

ÚZPI

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

8

VOLUME 41 (LXIX)
PRAHA
AUGUST 1996
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., Reinfelden, Switzerland

Arnost Cepica, DVM., PhD., Associate Professor (Virology/Immunology), Atlantic Veterinary College, U.P.E.I., Charlottetown, Canada

RNDr. Milan Fránek, CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

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

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

Doc. MVDr. RNDr. Petr Hořín, CSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. František Kovářů, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MUDr. M. V. Nermut, PhD., DSc. (h. c.), National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom

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

Prof. RNDr. Václav Suchý, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

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

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

Editor-in-Chief – Vedoucí redaktorka

Ing. Zdeňka Radošová

Cíl a odborná náplň: Časopis Veterinární medicína uveřejňuje původní vědecké práce a studie typu review ze všech oblastí veterinární medicíny 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 41 vychází v roce 1996.

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 1996 je 492 Kč.

Aims and scope: The journal Veterinární medicína original publishes papers and reviews from all fields of veterinary medicine 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 41 appearing in 1996.

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 receipt.

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 1996 is 115 USD (Europe), 120 USD (overseas).

SUSCEPTIBILITY AND REACTIVITY OF SHEEP TO *TRICHINELLA SPIRALIS* INFECTION*

VNÍMAVOSŤ A REAKTÍVNY PREJAV OVIEC K INFIKOVANIU *TRICHINELLA SPIRALIS*

A. Pajerský¹, O. Tomašovičová¹, J. Kinčeková¹, P. Zubrický², J. Koreň²

¹ Parasitological Institute, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic

² State Veterinary Institute, Prešov, Slovak Republic

ABSTRACT: Susceptibility and reactive manifestation to *Trichinella spiralis* infection were studied in atypical hosts (sheep) for the period of 247 days. Sheep produced anti-*Trichinella* antibodies as early on Day 11 (low titer 1 : 200), with maximum reached at Day 35 (titer 1 : 800). From Day 42 the antibody level was declining with a negative result of examination on Day 70. Mice exhibited anti-*Trichinella* antibodies only on Day 32 (titer 1 : 200). This level was rising, reaching high titer (1 : 1 600) on Day 56. This antibody level persisted until Day 156. In the following period, a rapid decrease in the titer was observed (Graph). On Day 32, *T. spiralis* larvae in sheep were present in all groups of the muscles examined. The highest larval counts during the entire experiment were detected in the masseter. The initially high counts in the diaphragm and tongue were reduced to only 1/4 or 1/10 at the end of the experiment. In mice, the larvae occurred evenly throughout the entire experiment (Tab. 1). The first appearance of a capsule around the *T. spiralis* larva in muscles was observed on Day 32 *p. i.* No cell response was detected around the capsule (Fig. 1). Neither was any response observed around necrotizing larvae, even though the surrounding myofibrils were caused to die off (Fig. 2). Certain differences in the degree of myofibril degradation by larvae were evident as early as on Day 32. The least damaged myofibrils were those in the masseter, tongue and diaphragm. This finding correlates with the histological recovery of a different number of necrotized larvae from the individual muscle groups examined. Fresh blood extravassations around larvae were observed on Day 59 (Fig. 3). They could be caused by the migration of larvae to a parasitation site. Live uncapsulated larvae were also found on Day 115 *p. i.* (Fig. 4). An increased cellular presence around some larvae was observed on Day 84. The larvae surrounded by lymphocytes consequently died off, those without lymphocytic responses formed capsules and survived (Fig. 5). The necrotizing larvae were subject to a powerful phagocytic process, presented by histiocytes, forming multinuclear symplasms (Fig. 6). On Day 11 *p. i.*, larvae inside a capsule were dying off as well. The initial stage of larval necrosis in a capsule is also accompanied by an increased lymphocytic response (Fig. 7). The condition of larvae in capsules and the cellular unresponsiveness as late as on Day 247 indicate the long-lasting viability of the larvae. The capsules surrounding *T. spiralis* larvae in mice were distinctly seen as early as on Day 32 *p. i.* Lymphocytic aggregations around the capsule were observed throughout the entire experiment (247 days) – Fig. 8.

