné směsi a zřejmě i v trávicím ústrojí kuřat.

L. salivarius 51R rovněž prokazatelně inhiboval enterokoky a koliformní bakterie ve voleti. Enterokoky a streptokoky mohou působit závažná onemocnění zvláště u mladé drůbeže (Devriese aj., 1994). Rovněž kolibacilózy jsou nejčastější u kuřat ve věku 2–10 dnů (Leitner a Heller, 1992). Kmen 51R by mohl proto působit jako prevence proti těmto chorobám. Zdá se, že nejvhodnější doba aplikace by byla již v lhní, neboť jednodenní kuřata, použitá v tomto pokusu, byla již bohatě osídlena bakteriemi rodů *Escherichia* a *Enterococcus*.

Numerický identifikační program TNW patří v České republice k nepoužívanějším systémům podobného druhu. Urbanová a Páčová (1994) použily tento program k identifikaci gramnegativních fermentujících bakterií izolovaných ze syrového kravského mléka. Pomocí ENTEROTestu I a II se jim podařilo určit alespoň na úroveň rodu 96,25 % kmenů. Úspěšnost stejné metody identifikace v této studii byla tedy poněkud nižší (73 %). Lepších výsledků bylo dosaženo v identifikaci enterokoků, kde na úroveň rodu se podařilo identifikovat 94 % izolátů. Mezi enterokoky byl nejčastěji nalezen *E. faecalis*, ostatní druhy byly identifikovány pouze ojediněle, což souhlasí s údaji, které publikoval Devriese aj. (1991). Pokusná skupina vykazovala první den po aplikaci statisticky významně vyšší vyšší podíl *E. faecalis* a oproti kontrolní skupině měla rovněž menší druhové složení enterokoků. Je tedy možné, že *L. salivarius* 51R brzdil osídlování trávicího ústrojí novými druhy enterokoků.

LITERATURA

- BARNES, E. M. – MEAD, G. C. – BARNUM, D. A.: The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. Brit. Poult. Sci., 13, 1972: 617–622.
- DE MAN, J. C. – ROGOSA, M. – SHARPE, M. E.: A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bact., 23, 1960: 130–135.
- DEVRIESE, L. A. – DE HERDT, P. – UYTTEBROEK, E. – LEPOUDRE, C. – DUCATELLE, R. – DOM, P. – HAESEBROUCK, F.: Streptococcen enterococcen-infecties bij vogels. Vlaams Diergeneesk. Tijdschr., 63, 1994: 109–111.
- DEVRIESE, L. A. – HOMMEZ, J. – WIJFELS, R. – HAESEBROUCK, F.: Composition of the enterococcal and strep-

- tococcal intestinal flora of poultry. J. Appl. Bact., 71, 1991: 46–50.
- DUTTA, G. N. – DEVRIESE, L. A.: Sensitivity and resistance to growth promoting agents in avine Lactobacilli. J. Appl. Bact., 51, 1981: 283–288.
- FULLER, R.: Ecological studies on the lactobacillus flora associated with the crop epithelium of the fowl. J. Appl. Bact., 36, 1973: 131–139.
- FULLER, R. (ed.): Probiotics – the Scientific Basis. London, Chapman & Hall 1992. 398 s.
- LEITNER, G. – HELLER, E.D.: Colonization of *Escherichia coli* in young turkeys and chickens. Avian Diseases, 36, 1992: 211–220.
- MEAD, G. C. – ADAMS, B. W.: Some observations on the caecal microflora of the chick during the first two weeks of life. Brit. Poult. Sci., 16, 1975: 169–176.
- PEDERSEN, G. – TANNOCK, G.W.: Colonization of the porcine gastrointestinal tract by lactobacilli. Appl. Environ. Microbiol., 55, 1989: 279–283.
- SALVAT, G. – LALANDE, F. – HUMBERT, F. – LAHEL-LEC, C.: Use of a competitive exclusion product (Broilact) to prevent Salmonella colonization of newly hatched chicks. Int. J. Food Micr., 15, 1992: 307–311.
- SARRA, P. G. – MORELLI, L. – BOTTAZZI, V.: The lactic microflora of fowl. In: WOOD, B. J. B. (ed.): The lactic acid bacteria: Volume 1 - The lactic acid bacteria in health and disease. Elsevier science publishers LTD, Cambridge, University Press 1992: 3–19.
- SMITH, H. W.: The development of the flora of the alimentary tract in young animals. J. Path. Bact., 90, 495–513.
- URBANOVÁ, E. – PÁČOVÁ, Z.: Počítačové numerické identifikační systémy v diagnostice bakterií izolovaných z živočišných surovin. Vet. Med. – Czech, 39, 1994: 197–203.

Došlo 29. 5. 1995

Kontaktní adresa:

Ing. Vojtěch R a d a, C.Sc., Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 126, 165 21 Praha 6-Suchdol, Česká republika
Tel. 02/338 27 61, fax 02/34 44 18

INZERCE

Nabízím morčata, albíny i barevná, obou pohlaví a o různé hmotnosti.

Veterinární dozor mám.

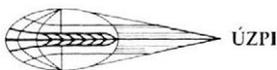
Ceny dohodou.

LABOZ

Vladmír Rašín

503 15 Nechanice 181

Tel. 049/93 14 80



ÚZPI

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

(Slezská 7, 120 56 Praha 2, fax: 25 70 90)

vydává v roce 1995 v edici **STUDIJNÍ INFORMACE** tyto publikace:

Řada **ROSTLINNÁ VÝROBA**

Ekonomika pěstování hlavních plodin podle ekologických zásad (*Komberec S.*)
Synantropní zavíječi – významní škůdci v zemědělství a potravinářství (*Šifner F.*)
Vliv agrotechniky na obsah dusičnanů v zelenině (*Prugar J. – Hadačová V.*)
Nové poznatky o pěstování sadbových brambor (*Břečka J. – Vokál B.*)
Formulace pesticidů – přehled a trendy (*Okrouhlá M.*)

Řada **ŽIVOČIŠNÁ VÝROBA**

Kulhavost skotu (*Schneiderová P.*)
Chov pštrosů jako nové odvětví drůbežnictví (*Snížek J.*)
Krmivářské suroviny (*Splítek M.*)
Výkrm skotu do nižší hmotnosti (*Krása A.*)
Problematika odchovu telat (*Motyčka J.*)

Řada **ZEMĚDĚLSKÁ TECHNIKA A STAVBY**

Optimální stájové a chovné prostředí pro skot (*Doležal O.*)
Hodnocení staveb z hlediska OŽP v EU a v České republice (*Konopásek V.*)
Technologie přípravy paliva z biomasy (*Sladký V. a kol.*)

CHARACTERISTICS OF ENTEROCOCCI AND STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM THE CROP AND CAECUM OF JAPANESE QUAILS EXPOSED TO MICROGRAVITY CONDITIONS

CHARAKTERISTIKA ENTEROKOKOV A STAFYLOKOKOV – IZOLÁTOV Z HRVOĽA A ZO SLEPÉHO ČREVA JAPONSKÝCH PREPELÍC VYSTAVENÝCH GRAVITAČNÝM PODMIENKAM

A. Lauková¹, M. Marounek², K. Boďa³

¹ Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic

² Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of Czech Republic, Praha-Uhřetěves, Czech Republic

³ Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic

ABSTRACT: Ten selected strains of enterococci and staphylococci were isolated from the crop and caecum of Japanese quails exposed to microgravity conditions. Isolates were allotted to the species *Enterococcus gallinarum*, *Ent. avium*, *Ent. faecium*, *Staphylococcus gallinarum* and *Staph. aureus*. Isolated strains were facultatively anaerobic, non-motile, Gram-positive cocci, occurring in pairs, short chains or irregular clusters. Isolates utilized most of the soluble sugars tested and produced bacteriocin-like substances. Enterococci and staphylococci were resistant to monensin (50 mg/l) and sensitive to tylosin and virginiamycin (10 mg/l).

microgravity; crop; caecum; Japanese quail; enterococci; staphylococci; additives; metabolic properties; bacteriocin

ABSTRAKT: Desať vybraných kmeňov enterokokov a stafylokokov – izolátov z hrvoľa a zo slepého čreva Japonských prepelíc, ktoré boli vystavené podmienkam gravitácie, bolo testovaných s cieľom ich fenotypickej determinácie ako aj s cieľom sledovať ich metabolické vlastnosti (ureáza, produkcia kyselín, produkcia bakteriocínov) a rezistenciu či citlivosť na antimikrobiálne aditíva. Izolované kmene predstavujú fakultatívne anaeróbné, nepohyblivé, Gram-pozitívne koky, ktoré boli na základe výsledkov fenotypických testov zaradené ku druhom: *Enterococcus faecium*, *Ent. avium*, *Ent. faecium*, *Staphylococcus gallinarum* a *Staph. aureus*. Bakteriocín – like substancie produkujúce enterokoky a stafylokoky prejavili rezistenciu na ionphor monensin (50 mg/L) a citlivosť na aditívum tylozín a virginiamycin (10 mg/L).

mikrogravitácia; hrvoľ; slepé črevo; Japonská prepelica; enterokoky; stafylokoky; bakteriocín; aditíva; metabolické vlastnosti

INTRODUCTION

The long-term stay of the man in space depends on the development of an automatic biological ecosystem with enormous stability. This ecosystem will be based on associations of autotrophic organisms (Boďa, 1992). Japanese quail seems to be a suitable heterotrophic organism for this purpose, thanks to its adaptability, small size and short generation time. Previous research on Japanese quail included investigation of endocrine functions, embryonic development and productivity (Hutcherson et al., 1980; Boďa et al., 1991). Regarding the microbiological aspect, in our previous study the total counts of the bacterial groups detected in the crop and caecum of Japanese quail exposed to microgravity conditions were reported

(Lauková et al., 1991). There were enterococci and staphylococci presented as the largest groups of the microorganisms selected (\log_{10} 3.7 ± 0.25 and 4.0 ± 0.13 cfu/ml). In 1989, Mead found in chicken 10^{10} cells of enterococci per 1 g of faecal content. Devriese et al. (1991) identified the species *Enterococcus faecium* and *Ent. faecalis* as the dominant bacteria in the crop and caecum of chicken. Other important species of enterococci detected in the digestive tract of poultry include *Ent. avium* and *Ent. gallinarum*. As far as we know, staphylococcal species associated with the alimentary tract of poultry especially of quail have not been reported in the literature. Only preliminary identification of some staphylococcal isolates from Japanese quail was reported in our previous study (Lauková et al., 1993).

Therefore, the aim of this paper was to present physiological and biochemical characteristics of enterococci and staphylococci isolated from quail's crop and caecum as well as by this way to obtain detailed information about these species especially those exposed to microgravity conditions. Moreover, the knowledge presented could also be used in the comparative microbiological studies.

MATERIAL AND METHODS

Four Japanese quail (3 females and 1 male), 15 days old initially, were used. The quails were fed a concentrate paste consisting of fish meal (5%), dried yeast (2.5%), dried skimmed milk (1%), soybean meal (40%), grain (47.3%), salt (0.2%), feed limestone (1.5%), mineral feed additive MKP2 (1.5%) and additive of biofactors (1%). Quails spent 7 days on board of the orbital station „Mir“ under microgravity conditions. The birds were killed after flight and samples of crop and caecal contents removed. Samples were mixed with 50% glycerol (v/v) diluted in phosphate buffer and kept on dry ice until processed in the laboratory.

Bacterial strains. Samples of crop and caecal contents were serially diluted and aerobically cultured on Mannitol Salt Agar (Oxoid) for staphylococci and Faecal Streptococcal Detecting Agar (Imuna Šarišské Michafany, Slovakia) enriched with 5% of defibrinated sheep blood for enterococci at 37 °C. Colonies were purified and representative strains were identified as described by Schleifer (1984) and Devriese et al. (1993) using commercial Staphy- and Strepto-tests (Lachema Brno, Czech Republic). Coagulase activity in staphylococci was also determined according to the commercial Sevatest Staphylo PK (Imuna Šarišské Michafany, Slovakia).