Trichinella spiralis; sheep; larval count; reactive manifestation; lymphocytes; histiocytes

ABSTRAKT: Zisťovala sa vnímavosť a reaktívny prejav atypických hostiteľov (oviec) k infekcii *Trichinella spiralis* počas 247 dní. Po infikovaní 7 000 larvami boli zistené antitrichinelové protilátky na 11. deň *p. i.* s maximom na 35. deň. Od 42. dňa hladina protilátok klesala až na nulovú hodnotu na 70. deň. Larvy *T. spiralis* sa na 32. deň nachádzali vo všetkých vyšetrovaných skupinách svalov oviec. Najvyššie počty boli počas celého pokusu v žuvacích svaloch, brániči a v jazyku. Výskyt lariev však pretrvával v priebehu celého pokusu. Larvy *T. spiralis* vytvárali (od 32. dňa) vo svalovom tkanive ovce kapsulu, ktorá nestimulovala celulárnu aktivizáciu. Vyvolávali ju len odumierajúce larvy a bola prezentovaná histiocytárnymi bunkami a lymfocytmi. Prítomnosť lymfocytov poukazovala na životaschopnosť lariev. Histiocytárne bunky fagocytovali odumreté larvy a okolité svalové vlákna. Najmenej lariev odumieralo v žuvacích svaloch, brániči a jazyku. Zistená životaschopnosť lariev a nereaktivnosť hostiteľských tkanív aj na 247. deň, vytvára predpoklad, že ovca je z hľadiska prenosu lariev *T. spiralis* potenciálny prameň infikovania.

Trichinella spiralis; ovca; početnosť lariev; reaktívny prejav; lymfocyty; histiocyty

* The paper was partly supported by the Slovak Grant Agency for Science (Grant No. 2/1362/95).

INTRODUCTION

Atypical hosts play a very important role in the spread of trichinellosis. Trichinellous epidemics due to the consumption of horse meat were reported by Bellani et al. (1976), Soule et al. (1988) etc. Besonov (1981) reported a natural *T. spiralis* infection in reindeer. Experimental infections of sheep with different species of the genus *Trichinella* have been successfully carried out by Smith and Snowden (1989) with *T. nativa* and *T. spiralis*, Alkarmi et al. (1990) with *T. spiralis* and *T. pseudospiralis*, Tomášovičová et al. (1991) with *T. spiralis* and Medvedová et al. (1993) with *T. pseudospiralis*. This study followed the susceptibility of atypical hosts – sheep – to *T. spiralis* infection and pathomorphological changes in host tissues.

MATERIALS AND METHODS

Source of *Trichinella spiralis*

T. spiralis was isolated from wild boar in Vladivostok in 1982 (provided to us by Britov). Trichinellae were maintained by passing through ICR mice at 6–7 month intervals.

Experimental animals

Five lambs of the Improved Wallachian breed, 4 months old and comparable in weight, were orally infected with a single dose of 7 000 *T. spiralis* larvae in 0.25 agar suspension using a drug applicator. Twenty SPF mice of ICR strain, each orally infected with 150 *T. spiralis* larvae, served as control. The mice were kept on a standard diet, with water freely available, at a 12 hr light and 12 hr dark regimen.

Serological methods

Sera from sheep and mice were tested for anti-*Trichinella* antibodies by ELISA on Days 0, 3, 7, 11, 21

and further in 14-day intervals during the whole experiment (Day 247) and on the days when the animals were sacrificed.