In total, 60 strains were examined: 40 from the caecum and 20 from the crop. Six caecal isolates and four isolates from the crop – representatives of the individual species detected were chosen for further study. Isolates were cultivated in Nutrient Broth and Agar No. 2 (Imuna Šarišské Michafany, Slovakia) and Todd-Hewitt Agar and Broth (Oxoid).

Biochemical and Physiological tests. The ability to ferment various sugars was also tested in the vitamin-mineral medium of Hayashi and Kozaki (1980) supplemented with 0.1% yeast extract (without fermentation tests included in commercial kits). Substrates were added at 4 g/l. The growth was assessed as visible turbidity at 24 h. Slightly visible growth was confirmed by measurements of optical density. Fermentation of eight sugars in staphylococci and seven sugars in enterococci was examined by this way.

The catalase test was performed according to MacFaddin (1976). Haemolysis was screened on VL Agar (Imuna Šarišské Michafany, Slovakia) with 10% of defibrinated sheep blood. Urease activity was measured according to Cook (1976) and expressed in nkat/ml.

Production of bacteriocin-like substances was detected according to Skalka et al. (1983). Indicator organisms are listed in Tab. I. *Staphylococcus aureus* CB 44 from the Culture Collection of Veterinary University (Brno, Czech Republic) and *Ent. faecium* AL6 (own isolate) were used as positive control.

I. Indicator organisms used for detection of bacteriocins in enterococcal and staphylococcal isolates

Strain	Origin
<i>Staphylococcus aureus</i> LS1	caecum of Japanese quail ¹
<i>Staphylococcus</i> sp. LS4	caecum of Japanese quail ¹
<i>Staphylococcus</i> sp. S3	crop of Japanese quail ¹
<i>Staphylococcus warneri</i> SW34	rumen of lamb ¹
<i>Enterococcus</i> sp. EHR1	crop of Japanese quail ¹
<i>Enterococcus gallinarum</i> EG13	crop of Japanese quail ¹
<i>Enterococcus faecalis</i> ED4	rumen of sheep ¹
<i>Enterococcus faecalis</i> JH81	clinical isolate ²
<i>Streptococcus bovis</i> 603	rumen of calf ³
<i>Escherichia coli</i> EC1	rumen of deer ¹

¹this laboratory, ²University of Modena, ³Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice

Metabolism of glucose. Fermentation of glucose was followed in the medium of Hayashi and Kozaki (1980), supplemented with 0.1% yeast extract. Glucose was added at 4 g/l. Cultures were incubated overnight at 37 °C. Glucose (detected by glucose oxidase-peroxidase method) was completely utilized in all strains. Lactate and ethanol were determined in microdiffusion chambers (Conway, 1957), succinate by an enzymatic method (Clark and Porteous, 1964) and formate colorimetrically (Sleat and Mah, 1984). Acetate was determined by gas liquid chromatography (Ottenstein and Bartley, 1971).

Sensitivity to antimicrobial feed additives. Sensitivity to ten antimicrobial feed additives was tested. Cyadox (quinoxaline derivative), nitrovin, bacitracin and tylosin were obtained from Pharmaceutical Works (Prague, Czech Republic). Monensin was supplied by Elanco (Indianapolis, USA), salinomycin by Hoechst (Frankfurt, Germany), virginiamycin by Smith Kline and French (Genwal, Belgium), lasalocid by Hoffman La Roche (Basel, Switzerland) and avoparcin by Cyanamid of Great Britain (Gosport). Nourseothricin was obtained in the Institute of Microbiology and Experimental Therapeutics (Jena, Germany). Avoparcin was dissolved in water, cyadox and nitrovin in dimethyl sulphoxide and other antimicrobials in ethanol. Solutions were sterilized by filtration and added to sterile media to obtain concentrations of 10 and 50 mg/l. A control contained an equivalent amount of solvent. Cultures were incubated at 37 °C for 24 h. The growth was assessed as visible turbidity.

	Strain					
	Crop isolates			Caecal isolates		
Fermentation of						
Sorbitol	-	-	-	+	+	w
Melezitose	-	-	-	+	v	v
Raffinose	v	-	+	-	+	w
Inulin	-	-	-	v	+	w
Glycerol	v	v	v	+	+	+
Other tests						
Hippurate	ND	ND	+	w	v	+
Ammonium from arginine	+	+	+	v	+	+
Voges-Proskauer test	v	+	v	v	+	+
Growth in 6.5% NaCl	+	+	+	w	+	+

RESULTS AND DISCUSSION

All isolated strains were facultatively anaerobic, non-motile, Gram-positive cocci, occurring in pairs, short chains or irregular clusters. All enterococcal strains fermented glucose, fructose, mannose, arabinose, cellobiose, maltose, sucrose, lactose and mannitol. Sorbitol, melezitose and inulin were not fermented in crops isolates. All strains were haemolytic and gave positive reaction in the bile-esculin test. Results of other tests are in Tab. II. Staphylococci fermented glucose, fructose, mannose, galactose, arabinose, cellobiose, maltose, sucrose, lactose, trehalose, glycerol and mannitol. All strains were haemolytic, grew on 15% NaCl agar and contained alkaline phosphatase activity. All strains produced acetoin. Nitrate-reducing strains SG1 and SG2 did not produce coagulase. On the other hand, coagulase-producing strains SA7 and S2 did not reduce nitrate to nitrite (Tab. III). Based on the observed characters the isolates were allotted to the species *Enterococcus gallinarum* (EG12, EG10, EG1, EG13), *Ent. avium* (EA7), *Ent. faecium* (EF9), *Staph. gallinarum* (SG1, SG2) and *Staph. aureus* (SA7, S2).

III. Chemical and physiological characteristics of staphylococci isolated from the alimentary tract of Japanese quail

Characteristic	Strain			
	Crop isolate	Caecal isolates		
	S2	SA7	SG1	SG2
Nitrate reduction	-	-	+	+
Coagulase	+	+	-	-
Catalase	v	+	-	-

All isolates (except SG1 strain) produced bacteriocin-like substances which inhibited the growth of at least 1 out of 10 indicator organisms (Tab. IV). The indicator *Staphylococcus* sp. S3 was not inhibited by

screened strains. The widest antimicrobial spectrum was found in strains EG13, EA7, EG10 and EG12. Generally, caecal isolates appear to be better producers of bacteriocin-like substances than isolates from the crop. In controls – isolates from birds unexposed to microgravitation the similar bacteriocin activities were determined (unpublished data). Moreover, at this moment *Ent. avium* EA7 strain is studied in detail in bacteriocin production with the aim to purify it. Antibiotic activity observed in enterococci was higher than in staphylococci. This activity was comparable with the same species of the control quail isolates (Lauková et al., 1991).

The principal end-product of glucose fermentation in the isolates studied was lactate accompanied by formate, succinate and ethanol (Tab. V). Amounts of metabolites other than lactate were usually small. No production of acetate was found.

Average urease activity 3.3 ± 0.12 nkat/ml was measured in caecal isolates as well as in crop isolates. The highest urease activity was detected in *Ent. gallinarum* EGH13 strain (5.26 ± 0.36) and *Staph. aureus* SA7 (3.7 ± 0.13 nkat/ml). Comparing with controls (average urease activity 4.6 ± 0.05 nkat/ml) urease activity in isolates was not significantly influenced by microgravitation (unpublished data).

All strains tested were resistant to monensin (50 mg/l) and sensitive to tylosin and virginiamycin (10 mg/l). Sensitivity to other antimicrobials is shown in Tab. VI. There are several reports on sensitivity of enterococci and staphylococci to antimicrobial feed additives. Marounek et al. (1989) found that *Ent. (formely Streptococcus) faecium* M-74 was sensitive to ionophores, avoparcin, tylosin and resistant to cyadox. Dutta and Devriese (1984) listed this species among bacteria resistant to monensin. Lauková and Marounek (1992) demonstrated rumen staphylococci to be mostly sensitive to tylosin and resistant to cyadox. Their sensitivity to avoparcin and monensin was variable. Our data agree with these findings.

IV. Bacteriocin-like activities of enterococcal and staphylococcal isolates from the alimentary tract of Japanese quails

Indicator organisms ¹	Strain ²									
	Crop isolates					Caecal isolates				
	EF9	EG1	EG13	S2	EA7	EG10	EG12	SA7	SG2	
<i>Staphylococcus</i> sp. LS4	-	++	+	-	+	+	+	-	-	
<i>Staphylococcus warneri</i> SW34	+(h)	+(h)	+(h)	+	+(h)	+(h)	-	-	-	
<i>Enterococcus gallinarum</i> EG3	-	-	-	+(h)	+(h)	+	+(h)	-	+(h)	
<i>Enterococcus</i> sp. EP3	-	++	+	-	+	++	++	-	-	
<i>Enterococcus</i> sp. EHR1	-	-	-	-	-	-	+(h)	-	-	
<i>Enterococcus faecalis</i> JH81	-	-	+(h)	-	+(h)	+(h)	+(h)	+(h)	-	
<i>Enterococcus faecalis</i> ED4	-	-	-	-	-	-	+(h)	-	-	
<i>Streptococcus bovis</i> 603	-	-	+(h)	-	-	-	+	+(h)	-	
<i>Escherichia coli</i> EC1	-	-	-	-	-	+	+	-	-	

1 - *Staphylococcus* sp. S3 was not inhibited by screened bacteria, 2 - *Staphylococcus gallinarum* SG1 inhibited all indicator strains, + - zones of inhibition 2-4 mm; ++ - zones of inhibition more than 5 mm; h - hazy zones

 V. Urease activity and production of metabolic end-products of glucose¹ fermentation in enterococci and staphylococci isolated from the alimentary tract of Japanese quails

		Strain								
		Crop ²			Caecum					
		EF9	EG1	EG13	EA7	EG10	EG12	SA7	SG1	SG2
Urease	(μ kat/l)	2.2 \pm 0.2	4.2 \pm 0.2	5.3 \pm 0.4	2.5 \pm 0.5	2.4 \pm 0.1	0.4 \pm 0	3.7 \pm 0.1	0.2 \pm 0	0.7 \pm 0
Lactate	(mmol/l)	24.8	24.8	26.2	23.5	24.7	21.3	20.8	20.4	21.7
Formate	(mmol/l)	0.7	-	0.7	-	-	-	0.7	4.8	2.5
Succinate	(mmol/l)	-	-	0.3	-	0.3	0.3	0.1	-	-
Ethanol	(mmol/l)	-	-	-	-	-	-	0.3	-	2.2

1 - glucose: 4 g/l, 2 - culture of *Staphylococcus aureus* S2 was not analysed

 VI. Sensitivity of enterococci and staphylococci to antimicrobial feed additives¹

Additives	Concentration (mg/l)	Strain									
		Crop isolates				Caecal isolates					
		EF9	EG1	EG13	S2	EA7	EG10	EG12	SA7	SG1	SG2
Cyadox	10	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R
	50	S	R	v	R	R	S	S	R	R	R
Nitrovin	10	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S
	50	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S
Bacitracin	10	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S
	50	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S
Avoparcin	10	v	v	R	R	S	R	R	R	R	R
	50	R	S	v	v	S	R	R	v	v	R
Lasalocid	10	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S
	50	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S
Salinomycin	10	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S
	50	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S
Nourseothricin	10	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S
	50	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S

1 - all strains were resistant to monensin at concentration 50 mg/l and sensitive to tylosin and virginiamycin at concentration 10 mg/l R - resistance; S - sensitivity; v - variable reaction

Staphylococci were somewhat more sensitive to antimicrobials than enterococci.

In conclusion, this work was undertaken to obtain more information on bacteria inhabiting the alimentary tract of birds. Tabs. II–VI present data on the properties of enterococci and staphylococci isolated from the crop and caecum of Japanese quail. The study of enterococci and staphylococci may be of practical use when searching for new probiotics, i. e. live microbial preparations which prevent the colonization of the gut by pathogens and supply enzymes, vitamins and nutrients to the host. Koniárová et al. (1993) reported a positive influence of bacteriocin-producing *Ent. faecium* strains on health of chicken infected by a pathogen. Crawford et al. (1980) and Hutcheson et al. (1980) demonstrated a beneficial effect of *Lactobacillus acidophilus* on performance of calves exposed to stress conditions. Thus it is possible that the use of dietary adjuncts based on *Ent. gallinarum* EG12 (or on similar bacterium) could improve the well-being of birds exposed to stress (e. g. the space flight).

REFERENCES

- BOĎA, K.: Cosmic biology and veterinary medicine. Veterinářství, 1992: 321–324.
- BOĎA, K. – MELEŠKO, G. I. – SABO, V. – ŠEPELEV, E. J. – GURJEVA, T. S. – JURÁNI, M. – KOŠTÁL, L.: Embryonic development of Japanese quail under microgravity conditions. The Physiologist, S-34, 1991: 59–61.
- CLARK, B. – PORTEOUS, J. W.: Determination of succinic acid by an enzymic method. Biochem. J., 21c, 1964: 93.
- CONWAY, E. J.: Microdiffusion Analysis and Volumetric Error. 4th ed. London, Crosby Lockwood and Son 1957.
- COOK, A. R.: Urease activity in the rumen of sheep and the isolation of ureolytic bacteria. J. Gen. Microbiol., 92, 1976: 32–48.
- CRAWFORD, J. S. – CARVER, L. – BERGER, J. – DANA, G.: Effects of feeding a living nonfreeze-dried *Lactobacillus acidophilus* culture on performance of incoming feedlot steers. Proc. West. Sect., 31, 1980: 210–212.
- DEVRIESE, L. A. – HOMMEZ, J. – WIJFELS, R. – HAESEBROUCK, F.: Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. J. Appl. Bact., 71, 1991: 46–50.
- DEVRIESE, L. A. – POT, B. – COLLINS, M. D.: Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. J. Appl. Bact., 75, 1993: 399–408.
- DUTTA, G. N. – DEVRIESE, L. A.: Observations on the *in vitro* sensitivity and resistance of grampositive intestinal bacteria of farm animals to growth promoting antimicrobial agents. J. Appl. Bact., 56, 1984: 117–123.
- HAYASHI, T. – KOZAKI, M.: Growth yield of an orange-colored *Streptococcus bovis* No. 148. J. Gen. Appl. Microbiol., 26, 1980: 245–253.
- HUTCHESON, D. P. – COLE, N. A. – KEATON, W. – GRAHAM, G. – DUNLAP, R. – PITTMAN, K.: The use of a living, nonfreeze-dried *Lactobacillus acidophilus* culture for receiving feedlot calves. Proc. West. Sect., 31, 1980: 213–215.
- KONIAROVÁ, I. – NEMCOVÁ, R. – LAUKOVÁ, A.: Effect of *Enterococcus faecium* on microflora of digestive tract of chicken inoculated with *Clostridium*. Folia Microbiol., 38, 1993: 170.
- LAUKOVÁ, A. – KMEŤ, V. – BOĎA, K.: Microflora of Japanese quail under space flight conditions. Cosm. Biol. Med., 2, 1991: 225–232.
- LAUKOVÁ, A. – MAROUNEK, M.: Physiological and biochemical characteristics of staphylococci isolated from the rumen of young calves and lambs. Zbl. Mikrobiol., 147, 1992: 489–494.
- LAUKOVÁ, A. – BOĎA, K. – KMEŤ, V.: A note on the influence of microgravity on the microbial endoecosystem of Japanese quail. J. Anim. Feed Sci., 1, 1993: 295–301.
- MAC FADDIN, J. F.: Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. Baltimore, The Williams and Wilkins Co. 1976.
- MAROUNEK, M. – CHON, S. B. – PODSEDNÍČEK, M.: Effect of antimicrobial feed additives on the growth of pure culture of ruminal bacteria. Biol. Chem., 25, 1989: 211–218.
- MEAD, G. C.: Microbes of the avian caecum: types present and substrates utilized. J. Exp. Zool., Suppl. 3, 1989: 48–54.
- OTTENSTEIN, D. M. – BARTLEY, D. A.: Improved gas chromatography separation of free acids C₂–C₅ in dilute solution. Analyt. Chem., 43, 1971: 952–955.
- SKALKKA, B. – PILLICH, J. – POSPÍŠIL, L.: Further observations on *Corynebacterium renale* as an indicator organism in the detection of exfoliation-positive strain of *Staphylococcus aureus*. Zbl. Mikrobiol., A 256, 1983: 168–174.
- SLEAT, R. – MAH, R. A.: Quantitative method for colorimetric determination of formate in fermentation media. Appl. Envir. Microbiol., 47, 1984: 884–885.
- SCHLEIFER, K. H.: Gram-positive cocci. In: KRIEG, N. R. – HOLT, J. G. (eds.): Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. 9th ed. Baltimore, William and Wilkins 1984: 999–1103.

Arrived on 5th April 1995

Contact Address:

MVDr. Andrea Lauková, CSc., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4, 040 01 Košice, Slovenská republika

Tel. 095/633 62 51, fax 095/76 21 62, e-mail: ufhsav@ccsun.tuke.sk

INSTITUTE OF AGRICULTURAL AND FOOD INFORMATION
Slezská 7, 120 56 Praha 2, Czech Republic
Fax: (00422) 25 70 90

In this institute scientific journals dealing with the problems of agriculture and related sciences are published on behalf of the Czech Academy of Agricultural Sciences. The periodicals are published in the Czech or Slovak languages with long summaries in English or in English language with summaries in Czech or Slovak.

Subscription to these journals should be sent to the above-mentioned address.

Periodical	Number of issues per year
Rostlinná výroba (Plant Production)	12
Živočišná výroba (Animal Production)	12
Veterinární medicína (Veterinary Medicine – Czech)	12
Zemědělská ekonomika (Agricultural Economics)	12
Lesnictví – Forestry	12
Zemědělská technika (Agricultural Engineering)	4
Ochrana rostlin (Plant Protection)	4
Genetika a šlechtění (Genetics and Plant Breeding)	4
Zahradnictví (Horticultural Science)	4
Potravinářské vědy (Food Sciences)	6

USE OF A POLYURETHANE CARRIER FOR ASSESSING THE SURVIVAL OF HELMINTH EGGS IN LIQUID BIOLOGICAL SLUDGES

POUŽITIE POLYURETANOVÉHO NOSIČA PRI HODNOTENÍ PREŽÍVANIA VAJÍČOK HELMINTOV V TEKUTÝCH BIOLOGICKÝCH KALOCH

P. Plachý, P. Juriš

Parasitological Institute, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: Soft expanded polyurethane (plastic foam) was used as an egg carrier. A carrier of helminth eggs and a method for their isolation were tested. They proved applicable to evaluation of the survival of helminth eggs in liquid biological substrates (sludges, liquid excrements). The inside of the carrier was inoculated with $1,000 \pm 50$ *Ascaris suum* eggs. After 21 days of incubation in an aerated medium at room temperature, 660.7 (66.1%) eggs were isolated on the average ($n = 10$, Tab. I). The carriers incubated in the medium at 4 °C yielded 716.2 eggs (71.6%) on the average (Tab. II). The intactness of the carriers in helminth eggs was proved during 21 days of incubation in aerated medium when the detected mean percentage of embryonated eggs was 80.5 % (Tab. I). From the carriers kept at 4 °C for 21 days and subsequently incubated 76.6% of embryonated eggs were recovered on the average (Tab. II). Control showed 80.95% of embryonated eggs on the average, which is a statistically insignificant difference ($P < 0.05$). With the use of the carrier more than a 13-fold increase in the viable eggs was recorded, compared with a 5% yield obtained at a direct inoculation into liquid substrates. This method is rewarding for its optimization of experimental results and for reducing the number of eggs used in the experiments.

polyurethane carrier; helminth eggs; sewage sludge; liquid excrements

ABSTRAKT: Bol testovaný nosič a metóda izolácie vhodná pre sledovanie prežívania vajíčok helmintov v tekutých biologických substrátoch (kaly, tekuté exkrementy hospodárskych zvierat). Ako nosič vajíčok bol použitý mäkký ľahčený polyuretán (molitan). Po inokulácii $1\ 000 \pm 50$ vajíčok *Ascaris suum* do vnútra nosiča a 21-dňovej inkubácii pri laboratórnej teplote v prevzdušňovanom médiu bolo izolovaných v priemere 660,7 (66,07 %) vajíčok ($n = 10$, tab. I). Z nosičov uložených v médiu pri teplote 4 °C bolo izolovaných v priemere 716,2 (71,6 %) vajíčok (tab. II). Pri dôkaze intaktnosti nosičov k vajíčkam helmintov počas 21-dňovej inkubácie v prevzdušňovanom médiu sme zistili v priemere 80,5 % embryonovaných vajíčok (tab. I). Z nosičov umiestnených pri teplote 4 °C 21 dní a následnej inkubácii izolovaných vajíčok bolo v priemere 76,6 % embryonovaných vajíčok (tab. II). V kontrole bolo embryonovaných vajíčok v priemere 80,95 %, čo v porovnaní s pokusnými skupinami nepredstavuje štatisticky významný rozdiel na hladine významnosti $P < 0,05$. Výťažnosť vajíčok bola pri použití nosiča viac ako 13-násobne vyššia v porovnaní s výťažnosťou 5% pri priamej inokulácii do tekutých substrátov. Výhodou metódy je optimalizácia výsledkov experimentov a zníženie počtu vajíčok používaných v experimentoch.

polyuretánový nosič; vajíčka helmintov; čistiarenské kaly; tekuté exkrementy

INTRODUCTION

The principal objective of the conventional municipal and agricultural waste treatment is the reduction of organic and anorganic pollution, odour and the number and viability of pathogens.

The parasite pathogenic germs are able to survive the waste treatment processes and tend to concentrate in biological sludges. These are subsequently treated by various aerobic and anaerobic stabilization processes. At present, still other methods for sludge disinfection are being used or developed, based on various physical and biologic-chemical processes (composting, pas-

teurization, electrolysis) – Pike et al. (1988), Novák (1994).

For tracing the effect of various technologies on the survival of endoparasitic germs under laboratory, pilot and operating plant conditions, the most frequently used method is the direct inoculation of pathogens into sludges or excrements (Juriš et al., 1992). A drawback of this method is the need for a large quantity of model helminth eggs (even in relatively small laboratory facilities). They are diffused, stuck to the walls and other parts of the equipment and to substrate particles and their recovery is therefore very low, which consequently affects the assessment of the results.

In evaluating the effect of various abiotic and biotic factors on helminth eggs in liquid biological substrates (liquid livestock excrements, sewage sludges) treated by various technological processes, it is necessary to maintain the contact between the pathogens and the medium and at the same time to meet the requirement for their high recovery. This provides for the more objective evaluation of the efficiency of technological process in terms of its effect on helminth pathogens, which subsequently makes it possible to estimate the hygienic and epidemiological risks of applying substrates treated by different technologies to soil (fertilization).

Sedláček and Stoklasová (1977) used for this purpose glass-reinforced plastic bags which were placed into the digestion tanks of the municipal treatment plant. Ilsoe et al. (1990) used nylon bags for putting *Taenia saginata* eggs in soil and followed their survival under conditions of Denmark.

In studying the survival of *Ascaris suum* eggs in sludge beds of waste treatment plants, Plachý and Juriš (1995) used a capronic fabric to prevent the eggs from leaking into the sludge.