Counting of *T. spiralis* larvae

The larvae in sheep muscles were counted by using 25–50g samples taken from nine groups of muscles (Popesko, 1968). For the larval count in mice the whole carcass was used. The samples were examined using an artificial digestive solution – pepsin, hydrochloric acid (Velebný et al., 1992). The numbers of larvae were counted on an electronic apparatus Coulter Counter (Velebný et al., 1979). Samples were taken on days 32, 59, 84, 115 and 247 post mortem. Sheep were slaughtered at the Košice Abattoir.

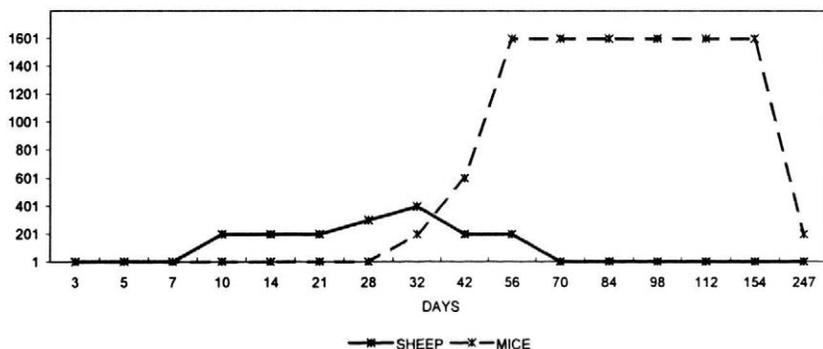
Morphological methods

For the histological examination of sheep muscles 3 excisions were taken from each of the nine muscle groups studied. Three muscle excisions were also taken from each of control animals. One excision was fixed in Bouin's fixative, the second in 10% neutral formol and both were embedded in paraffin. The third excision was frozen in petroleam ether and processed on a cryostat. Histological sections, 5–7 μ m thick, were stained with hemotoxylin-eosin (Vacek, 1990).

RESULTS

Serological observations

Anti-*Trichinella* antibodies in sheep were recorded as early as on Day 11 *p. i.*, with a low titre of 1 : 200. The antibody level was increasing to reach maximum on Day 35, with titre 1 : 800. From Day 42 the antibody level was decreasing until Day 70, when a negative result was obtained. Anti-*Trichinella* antibodies in mice were detected only on Day 32 *p. i.*, with a low titre of 1 : 200. Subsequently the antibody level was rising, reaching a high titre (1 : 1 600) on Day 56,



Dynamics of anti-*Trichinella* antibody formation after experimental infection of sheep and mice with *T. spiralis*

Muscles	Days <i>p. i.</i>				
	32	59	84	115	247
<i>M. masseter</i>	1 782	2 181	1 759	2 607	1 911
Diaphragm	1 125	1 086	2 012	940	302
Tongue	1 308	568	1 110	1 074	234
<i>M. longissimus dorsi</i>	261	153	217	143	122
<i>M. deltoides</i>	487	531	477	387	268
<i>M. intercostales</i>	394	345	581	247	283
<i>M. extensor carpi radialis</i>	279	276	282	290	153
<i>M. biceps femori</i>	238	306	290	110	306
<i>M. fibularis longis</i>	160	234	239	106	256
Control mice	23 120	21 760	19 288	20 275	16 525

which persisted until Day 156. Thereafter the antibody titre declined rapidly (Graph).

Trichinella spiralis findings

On Day 32 *T. spiralis* larvae were present in all the muscles examined. The highest larval counts during the experiment were detected in the masseter muscles. The initially high counts in the diaphragm and tongue dropped as low as to 1/4 or 1/10 at the end of the experiment. Other muscles yielded considerably lower numbers of larvae, occurring throughout the entire experiment. They were viable, motile and morphologically unchanged. The balanced occurrence of larvae in mice was observed at all the intervals studied for the duration of the experiment (Tab. I).