The presented study was designed to search for a suitable carrier of helminth eggs, which would increase their recovery, compared with the direct inoculation.

MATERIALS AND METHODS

In the experiments we used non-embryonated *Ascaris suum* eggs isolated from the distal portion of the uterus of sexually mature females, suspended in saline (Costello, 1961) at the amount of 1000 ± 50 (\pm SD – standard deviation) specimens in 1 ml.

SELECTION OF CARRIER AND ITS CHARACTER

Among various materials for making egg carriers, we selected a porous cellular plastic – soft expanded polyurethane, commercially known as plastic foam. It is an additive product of polyisocyanates and compounds with a high content of hydroxylic groups (ČSN 64 5480). It consists of a network of interconnected cells, resembling a honeycomb. Eggs are placed with a micropipette inside the carrier. Its polyurethane structure allows for a sufficient contact of helminth eggs with the environment, preventing them from release and consequently improving their recovery.

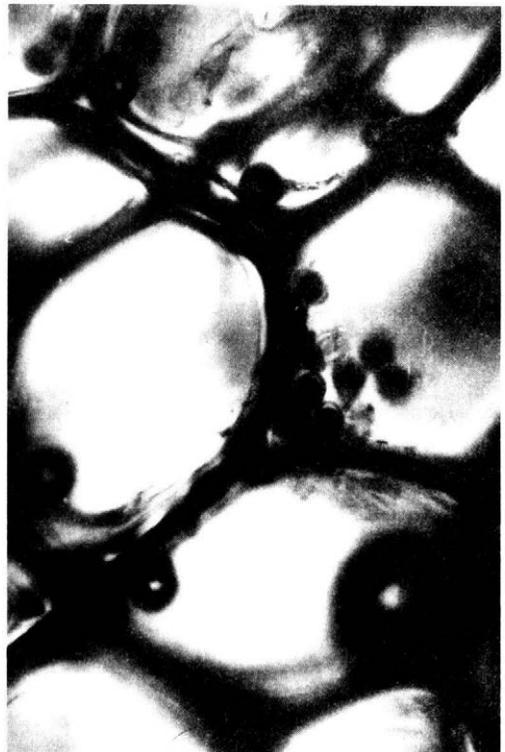
ISOLATION OF PATHOGEN FROM CARRIERS

A polyurethane carrier was cut in a Petri dish into small pieces. The obtained crumbs were put in a glass mixing bowl, filled with 50 ml of physiological saline and mixed at low speed for 30 seconds. The mixed

content was poured through a 1mm mesh screen in a centrifuge tube. The polyurethane crumbs retained on the screen, were washed 4 times with 10 ml of physiological saline, the remaining water was squeezed out by a spatula and the liquid content filled to give 100 ml. The liquid in the tube was centrifuged at 1,500 for 15 min. The supernatant was exhausted carefully, filled with saturated saccharose solution of specific weight 1300 and centrifuged. The tubes were filled up to the margin with flotation solution, covered with glass plates 10 x 10 cm and allowed to float for about 30 min. Helminth eggs were then examined under a light microscope.

VERIFICATION OF THE EGG ISOLATION METHOD AND OF CARRIER INTACTNESS

Two experiments were carried out to determine the efficiency of egg isolation from carriers and two other experiments to verify the intactness of material and feasibility of the method. Twenty polyurethane, cube-shaped carriers with the edge of 1.5 cm were used. A suspension of $1,000 \pm 50$ non-embryonated *Ascaris suum* eggs was injected with an automatic pipette in the mid-part of carriers. The inoculated carriers were



1. Microscopic structure of a polyurethane carrier with adhered *Ascaris suum* eggs (magnified)

I. Number of embryonated *Ascaris suum* eggs isolated from carriers after 21 days of incubation in aerated medium at room temperature

Carrier	No. isolated eggs ¹	% isolated eggs	No. embryonated eggs	% embryonated eggs
1	623	62.3	495	79.5
2	685	68.5	529	77.2
3	714	71.4	616	86.3
4	692	69.2	563	81.4
5	601	60.1	423	70.4
6	676	67.6	598	88.5
7	721	72.1	612	84.9
8	613	61.3	483	78.8
9	648	64.8	579	89.4
10	634	63.4	463	73.0
Mean	660.7 ± 42.7	66.1	536.1 ± 67.7	80.9

¹each carrier was inoculated with 1,000 ± 50 eggs (± SD)

II. Number of embryonated *Ascaris suum* eggs isolated from carriers kept at 4 °C for 21 days and subsequently incubated at 24 °C for 21 days

Carrier	No. isolated eggs ¹	% isolated eggs	No. embryonated eggs	% embryonated eggs
1	720	72	573	79.6
2	682	68.2	569	83.4
3	716	71.6	581	81.1
4	648	64.8	482	74.4
5	723	72.3	566	78.3
6	734	73.4	571	77.8
7	758	75.8	552	72.8
8	710	71	542	76.3
9	743	74.3	491	66.1
10	728	72.8	551	75.7
Mean	716.2 ± 31.3	71.62	547.8 ± 34.4	76.6

¹each carrier was inoculated with 1,000 ± 50 eggs

placed in 2 beaker flasks, each holding 10 carriers, embedded in culture medium (150 ml 0.8% NaCl solution). The carriers were burdened by beakers 1 cm smaller in diameter than those containing the culture medium. During the experiment, the carriers were kept immersed in the mid-part of the culture medium column by addition of water as weight. One flask was kept in a refrigerator at 4 °C. The culture medium in the second flask was aerated by an aquarium pump at room temperature. As control were used eggs from the same culture, kept under the same conditions but diffused free in culture medium in 10 beaker flasks with the inflow of air. After 21 days of incubation the eggs were isolated from the carriers and culture medium (control) and the number of those that developed into infective stage was counted. The eggs kept on carriers in a refrigerator were placed in Petri dishes and incubated at 24 °C to reach infective stage for 21 days. Larvae L₂ exhibiting active motility in the eggs when approached by the light microscope condenser were used as the criterion for determination of the viability of eggs. Any deviations in the development or immotility of larvae were considered as non-viable eggs.

Data were statistically evaluated using a test of relative numbers (Reisenhauser, 1970).

RESULTS

EFFICIENCY OF ISOLATION

In using the above-described procedure of 1,000 ± 50 inoculated *Ascaris suum* eggs in one carrier incubated in aerated medium at room temperature for 21 days 660.7 (66.07%) eggs were recovered on the average (Tab. I).

From 10 carriers kept at 4 °C for 21 days the average of isolated eggs was 716.2 (71.6%) (Tab. II).

INTACTNESS OF CARRIER

With the evidence of the carrier intactness in relation to helminth eggs for 21 days of incubation in aerated medium, 80.5% of embryonated eggs were detected on average (Tab. I). From the carriers kept at 4 °C

III. Number of infected eggs dispersed freely in culture medium (control)

Carrier	No. embryonated eggs ¹	% embryonated eggs
1	161	80.5
2	155	77.5
3	153	76.5
4	163	81.5
5	170	85.0
6	165	82.5
7	162	81.0
8	166	83.0
9	159	79.5
10	165	82.5
Average	161.9 ± 5.2	80.95

¹in each sample 200 eggs were evaluated

for 21 days and after a subsequent incubation of isolated eggs, 76% eggs were embryonated on average (Tab. II). Control showed 80.95% embryonated eggs on average (Tab. III), which is no statistically significant difference ($P < 0.05$) compared with the experimental groups. Eggs in the experimental and control groups were developing evenly without anomalies throughout the entire period of incubation (21 days).

DISCUSSION

The results show that the helminth egg carriers and the method for isolation of helminth propagative stages are applicable and efficient. The polyurethane carriers proved advantageous for their low price, simple inoculation and isolation of pathogens. Compared with the method using for instance nylon or glass-reinforced bags that must be sealed and secured to prevent eggs from escaping, this carrier can be made by a single cutting of a block of the material. The cellular structure of polyurethane keeps eggs from floating away since they adhere by their surface layer to its beams. The contact with the environment is preserved, allowing for the change of gasses, change in pH and for other factors that may have an effect on the pathogens studied.

In technological processes where the carriers may be mechanically damaged, they can be protected by being placed in plastic bottles with opening on the surface. Compared with the direct inoculation of helminth eggs into the tested substrate, where aerobic stabilization of pig slurry (Juriš et al., 1993) and sewage sludges (Plachý et al., 1994) yielded 2–8% of recovered

eggs, this experimental laboratory method gave the yield many times higher.

These results were verified in experiments tracing the survival of helminth eggs in aerobic and anaerobic processes of wastewater, biological sludge and livestock liquid excrements – treatment both under laboratory and pilot plant conditions. In addition to its other benefits, this method saves biological material – helminth eggs and makes the evaluation of experimental results more accurate.

REFERENCES

- COSTELLO, L. C.: A simplified method of isolating *Ascaris suum* eggs. *J. Parasit.*, 47, 1961: 24.
- ILSOE, B. – KYVSGAARD, N. – NANSEN, P. – HENRIKSEN, S.: A study on the survival of *Taenia saginata* eggs on soil in Denmark. *Acta Vet. Scand.*, 31, 1990: 153–158.
- JURIŠ, P. – PLACHÝ, P. – TÓTH, F. – VENGLOVSKÝ, J.: Effect of biofermentation of pig slurry on *Ascaris suum* eggs. *Helminthologia*, 29, 1992: 155–159.
- JURIŠ, P. – PLACHÝ, P. – DUBINSKÝ, P. – VENGLOVSKÝ, I. – TÓTH, F.: The effect of laboratory aerobic stabilisation of liquid excrements on vitality of *Salmonella typhimurium* and *Ascaris suum* germs. *Vet. Med. – Czech*, 38, 1993: 553–558.
- NOVÁK, P.: Dynamics of indicatory microorganisms during composting of agricultural wastes. In: Proc. the 2. Sci. Conf. Ecology and Veterinary Medicine, Košice, 24.–25. 5. 1994: 69–73.
- PIKE, E. B. – CARRINGTON, E. G. – HARMAN, S. A.: Destruction of salmonellas, enteroviruses and ova of parasites in wastewater sludge by pasteurisation and aerobic digestion. In: IAWPRC – Microb. of Water and Wastewater, February 1988 (Separatum, 6 p.).
- PLACHÝ, P. – JURIŠ, P. – PLACHÁ, I.: Effect of aerobic oxidation of primary sludges from wastewater treatment plants on the survival of *T. canis* and *Ascaris suum* eggs under laboratory conditions. *Zbor. Ved. Prác ÚEVM Košice*, X, 1994: 49–57.
- PLACHÝ, P. – JURIŠ, P.: Survival of the model helminth *Ascaris suum* eggs in the sludge drying beds of sewage treatment plants. *Vet. Med. – Czech*, 40, 1995: 23–27.
- REISENHAUER, R.: Methods of Mathematical Statistics. Praha, ČSAV a ČSVTS 1970. 239 p.
- SEDLÁČEK, M. – STOKLASOVÁ, V.: Eggs count of parasitic worms and their survival in sewage sludges. *Vod. Hospod.*, řada B, 1, 1977: 7–11.
- ČSN 64 5480. Mäkký ľahčeny polyuretán. 1983.

Arrived on 6th March 1995

Contact Address:

MVDr. Peter Plachý, Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/633 44 55, fax 095/633 14 44, e-mail: plachy@linux1.saske.sk

COMPARISON OF MOUSE AND CHICK EMBRYO LIVER AND HEPATOMA CELL LINES AS MODEL SYSTEMS USED FOR ENZYMOLOGICAL ESTIMATION OF TOXICITY POTENTIALS OF ORGANIC POLLUTANTS*

SROVNÁNÍ JATER MYŠÍ A KUŘECÍHO EMBRYA A HEPATOMA BUNĚČNÝCH LINIÍ JAKO MODELOVÝCH SYSTÉMŮ PRO ENZYMOLOGICKÉ STANOVENÍ POTENCIÁLŮ TOXICITY ORGANICKÝCH POLUTANTŮ

M. Machala¹, L. Mátlová², K. Nezveda¹, J. Turánek¹, P. Hořavová¹, M. Granátová¹, Z. Nevoránková¹

¹Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

²Masaryk University, Faculty of Science, Brno, Czech Republic

ABSTRACTS: Cytochromes P450-dependent monooxygenase activities were determined and compared in mouse liver microsomes and in hepatoma cell homogenates after exposure to prototype inducers of individual P450 enzymes. *In vivo* inductions of levels of mouse hepatic monooxygenase activities have been found as effective biochemical markers of toxicity potentials of a series of classes of xenobiotics (CYP1A induction for toxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, coplanar polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons and related pollutants; CYP2E induction for dialkyl-nitrosamines and organic solvents, e. g. acetone and ethanol; CYP2B and CYP3A induction for phenobarbital- and dexamethasone-type of xenobiotics). A specific induction of CYP1A-dependent O-dealkylase activities by TCDD was found in Hepa-1 and Hep G2 cell cultures, but no *in vitro* induction of other P450 enzymes was found after the treatment with phenobarbital, acetone or dexamethasone. Therefore, mouse liver is a suitable *in vivo* system for the testing of inducing effects of xenobiotics on all relevant P450 forms, while hepatoma cell cultures are usable only for the bioassay of TCDD-like toxicity.

cytochrome P450; monooxygenase activity; enzyme induction; toxicity potentials; environmental pollution; mouse; chick embryo; hepatoma cell lines

ABSTRAKT: Byly stanoveny a porovnány monooxygenázové aktivity cytochromů P450 v myších jaterních mikrosomech a v homogenátech hepatoma buněk po expozici modelových induktorů hladin jednotlivých enzymů P450. Indukce *in vivo* myších jaterních monooxygenázových aktivit se ukázaly jako vhodné biochemické markery míry toxicity různých tříd xenobiotik (indukce enzymu CYP1A pro toxické efekty 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinu, koplanárních polychlorovaných bifenyly, polycyklických aromatických uhlovodíků a příbuzných polutantů; indukce CYP2E pro efekty dialkylnitrosaminů a organických rozpouštědel, např. acetonu a etanolu; indukce CYP2B a CYP3A pro xenobiotika fenobarbitalového a dexametazonového typu). Specifická indukce CYP1A-dependenčních O-dealkylázových aktivit 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem byla stanovena v buněčných kulturách Hepa-1 a HepG2, ale *in vitro* indukce dalších enzymů P450 po působení fenobarbitalu, acetonu nebo dexametazonu nalezena nebyla. Myš je proto vhodný systém *in vivo* pro testování indukčních efektů cizorodých látek na všechny významné formy P450, zatímco hepatoma buněčné kultury lze použít pouze pro biologické stanovení toxicity látek typu 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinu.

cytochrom P450; monooxygenázy; enzymová indukce; potenciály toxicity; znečištění životního prostředí; myš; kuřecí embryo; hepatoma buněčné linie

* This work was supported by the Czech Ministry of Agriculture, grant No. A 93 95 0044.

INTRODUCTION

Toxic, mutagenic, carcinogenic and other adverse effects of most organic xenobiotics are manifested only after their metabolic activation. An increase in levels of cytochromes P450, which are enzymes responsible for the first step of that activation, correlates with toxic/carcinogenic potencies of xenobiotics. Hepatic microsomal cytochromes P4501A1, P4501A2, P4502E and P4503A (CYP1A1, CYP1A2, CYP2E and CYP3A, in terms of the new nomenclature) are involved in the bioactivation of most xenobiotics (Guengerich, 1992) and the CYP2E and P4502B (CYP2B) forms are partly responsible for the production of toxic oxygen species (Parke et al., 1990). The CYP1A enzymes are induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and other contaminants which caused the TCDD-like toxic effects; phenobarbital, non-planar polychlorinated biphenyls (with *ortho*-chlorines), DDT, lindane and other organochlorine pesticides increase the levels of CYP2B forms; volatile solvents (acetone, ethanol, trichloroethylene) induce CYP2E and large molecules (e. g. dexamethasone, erythromycin or chlorinated biphenyls with 3–4 *ortho*-chlorine substituents) induce CYP3A forms (Okey, 1990). Therefore, the measurement of induction of cytochrome-P450-dependent monooxygenase activities after the input of tested xenobiotics into a biological model system can be a good toxicological tool for a rapid estimation of toxicity potentials (Parke et al., 1990).

This approach is valuable for 1) biochemical screening of aromatic pollutants which occur in very complex mixtures in the environment, especially of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related contaminants from the classes of polyhalogenated biphenyls, dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans, e. g. coplanar polychlorinated biphenyls, and which are specific inducers of cytochrome P4501A enzymes (Safe et al., 1989) and 2) for testing of toxicity potentials of new agrochemicals and industrial contaminants. For the latter purpose, changes in levels of multiple cytochrome P450 isoenzymes are to be determined. Relatively specific monooxygenase activities of cytochrome P450 forms in the rat liver have been described: 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) as expression of CYP1A1, 7-methoxyresorufin O-demethylase (MROD) for CYP1A2, 7-pentoxoresorufin O-depentylase (PROD) and aminopyrine N-demethylase (AMPD) for CYP2B, dimethylnitrosamine N-demethylase (DMNAD) for CYP2E and erythromycin N-demethylase (ED) for CYP3A forms (Prough et al., 1978; Namkung et al., 1988; Lubet et al., 1985; Lorr et al., 1989).

In a previous paper, we described the presence and inducibilities of P450 forms in the chick embryo liver and we tested potential toxicities of 3,4-dichloroaniline and substituted-urea herbicides in this model system (Machala et al., 1993). In the present study, the comparison of presence and inducibilities of individual

P450 enzymes after treatment with model xenobiotics is shown in mouse liver, chick embryo liver and in mouse Hepa-I and human Hep G2 hepatoma cell lines. Specificities and limits of such estimation are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Male C57Bl/10 mice, aged 9–10 weeks, were maintained on a standard laboratory diet. Inducers were administered *i. p.* at the following doses for 3 days: 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (TeCB) 250 µg/kg; phenobarbital (PB) 80 mg/kg; acetone (ACE) 500 mg/kg; dexamethasone (DEX) 100 mg/kg. Liver microsomes were prepared 24 hr after the last administration as described by Machala et al. (1993).

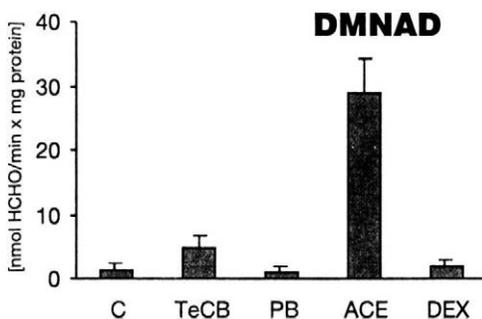
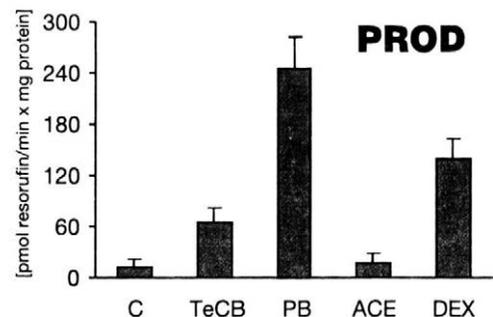
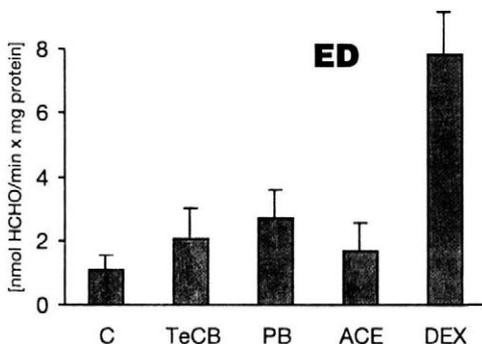
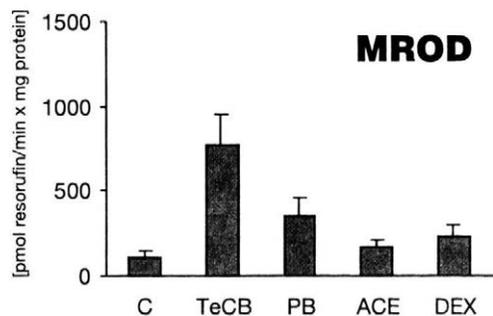
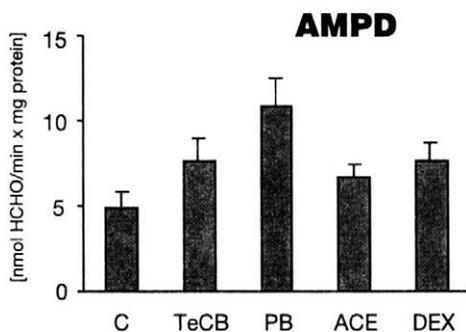
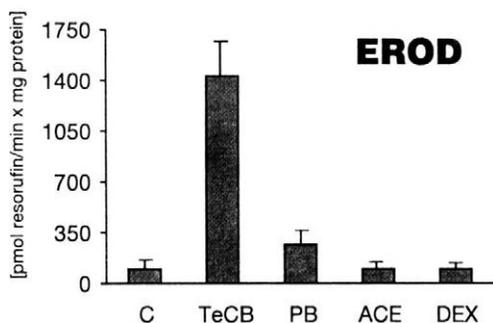
The Hepa-1c1c7 and Hep G2 cell lines, supplied by Dr. S. Kärenlampi (University of Kuopio, Finland), were grown as monolayers at 37 °C in 5% CO₂ in dMEM (Serva) supplemented with 10% fetal calf serum (Hustopeče Cooperative Farm) and antibiotic-antimycotic mixture. Cells were plated at 10⁶ cells per 50-mm dish in 5 ml of medium. The inducers were administered 24 hr or 48 hr prior to harvesting. Final concentrations of the inducers: 100 pM TCDD, 0.2 mM PB, 34 mM ACE, 10 µM DEX. Cells from 5 dishes were harvested, pooled and homogenized. Owing to poor induction in pilot experiments, the dose of TCDD was increased to 1000 pM in the Hep G2 cell culture.

All monooxygenase activities were assayed in mouse liver microsomes or in hepatoma cell homogenates. EROD, MROD and PROD activities were determined by the direct fluorimetric method (excitation and emission wavelengths were 530 and 585 nm, respectively), after the addition of 10 µM dicoumarol into the reaction mixture with cell homogenates. AMPD, ED and DMNAD activities were determined as described by Lorr et al. (1989). Final concentrations of 7-alkoxyresorufins were 2 µM and those of aminopyrine, erythromycin and dimethylnitrosamine 10 mM, 1 mM and 5 mM, respectively. Protein concentration was measured using the BCA procedure (Sigma Chem. Co.).

The data were analyzed for statistical significance by the Student's test. The values were expressed as means ± S. D. of six mice or three cell pool homogenates.