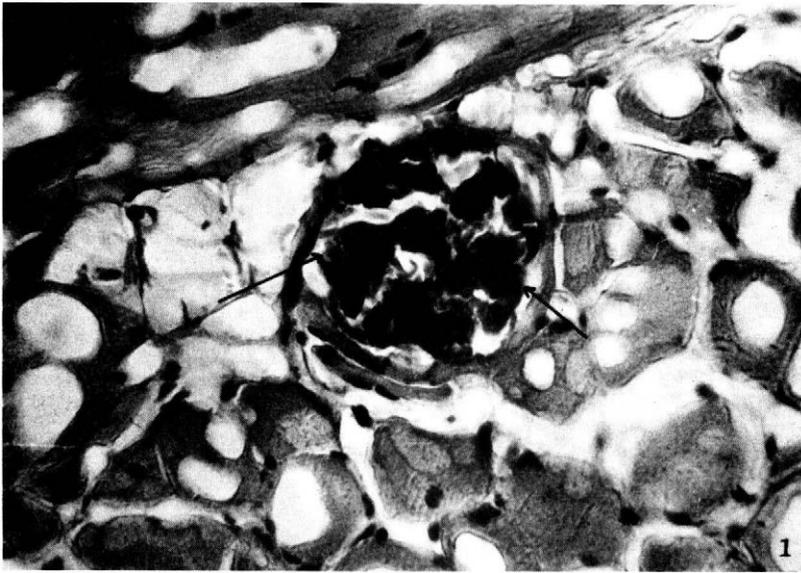
Morphological observations

The first indications of capsule formation around *T. spiralis* larva in sheep muscles were recorded on Day 32 *p. i.* The inside of the capsule contained degraded myofibrils. No cellular reaction was observed around the capsule (Fig. 1). This was neither observed around necrotizing larvae, despite the fact that they also caused necrosis of surrounding myofibrils. The ongoing necrotic process caused the pushing away of surrounding muscle fasciolas (Fig. 2). At this time we could notice certain differences in the rate of myofibrillar degradation due to larvae. The least damaged myofibrils were those in the masseter muscles, tongue and diaphragm. This finding correlates with the histologically detected different number of necrotized larvae in the particular muscle groups examined. While in the masseter muscles, tongue and diaphragm, with the highest number of larvae, one dead larva came per two live, in other muscles, with much lower larval counts, 3 dead larvae came per 2 live on average. A histological examination done on Day 59 also revealed fresh extravasations surrounding the larva (Fig. 3). They

might have been caused by larvae migrating to the parasitisation sites. Live, unencapsulated larvae were also observed on Day 115 *p. i.* (Fig. 4). At another time period, on Day 84, an increased occurrence of cells was observed around some larvae. Those were histiocytes and lymphocytes. The latter were indicative of the viability of larvae. While lymphocyte-surrounded larvae were subsequently dying, those without lymphocytic reaction formed capsules and survived (Fig. 5). The necrotizing larvae were subjected to a strong phagocytic process, represented by histiocytes forming multinuclear symplasms (Fig. 6). On Day 115 *p. i.*, larvae were dying also inside the capsules. The initial stage of larval necrosis in the capsule was also accompanied by an increased lymphocytic reaction (Fig. 7). Such cases were however sporadic. The condition of encapsulated larvae and the cellular non-reactivity observed as late as on Day 247 imply their long-lasting viability. The results of this study suggest that in terms of *T. spiralis* larvae transmission sheep is a potential source of infection. *T. spiralis* larvae in mice were surrounded by a distinct capsule as early as on Day 32 *p. i.* Throughout the experiment (247 days), lymphocytic aggregations were observed around the capsules (Fig. 8). Initially (Day 32), lymphoid cells were also found inside the capsule. Larvae survived unchanged for the duration of the experiment.

DISCUSSION

The existing data on individual trichinella species in animals suggest that *T. spiralis* is the most pathogenic species in most of the animals studied (Britov, 1982). Its high pathogenicity was also detected in atypical hosts such as horse, sheep and cattle (Bellani et al., 1976; Smith and Snowdon, 1989; Smith et al., 1990). The susceptibility of the sheep breed studied was experimentally evaluated not only on the number of larvae in muscles and on the host response but also on the host's reactivity evoked by



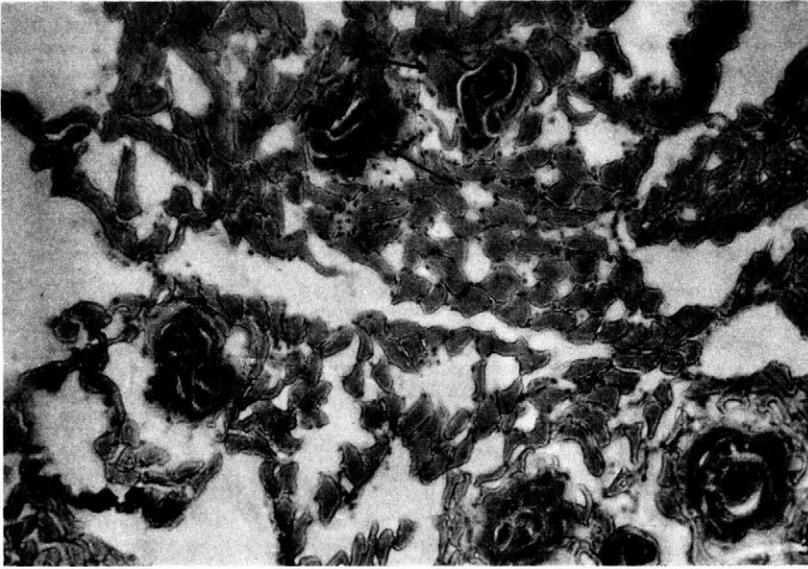
1. Degraded myofibrils in the peripheral portion of *T. spiralis* larva capsule in sheep muscles on Day 32 *p. i.* (orig. microphoto)



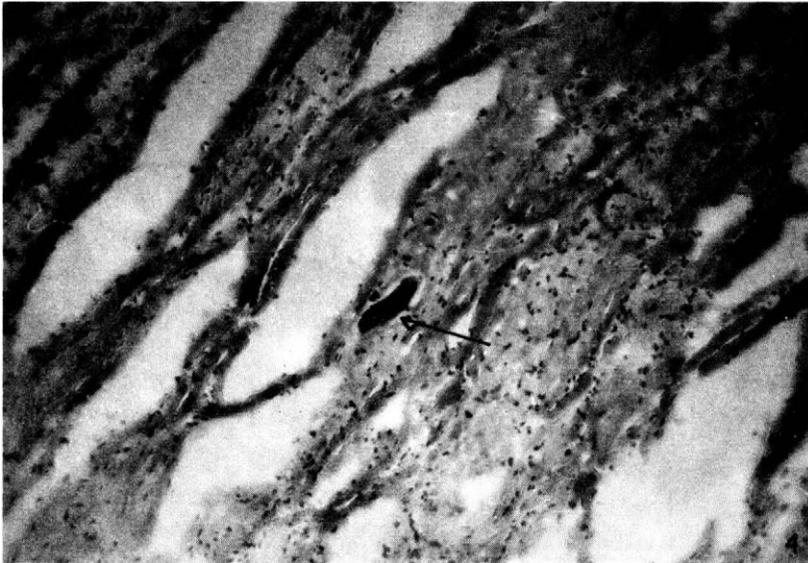
2. Necrotizing *T. spiralis* larvae in sheep muscles on Day 32 *p. i.* (orig. microphoto)

pathomorphological changes at the larvae localization site. With an infective larval dose used (7 000 larvae) per sheep, the first evidence of anti-*Trichinella* antibodies was observed on Day 11 *p. i.* Sheep of the Wallachian breed used in our experiment and Merino sheep (Tomašovičová et al., 1991) exhibited the presence of anti-*Trichinella* antibodies on the same day. Using more than a 3-fold infective dose, Smith and Snowdon (1989) reported the generation of the antibodies as early as on Day 7 *p. i.* The first emergence of antibodies was related with both low and very high infective doses. With the dose of 3 000 larvae,