RESULTS AND DISCUSSION

The microsomal monooxygenase activities were determined in mouse liver after exposure to prototype inducers TeCB (inducing mainly the CYP1A subfamily), phenobarbital (inducer of CYP2B and partly CYP2E and CYP3A forms), acetone (inducer of CYP2E) and dexamethasone, a CYP3A inducer (Fig. 1, 2). EROD was specifically induced by TeCB. MROD was increased also after the treatment with phenobar-



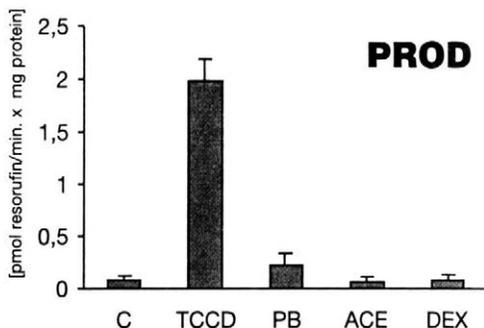
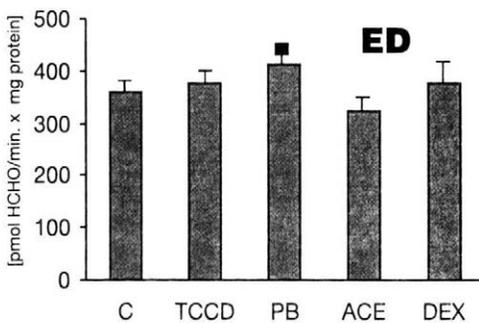
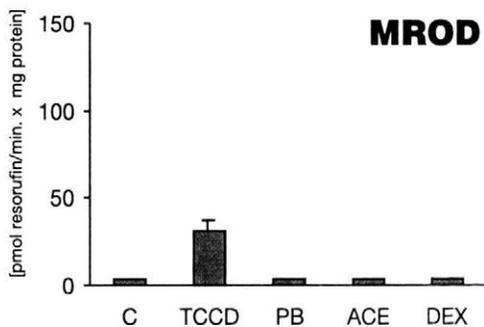
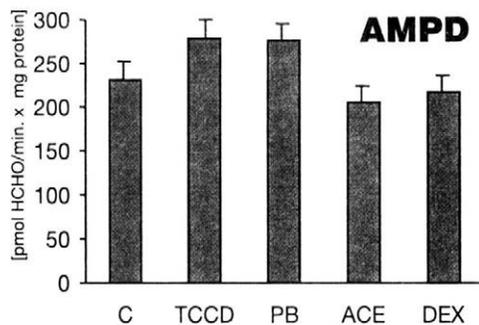
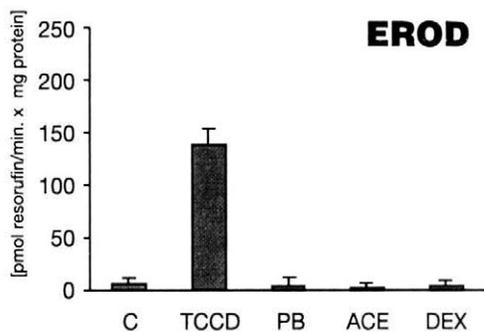
1. O-Dealkylase activities in control and xenobiotics-treated mice 24 h after the last administration (see Materials and Methods; C, control; TeCB, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl; PB, phenobarbital; ACE, acetone; DEX, dexamethasone; EROD, 7-ethoxyresorufin O-deethylase; MROD, 7-methoxyresorufin O-demethylase; PROD, 7-pentoxyresorufin O-depentylase). Results are expressed as pmol resorufin/min.mg protein

2. N-Demethylase activities in control and xenobiotics-treated mice (nmol HCHO/min.mg protein). Abbreviations: AMPD, aminopyrine N-demethylase; ED, erythromycin N-demethylase; DMNAD, dimethylnitrosamine N-demethylase

bital. In spite of the overlapping substrate specificities of CYP2B, CYP2E and CYP3A enzymes, differences in induction potencies were demonstrated: the PROD activity was not affected by acetone, AMPD was induced nonspecifically by all the inducers tested and dexamethasone and acetone were specific inducers of ED and DMNAD, respectively (Fig. 2).

The levels of monooxygenase activities in homogenates of Hepa-1 and Hep G2 cell cultures are shown in

Figs. 3 and 4. Some of all the O-dealkylase and N-demethylase activities were found in both cell lines, but only CYP1A-dependent EROD and MROD were induced specifically by TCDD. Contrary to the results of *in vivo* experiments, the PROD activity was increased by TCDD. Other monooxygenases were not affected significantly by any of the model xenobiotics. The results are in agreement with the finding that only one form of cytochrome P450 is formed in response to the



3. Monooxygenase activities in the Hepa-1 cell line (24 hr after the administration, see Materials and Methods). O-dealkylases expressed as pmol resorufin/min.mg protein. N-demethylases expressed as nmol HCHO/min.mg protein. Enzymatic activities abbreviated like in Figs. 1 and 2

inducers (including phenobarbital) in the Hepa-1 cells (Kärenlampi et al., 1989).

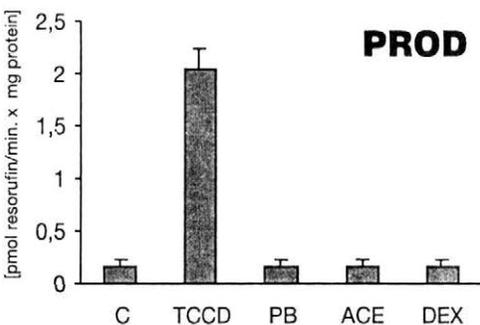
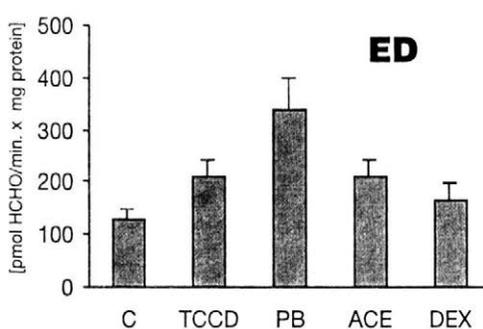
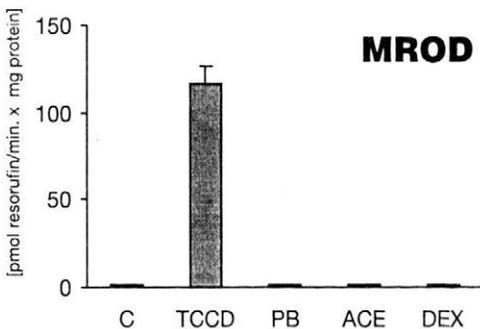
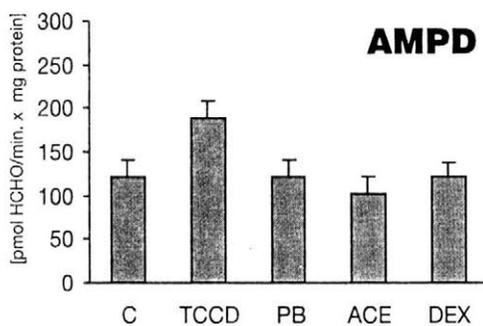
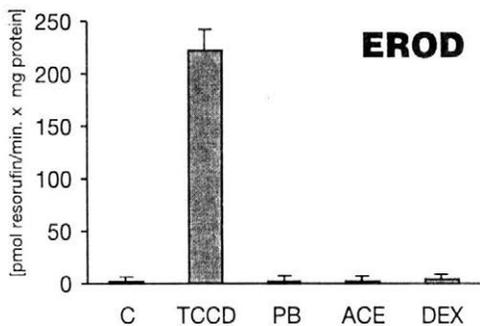
It was shown in a previous study that the enzymological approach to the risk assessment of chemicals, based on measurements of activities of bioactivating cytochrome P450 enzymes in chick embryo liver, is limited to TCDD- and phenobarbital-inducible forms. Aldrin epoxidase, but not PROD or AMPD activities were found as the specific phenobarbital-induced activity (Machala et al., 1993). In contrast, mouse liver is a more suitable *in vivo* system for the testing of inducibilities of all relevant P450 forms. Tests in hepatoma cell lines are a suitable tool for the bioassay of TCDD-like toxicity, but other P450-dependent monooxygenase activities were not induced. The findings are summarized in Tab. I.

CONCLUSIONS

1. The *in vivo* and *in vitro* systems are usable for both the estimation of toxicity potentials of individual environmental pollutants and the screening of contaminants in environmental samples.

2. *In vivo* inductions of mouse hepatic monooxygenase activities have been found as effective biomarkers of toxicity potentials of xenobiotics. The use of chick embryo liver as such a model system is limited to TCDD- and phenobarbital-types of inducers.

3. Induction studies in hepatoma cell lines revealed no significant inducibilities of P450 forms except the CYP1A enzyme(s). Monooxygenase activities, dependent on CYP2 and CYP3A, were expressed in the hepatoma cells, but they were not inducible by the model



4. Monooxygenase activities in the Hep G2 cell line (48 hr after the administration). Enzymatic activities abbreviated like in Figs. 1 and 2

1. Inducibilities of monooxygenase activities *in vivo* and *in vitro* after the treatment with model xenobiotics

Biological model	Induced activity						
	EROD	MROD	PROD	AMPD	DMNAD	ED	AE
Chick embryo	TCDD TeCB	TCDD TeCB	TCDD TeCB (PB)	nonspecific	0	nonspecific	PB
Male mouse	TeCB	TeCB (PB)	PB DEX	nonspecific	ACE	DEX (PB)	n. d.
Hepa-1	TCDD	TCDD	TCDD	0	n. d.	0	n. d.
Hep G2	TCDD	TCDD	TCDD	0	n. d.	0	n. d.

0, not induced; n. d., not determined

inducers phenobarbital, acetone and dexamethasone. Therefore hepatoma cell cultures are usable only for the bioassay of TCDD-like toxicity.

Acknowledgement

The authors wish to thank Dr. Sirpää Kärenlampi for her advice on the application of cell culture methods and Mrs. Eva Gröbnerová for her excellent technical assistance.

REFERENCES

GUENGERICH, F. P.: Metabolic activation of carcinogens. *Pharmac. Ther.*, 54, 1992: 17–61.
KÄRENLAMPPI, S. O. – TUOMI, K. – KORKALAINEN, M. – RAUNIO, H.: Cytochrome P450IA1 in mouse hepatoma cells by several chemicals. Phenobarbital and TCDD induce the same form of cytochrome P450. *Biochem. Pharmacol.*, 38, 1989: 1517–1525.
LORR, N. A. – BLOOM, S. E. – PARK, S. S. – GELBOIN, A. V. – MILLER, H. – FRIEDMAN, F. K.: Evidence for a PCN-P450 enzyme in chickens and comparison of its development with that of other phenobarbital-inducible forms. *Mol. Pharmacol.*, 35, 1989: 610–616.
LUBET, R. A. – MAYER, R. T. – CAMERON, J. W. – NIMS, R. W. – BURKE, M. D. – WOLFF, T. – GUENGERICH, F. P.: Dealkylation of pentoxyresorufin: A rapid and

sensitive assay for measuring induction of cytochrome(s) P-450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.*, 238, 1985: 43–48.
MACHALA, M. – NEZVEDA, K. – ULRICH, R. – MÁTLOVÁ, L.: Toxicity potential estimation and biochemical monitoring of aromatic contaminants by the measurement of monooxygenase activities in chick embryo liver. In: RICHARDSON, M. L. (ed.): *Ecotoxicology Monitoring*. Weinheim, VCh 1993: 173–182.
NAMKUNG, M. J. – YANG, H. L. – HULLA, J. E. – JUCHAU, M. R.: On the substrate specificity of cytochrome P450III_{A1}. *Mol. Pharmacol.*, 34, 1988: 628–637.
OKEY, A. B.: Enzyme induction in the cytochrome P-450 system. *Pharmac. Ther.*, 45, 1990: 241–298.
PARKE, D. V. – IOANNIDES, C. – LEWIS, D. F. V.: Computer modeling and *in vitro* tests in the safety evaluation of chemicals – strategic applications. *Toxic in Vitro* 4, 1990: 680–685.
PROUGH, R. A. – BURKE, M. D. – MAYER, R. T.: Direct fluorimetric methods for measuring mixed-function oxidase activity. *Meth. Enzymol.*, 52, 1978: 372–377.
SAFE, S. – MASON, G. – SAWYER, T. – ZACHAREWSKI, T. – HARRIS, M. – YAO, C. – KEYS, B. et al.: Development and validation of *in vitro* induction assays for toxic halogenated aromatic mixtures: A review. *Toxicol. Environ. Hlth.*, 5, 1989: 757–775.