Tmašovičová et al. (1991) reported the first occurrence of antibodies only on Day 19 *p. i.*, and with 160 000 larvae Smith and Snowdon (1989) on Day 21 *p. i.* A long-term tracing of anti-*Trichinella* antibodies showed their highest titre on Day 35 *p. i.*, with a subsequent decrease to the minimum on Day 70 *p. i.* The same course of the antibody generation in horses experimentally infected with *T. spiralis* larvae was reported by Polidori et al. (1989). The authors detected the highest antibody levels between week 5 and 7 *p. i.*, followed by a decrease to the minimum. This course of antibody generation may be considered as



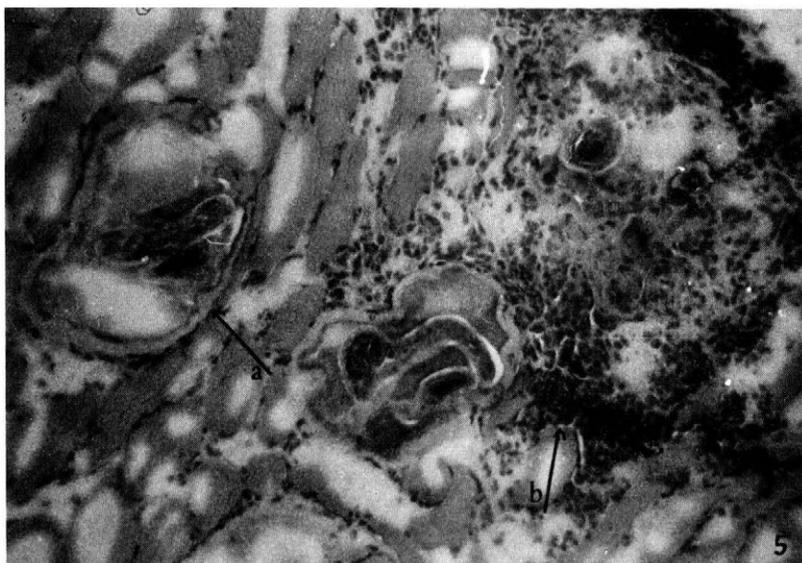
3. Extravasation around *T. spiralis* larvae in sheep muscles on Day 59 *p. i.* (orig. microphoto)



4. Live capsule-free *T. spiralis* larvae (marked by arrow) in sheep muscles on Day 115 *p. i.* (orig. microphoto)

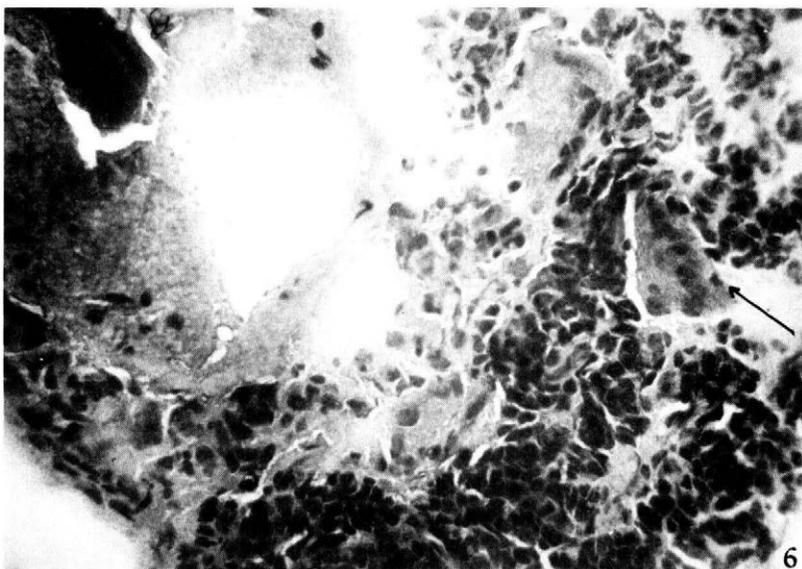
characteristic of trichinella infections in atypical hosts – farm animals. These results suggest that the disappearance of antibodies is one the characters for assigning animals to the group of atypical hosts. Thus it can be stated that the routine abattoir diagnosis of the possible trichinella occurrence in sheep and horses is possible only by using compression and digestion methods. For the exact diagnosis of the trichinellosis it is very important that samples be taken from predilected sites. Our experiments show that like in other animals also in sheep the distribution of larvae in the particular muscle groups varies considerably. During the entire

experiment (247 days) most larvae were found in the masseter muscles, which should therefore be recommended as a predilected site for collecting samples. High numbers of larvae also remained in the diaphragm and tongue as late as on Day 115. At the end of the experiment (Day 247) the larval count in those muscles was comparable with that detected in other muscle groups examined. Also in cattle (Smith et al., 1990) the highest mean percentage value for *T. spiralis* larvae was recorded from the masseter muscles. Our results are consistent with those of the authors who studied larval distribution in sheep (Alkarmi et al., 1990;



5. Varied cellular reaction to *T. spiralis* larvae in sheep muscles on Day 84 *p. i.*

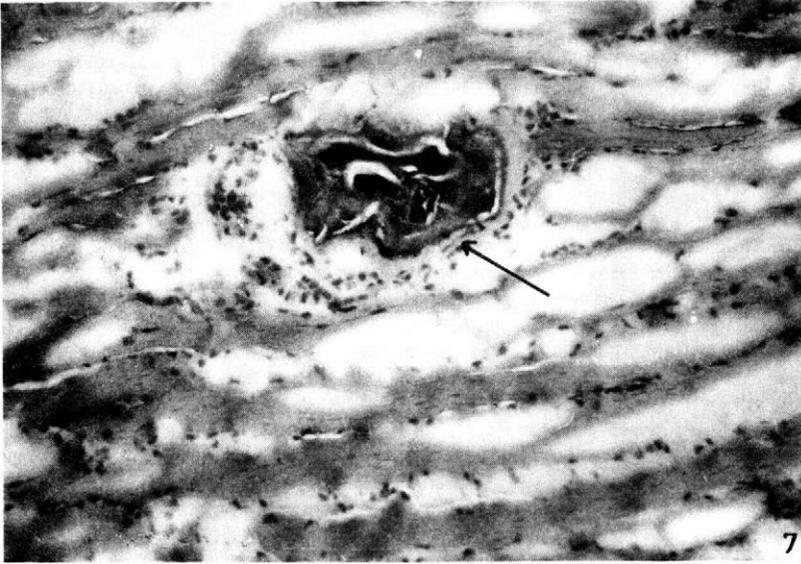
a - surrounding of larvae without lymphocytes, b - aggregation of lymphocytes around larvae (orig. microphoto)



6. Multinuclear symplasms (marked by arrow) surrounding necrotizing *T. spiralis* larvae in sheep muscles on Day 84 *p. i.* (orig. microphoto)

Tomášovičová et al., 1991). The masseter muscles or the muscles of tongue and diaphragm may therefore be considered as predilected sites and recommended for the postmortem examination for the presence of trichinellae. The varied distribution of larvae may be caused by different rates of larval necrosis going on in the particular muscle groups. Fewest dead larvae were detected in the masseter muscles, tongue and diaphragm. Such a „tolerance“ of these muscles of the larval presence was manifested by a milder damage of myofibrils. The animals used in our experiment (sheep, mouse) showed different cellular reactivity to the pres-

ence of larvae in the musculature. In mice during the entire experiment (247 days) encapsulated larvae were surrounded by emerging aggregations of inflammatory cells. The larvae remained viable and fluctuated considerably in number. In sheep, however, no aggregations of cells were observed around viable encapsulated larvae. Lymphocytic infiltrates started to form around the larvae which were soon to die. Aggregations of basophilic cells around *T. spiralis* in chicken muscles were reported by Hong-Keen et al. (1984). Remnants of necrotized larvae were eliminated by histiocytes, which formed multinuclear symplasms. A similar