Arrived on 4th April 1995

Contact Address:

RNDr. Miroslav Machala, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudecova 70, 621 32 Brno, Czech Republic
Tel. 05/41 32 12 41, fax 05/41 21 12 29

FINDINGS OF CRYPTOSPORIDIA AND OF OTHER ENDOPARASITES IN HEIFERS IMPORTED INTO THE CZECH REPUBLIC

NÁLEZY KRYPTOSPORIDIÍ A DALŠÍCH ENDOPARAZITŮ U JALOVIC DOVÁŽENÝCH DO ČESKÉ REPUBLIKY

I. Pavlásek

National Veterinary Institute, Praha, Czech Republic

ABSTRACT: Totally 887 heifers of Holstein-Friesian breed mostly in late pregnancy imported to the Czech Republic from France (597), Germany (89), Denmark (181) and Holland (20) were examined coprologically from September 1993 to March 1995 in the parasitological laboratory of the National Veterinary Institute (NVI), Prague. Feces were sampled individually, rectally, always on days 1–3 following importation from heifers housed in particular quarantine sheds. In compliance with presently valid veterinary regulations, all animals were examined for liver fluke disease (fascioliasis) and lungworm. Moreover, 634 heifers were submitted to qualitative coprological examination aimed at revealing the presence of cysts and oocysts of protozoa, eggs of taenias and nematodes of gastrointestinal tract. The method according to Pavlásek (1991), especially designed for proving oocysts of the genus *Cryptosporidium*, was applied in all fecal specimens delivered to the SVI from animals in quarantine ($N = 887$). From trematodes, 12 heifers imported from France were positive for eggs of *Fasciola hepatica* and in other two animals eggs of the genus *Paramphistomum* were found. None of the imported heifers showed lungworm disease. Summary of data on occurrence of endoparasites gained during qualitative examination of samples of feces taken from heifers imported from France, Germany and Denmark is presented in Tab. I. Parasitologically, 91.2 to 100% of imported animals were positive. Taeniasis (the genus *Moniezia*) was detected in 2.8% of heifers imported from France and in 9.8% animals from Denmark. Protozoal parasites were found in 58.8% (Denmark) and 92.8% (Germany) heifers. Coccidial oocysts most frequently observed represented the genus *Eimeria* (*E. bovis*, *E. auburnensis* and *E. zuernii*). Gastrointestinal nematodes of nine genera were found in 72.5 to 80.8% of heifers. The most frequent findings were genera *Ostertagia*, *Haemonchus* and *Trichostrongylus*. Oocysts, morphologically identical with *Cryptosporidium muris* Tyzzer (1907), 1910, were detected in 4.5% of heifers imported into the Czech Republic from France and in 7.9% of those from Germany. In view of the fact the imported heifers were sampled always on days 1–3 of their quarantine following their importation it is quite impossible, considering the development of the protozoon, they could become infected just in the territory of the Czech Republic. Therefore, with the highest probability, our findings of *C. muris*-like oocysts in heifers are of priority importance for France and Germany because in the literature these countries do not report cattle as a host of this protozoon. We have found out 57.9% out of 19 animals positive for *C. muris* on one farm of a private cattle keeper. On the basis of a long-term monitoring of three dairy cows and one bull, the duration of the patent period is longer than 18 months, while we do not know precise onset of shedding oocysts of the protozoon in these naturally infected animals. Furthermore, the paper discusses the need of future studies of *C. muris* from the point of view of spread, pathogenicity, specificity and host spectrum. The author proposes and recommends obligatory examinations of imported animals with special attention paid to presence of coccidia of the genus *Cryptosporidium* in order to maintain, with respect to their zoonotic character, these protozoal infections under proper control. At present the parasitological laboratory of the NVI in Prague has a bank of oocyst isolates of the *C. muris* type from cattle (*Bos taurus*), from desert hamsters (*Phodopus roborovskii* Satunin, 1903) and camels (*Camelus bactrianus*). Experimental infections is permanently kept in laboratory mice following successful transmission from desert hamsters.

Cryptosporidium muris-like oocysts; heifers; cattle; desert hamsters; camels; endoparasites; prevalence

Hlavním cílem tohoto sdělení je informovat o prioritních nálezech kryptosporidie, jejíž oocysty jsou morfologicky identické s druhem *Cryptosporidium muris* Tyzzer (1907), 1910 u jalovic v období jejich ustájení

v karanténě na území České republiky po importu ze zahraničí. Práce obsahuje rovněž stručný komentář a přehled o prevalenci endoparazitů zjištěných u dovážených zvířat.

V parazitologické laboratoři Státního veterinárního ústavu (SVÚ) v Praze bylo v období od září 1993 do března 1995 koprologicky vyšetřeno celkem 887 většinou vysokobřezích jalovic plemene holštýnskofríského dovezeného do České republiky z Francie (597), z Německa (89), z Dánska (181) a z Nizozemska (20). K parazitologickému vyšetření byly od jalovic odebírány vzorky výkalů v jednotlivých karanténách stájejích individuálně, rektálně, vždy 1 až 3 dny po jejich importu. V souladu s doposud platnými veterinárními předpisy bylo u všech jalovic provedeno vyšetření na motolíčnatost a plicní červivost metodou podle Chyly a modifikací podle Baermanna (Veterinární laboratorně metodiky, Parazitologie, str. 81–82, 93, Bratislava, 1989). Navíc bylo u 634 jalovic (tab. I) uskutečněno

kvalitativní koprologické vyšetření k průkazu cyst a oocyst prvoků, vajíček tasemnic a hlístic gastrointestinálního traktu koncentrační, flotačně-centrifugační metodou podle B r e z y (1957). Všechny vzorky výkalů zaslané na SVÚ od zvířat v karanténě (887) byly dále vyšetřeny metodou podle P a v l á s k a (1991), která je určena speciálně k průkazu oocyst kokcií rodu *Cryptosporidium*.

Z trematodů byla u 12 jalovic z Francie nalezena vajíčka *Fasciola hepatica* a u dvou dalších zvířat vajíčka rodu *Paramphistomum*. Plicní červivost nebyla u žádných z importovaných jalovic zjištěna.

Parazitologicky bylo 91,2 % dovezených zvířat pozitivních. Tasemnicemi rodu *Moniezia* bylo nakaženo 2,8 % jalovic dovezených z Francie a 9,8 % zvířat

I. Souhrnný přehled výskytu endoparazitů u jalovic dovezených do České republiky – Summary of data on occurrence of endoparasites in heifers imported into the Czech Republic

				Země ¹		
				Francie ²	Německo ³	Dánsko ⁴
				počet pozitivních/procento ⁵		
Celkový počet vyšetřených jalovic ⁶				463 ⁺	69 ⁺⁺	102
Celkový počet pozitivních jalovic ⁷				449/96,9	69/100	93/91,2
Protozoa				392/84,7	64/92,8	60/58,8
Gestoidea				13/2,8	–	10/9,8
Nematoda				374/80,8	53/76,8	74/72,5
Protozoa	rod ⁸	Giardia	<i>Giardia</i> spp.	5/1,1	–	–
		Eimeria	<i>E. alabamensis</i>	5/1,1	–	–
			<i>E. auburnensis</i>	156/33,7	17/24,6	23/22,5
			<i>E. bovis</i>	279/60,3	45/65,2	41/40,2
			<i>E. brasiliensis</i>	18/3,9	1/1,4	2/1,9
			<i>E. bukidnonensis</i>	23/4,9	1/1,4	1/0,9
			<i>E. ellipsoidalis</i>	8/1,7	4/5,8	–
			<i>E. subspherica</i>	5/1,1	15/21,7	1/0,9
			<i>E. zuernii</i>	123/26,2	33/47,8	20/19,6
		Cryptosporidium	<i>C. muris</i>	21/4,5	7/7,9	–
Isospora	<i>Isospora</i> spp.	–	1/1,4	1/0,9		
Cestoidea	rod ⁸	Moniezia	13/2,8	–	10/9,8	
Nematoda		<i>Trichocephalus</i>	9/1,9	6/8,7	1/0,9	
		<i>Capillaria</i>	4/0,9	5/7,2	1/0,9	
		<i>Strongyloides</i>	10/2,2	–	–	
		<i>Oesophagostomum</i>	68/14,7	6/8,7	1/0,9	
		<i>Trichostrongylus</i>	195/42,1	22/31,9	8/7,8	
		<i>Ostertagia</i>	252/54,4	29/42,0	41/40,2	
		<i>Cooperia</i>	9/1,9	–	6/5,9	
		<i>Haemonchus</i>	184/39,7	30/43,5	33/32,5	
		<i>Nematodirus</i>	5/1,1	–	5/4,9	

+ dalších 134 a ++ 20 vzorků výkalů od dovezených jalovic v karanténě bylo cíleně vyšetřeno pouze na přítomnost oocyst kryptosporidií metodou podle P a v l á s k a (1991 – + other 134 and ++ 20 fecal samples from heifers in quarantine following importation were purposefully examined only for presence of oocysts of cryptosporidia by the method according to P a v l á s e k (1991)

¹country, ²France, ³Germany, ⁴Denmark, ⁵number of positive heifers (percentage), ⁶total number of heifers examined, ⁷total number of positive heifers, ⁸genus

řat z Dánska. Parazitickými prvky čtyř rodů bylo infikováno 58,8 % (z Dánska) až 92,8 % (z Německa) jalovic. Hlístice gastrointestinálního traktu devíti rodů byly zjištěny v 72,5 až 80,8 % jalovic (tab. I). Ve stručnosti lze uvést, že z protozoí byly u jalovic nejčastěji detekovány oocysty *Eimeria bovis* (40,2–60,3 %), *E. auburnensis* (22,5–33,7 %) a *E. zuernii* (19,6–47,8 %). Výrazně vyšší oproti zbývajícím druhům kokciidií rodu *Eimeria* byly nálezy oocyst *E. subspherica* u jalovic z Německa (21,7 %). Sporadicky se vyskytovaly vysporulované oocysty rodu *Isospora*. Za zajímavé pokládáme nálezy cyst *Giardia* spp. (1,1 %) u jalovic dovezených z Francie.

Z nematodů se nejčastěji vyskytovaly hlístice rodů *Ostertagia* (40,2–54,4 %), *Haemonchus* (32,4–43,5 %) a *Trichostrongylus* (7,8–42,1 %).

K doposud uvedeným nálezům lze obecně shrnout, že spektrum prvků reprezentované u importovaných jalovic kokciidiemi rodu *Eimeria* a *Isospora* je v podstatě stejné jako u skotu v našich podmínkách. Cysty *Giardia* spp. se velmi často u nás vyskytují především u telat a mladého skotu (Pavlašek, 1984, 1989). Také výčet zjištěných nematodů odpovídá helmintofauně u našich zvířat, za důležité je možné považovat zjištění nákaz motolicemi rodu *Paramphistomum* u jalovic dovezených z Francie.

Za velmi významné pokládáme naše zjištění o nálezech oocyst kokciidií morfologicky identických s druhem *C. muris* (z myši) u jalovic dovezených z Francie a Německa. Ve vědecké ani v odborné parazitologické a veterinární literatuře pro nás dostupné doposud není zmínka o výskytu této kryptosporidie u skotu v uvedené zemích. Na našem území byla v jednotlivých karanténních stájích zvířata vyšetřena 1 až 3 dny po importu. Z hlediska vývoje tohoto prvka je zcela vyloučeno, že by k infekci jalovic došlo až v České republice.

V souvislosti s prvními případy spontánních nákaz skotu *C. muris* v České republice (v září 1993) jsme o některých biologických vlastnostech, lokalizaci endogenních vývojových stadií v infikovaném hostiteli apod. podrobněji informovali v minulém roce (Pavlašek, 1994). V roce 1994 jsme vůbec poprvé detekovali oocysty *C. muris* a žaludeční spontánní formu kryptosporidiové infekce u křečků – *Phodopus roborovskii* Satunin, 1903 (Pavlašek a Lávička, 1995). Poprvé na našem území byly oocysty podobné druhu *C. muris* zjištěny v roce 1995 také u velbloudů – *Camelus bactrianus* (Pavlašek, 1995).

Dosavadní znalosti o rozšíření kryptosporidie *C. muris*, jejíž vývoj probíhá v žaludečních žlázách, o její patogenitě, specifitě, hostitelském spektru apod. jsou velmi sporadické. K dispozici je zatím kolem jedné desítky publikací. Prevalenci oocyst podobných *C. muris* u skotu v USA zjišťoval Anderson (1991). Tato práce je v podstatě jediná, s níž lze naše nálezy porov-

nat. Tento autor ve spolupráci s veterinárními lékaři provedl depistážní studii v chovech skotu u typu mléčného (ve 150 farmách) a žírného (ve 30 chovech) ve 14 různých státech na východě a západě USA. Ze všech lokalit vyšetřili celkem 95 874 vzorků výkalů a zjistili, že pozitivních bylo 68 % u mléčného typu skotu a 80 % chovu žírného skotu. Celková prevalence pozitivních vzorků činila 4,7 %. Autor však zjistil značné rozdíly v pozitivitě mezi chovy jednotlivých států. V jednom mléčném chovu ve státě Connecticut bylo např. pozitivních 31 % dojnic. Autor kromě jiného dále uvádí, že relativně vyšší byla prevalence prvka u plemene Holstein.

V našem vyšetřěném materiálu byla celková prevalence oocyst podobných druhu *C. muris* u jalovic z Francie 4,5 % a u zvířat z Německa 7,9 %. Tento výsledek je tedy v souladu s údaji Andersona (1991) stejně, jako i naše zjištění, že na jedné farmě soukromého chovatele bylo z 19 zvířat na přítomnost oocyst tohoto prvka 57,9 % pozitivních.

Význam a patogenita *C. muris* na rozdíl od druhu *C. parvum* není doposud jednoznačně stanovena. Dostatečně není zatím prostudována ani jeho hostitelská specifita, což je velmi důležité z hlediska možnosti přenosu nákaz na další vnímavé hostitele v životním prostředí, člověka nevyjímaje. Zvířata infikovaná typem kryptosporidie *C. muris* totiž vylučují svými výkaly do vnějšího prostředí denně statisíce až milióny oocyst, a to po velmi dlouhé období. Podle údajů Andersona (1991) i našich dlouhodobých sledování tří dojnic a jednoho býka vyplývá, že patentní perioda trvá již déle jak 1,5 roku. Domníváme se, že je třeba dále pokračovat intenzivněji ve studiu kryptosporidie druhu *C. muris*, která byla poprvé popsána u laboratorních myši již před 88 lety, a mít stále z hlediska epizootologického i epidemiologického její výskyt pod kontrolou. Protože kryptosporidioza je WHO zařazena mezi zoonózy doporučujeme aby skot, případně i jiná zvířata dovážená do České republiky z různých zemí světa byla i na přítomnost kokciidií rodu *Cryptosporidium* cíleně a povinně vyšetřována.

Na závěr tohoto sdělení uvádíme, že v parazitologické laboratoři SVÚ v Praze jsou v současné době depozovány izoláty oocyst typu *C. muris* od skotu (*Bos taurus*), křečků (*Phodopus roborovskii* Satunin, 1903) a velbloudů (*Camelus bactrianus*). Permanentně je udržována laboratorní infekce u myši po úspěšném přenosu náky z křečků.

Poděkování

Autor práce si dovoluje vyslovit poděkování za obětavou spolupráci na překladu rozšířeného souhrnu do angličtiny Mgr. Z. Polákoví, pracovníku Státního veterinárního ústavu v Praze.

LITERATURA

- ANDERSON, B. C.: Prevalence of *Cryptosporidium muris*-like oocysts among cattle populations of the United States: Preliminary report. J. Protozool., 38, 1991: 14–15.
- BREZA, M.: Niekoľko praktických poznatkov a námětov k helmintokoprolologickej diagnostike. Helminológia, 1, 1957: 57–63.
- PAVLÁSEK, I.: First record of *Giardia* spp. in calves in Czechoslovakia. Folia Parasitol. (Praha), 31, 1984: 225–226.
- PAVLÁSEK, I.: Nejvýznamnější endoparazitární nákazy hospodářských zvířat. I. Kryptosporidie. II. a III. *Giardia* a smíšené parazitární nákazy. [Doktorská dizertace.] České Budějovice 1989. 599 s. – Parazitologický ústav ČSAV.
- PAVLÁSEK, I.: První případy zjištění spontánní nákazy skotu *Cryptosporidium muris* Tyzzer (1907), 1910 v České republice. Vet. Med. – Czech, 39, 1994: 279–286.
- PAVLÁSEK, I. – LÁVIČKA, M.: První nálezy spontánní žaludeční kryptosporidiové infekce u křečičků (*Phodopus roborovskii* Satunin, 1903). Vet. Med. – Czech, 40, 1995: 261–263.
- PAVLÁSEK, I.: Využití glycerínu při detekci oocys *Cryptosporidium parvum* a *C. baileyi* v trusu savců a ptáků. Veter. Med. (Praha), 36, 1991: 255–256.
- PAVLÁSEK, I.: Kryptosporidie u savců. Laboratorní metody detekce a diferenciální diagnostika. Veterinářství, 42, 1995: 265–271.

Došlo 5. 4. 1995

Kontaktní adresa:

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

POKYNY PRO AUTORY

Časopis uveřejňuje referáty vědecké práce, krátká sdělení a výběrově i přehledné referáty, tzn. 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. Časopis zveřejňuje i názory, postřehy a připomínky čtenářů ve formě kurzívy, glosy, dopisu redakci, diskusního příspěvku, kritiky zásadního článku apod., ale i zkušenosti z cest do zahraničí, z porad a konferencí.

Autoři jsou plně odpovědní za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. K práci musí být přiloženo prohlášení 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. Redakce přijímá práce imprimitované vedoucím pracoviště nebo práce s prohlášením všech autorů, že se zveřejněním souhlasí.

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

Vlastní úprava práce rukopisu má odpovídat státní normě ČSN 88 0220 (formát A4, 30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, mezi řádky dvojitě mezery). K rukopisu je vhodné přiložit disketu s prací pořízenou na PC v některém textovém editoru, nejlépe v T602. Tabulky, grafy a fotografie se dodávají zvlášť, nepodlepují se. Na všechny přílohy musí být odkazy v textu.

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

Název práce (titul) nemá přesáhnout 85 úhozů a musí dát přesnou představu o obsahu práce. Jsou vyloučeny podtitulky článků.

Krátký souhrn (Abstrakt) musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo v práci, a má obsahovat základní číselné údaje včetně statistických hodnot. Nemá překročit rozsah 170 slov. Je třeba, aby byl napsán celými větami, nikoliv heslovitě.

Rozšířený souhrn prací v češtině nebo slovenštině je uveřejňován v angličtině, měly by v něm být v rozsahu cca 1–2 strojopisných stran komentovány výsledky práce a uvedeny odkazy na tabulky a obrázky, popř. na nejdůležitější literární citace. Je vhodné jej (včetně názvu práce a klíčových slov) dodat v angličtině, popř. v češtině či slovenštině jako podklad pro překlad do angličtiny.

Literární přehled má být krátký, je třeba uvádět pouze citace mající úzký vztah k problému. Tato úvodní část přináší také informace, proč byla práce provedena.

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 a způsob hodnocení výsledků.

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

Diskuse obsahuje zhodnocení práce, diskutuje se o možných nedostatecích a výsledky se konfrontují s údaji 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 prvního 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.

Klíčová slova mají umožnit vyhledání práce podle sledovaných druhů zvířat, charakteristik jejich zdravotního stavu, podmínek jejich chovu, látek použitých k jejich uvolnění apod. Jako klíčová slova není vhodné používat termíny uvedené v nadpisu práce.

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

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 or a longer summary. The journal also publishes readers' views, remarks and comments in form of a text in italics, gloss, letter to the editor, short contribution, review of a major article, etc., and also experience of stays in foreign countries, meetings and conferences.

The authors are fully responsible for the originality of their papers, for its subject and formal correctness. The authors shall make a written declaration that their papers have 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 editors accept papers approved to print by the head of the workplace or papers with all the authors' statement they approve it to print.

The extent of original papers 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). A PC diskette should be provided with the paper, written in an editor program, preferably T602. 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 and it should provide a clear-cut idea of the paper subject. Subtitles of the papers are not allowed either.

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

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. This introductory section also provides information why the study has been undertaken.

Review of literature should be a short section, containing only literary citations with close relation to the treated problem.

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 and the method of result evaluation.

In the section **Results**, which is the core of the paper, 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.

Key words should make it possible to retrieve the paper on the basis of the animal species investigated, characteristics of their health, husbandry conditions, applied substances, etc. The terms used in the paper title should not be used as keywords.

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, telephone and fax number, or E-mail.

VETERINARY MEDICINE – CZECH

Volume 40, No. 10, October 1995

CONTENTS

Trem l F., Nesňalová E.: Leptospirosis in slaughter cattle – serologic and bacteriologic examinations..	305
Rada V., Rychlý I.: The effect of <i>Lactobacillus salivarius</i> administration on coliforms and enterococci in the crop and caeca of chicken broilers	311
Lauková A., Marounek M., Boďa K.: Characteristics of enterococci and staphylococci isolated from the crop and caecum of Japanese quails exposed to microgravity conditions	317
Plachý P., Juriš P.: Use of a polyurethane carrier for assessing the survival of helminth eggs in liquid biological sludges	323
Machala M., Mátlová L., Nezveda K., Turánek J., Hořavová P., Granátová M., Nevoránková Z.: Comparison of mouse and chick embryo liver and hepatoma cell lines as model systems used for enzymological estimation of toxicity potentials of organic pollutants.....	327
INFORMATION – STUDIES – COMMUNICATIONS	
Pavlásek I.: Findings of Cryptosporidia and of other endoparasites in heifers imported into the Czech Republic	333

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 40, č. 10, Říjen 1995

OBSAH

Trem l F., Nesňalová E.: Leptospiróza jatečného skotu – sérologické a bakteriologické vyšetření	305
Rada V., Rychlý I.: Vliv aplikace <i>Lactobacillus salivarius</i> na koliformní bakterie a enterokoky ve voletí a slepých střevech kuřecích brojlerů	311
Lauková A., Marounek M., Boďa K.: Charakteristika enterokoků a stafylokoků – izolátů z hrvořa a zo slepého čreva Japonských prepelců vystavených gravitačním podmínkám.....	317
Plachý P., Juriš P.: Použití polyuretanového nosiča při hodnocení přežívání vajčích helmintů v tekutých biologických kaloch	323
Machala M., Mátlová L., Nezveda K., Turánek J., Hořavová P., Granátová M., Nevoránková Z.: Srovnání jater myši a kuřecího embrya a hepatoma buněčných linií jako modelových systémů pro enzymologické stanovení potenciálů toxicity organických polutantů.....	327
INFORMACE – STUDIE – SDĚLENÍ	
Pavlásek I.: Nález kryptosporidií a dalších endoparazitů u jalovic dovážených do České republiky	333

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, Bf. Nejedlých 245, 266 01 Beroun, tel.: 0311/229 59 ● Tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1995

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