7. Necrotized encapsulated *T. spiralis* larvae (marked by arrow) in sheep muscles on Day 115 *p. i.* (orig. microphoto)



8. Lymphocytic aggregations surrounding encapsulated *T. spiralis* larvae in mouse muscles on Day 247 *p. i.* (orig. microphoto)

image of trichinella lesions elimination in cattle was described by Smith et al. (1990). The epidemiological role of individual hosts in spreading trichinellosis is determined considerably by the time of larval survival in their muscles. Smith and Snowdon (1989) reported live *T. spiralis* larvae in sheep muscles as late as on Day 369 *p. i.* In our experiments such larvae were still found on Day 247 *p. i.* Also in horses, as atypical hosts of trichinellae, Bellani et al. (1976) detected larvae in the muscles on Day 180 *p. i.* Sheep may also be ranked with atypical hosts. They

may play the role in the formation of a sylvatic focus of trichinellosis during the time of their grazing. Such sheep, slaughtered by breeders on farmsteads at the end of the grazing season, may cause the occurrence of synanthropic foci. This presumption can also be supported by the finding that 156 beetle species of 9 families were „transitory hosts“ of trichinellosis (Böckeler, 1977). As mutton is usually consumed thermally treated, a direct transfer of trichinellosis to humans is not anticipated.

Acknowledgements

Our thanks are due to Dr. Britov for providing infective material and to the State Veterinary Institute Prešov for providing experimental sheep.

REFERENCES

- ALKARMI, T. – BEHBEHANI, K. – ABDOU, S. – OOI, H. K.: Infectivity, reproductive capacity and distribution of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* larvae in experimentally infected sheep. *Jpn. J. Vet. Res.*, 38, 1990: 139–146.
- BELLANI, L. – MANTOVANI, A. – PAMPIGLIONE, S. – FILIPPINI, J.: Observations on an outbreak of human trichinellosis in Northern Italy. In: KIM, CH. W. – PAWLOVSKI, Z. S. (eds.): *Trichinellosis*. University Press of New England 1976: 535–539.
- BESSONOV, A. S.: Changes in the epizootic and epidemic situation of Trichinellosis in the USSR. In: KIM, CH. W. – RUITENBERG, E. J. – TEPPEMA, J. S. (eds.): *Trichinellosis*. Chertsey, Surrey, Reedbooks Ltd Fox Lane North 1981: 365–368.
- BÖCKELER VAN W.: Forführende Untersuchungen von Käfern als experimentellen Transwirten von *Trichinella spiralis* (Oven 1835). *Zool. Anz. (Jena)*, 1/2, 1977: 42–76.
- BRITOV, V. A.: Agents of trichinellosis. Publ. House 1982: 272.
- HONG-KEAN, O. – YUZABURO, O. – MASAO, K. – MASASHI, O.: Innate resistance of chickens to *Trichinella spiralis* at the muscular phase of the parasite. *Jpn. J. Vet. Res.*, 32, 1984: 1–7.
- MEDVEĐOVÁ, M. – TOMAŠOVIČOVÁ, O. – PAJERSKÝ, A. – DUBINSKÝ, P.: Susceptibility and reactive manifestation of sheep to *Trichinella pseudospiralis* infection. In: CAMPBELL, W. C. – POZIO, E. – BRUSCHI, F. (eds.): *Trichinellosis*. Rome, Institutio Superiore di Santa Press 1993: 433–436.
- POLIDORI, G. A. – GRAMEZI, F. – PIERGILI FIORETTI, D. – FERRI, N. – RANUCCI, S. – MORETTI, A. – SCACCHIA, M. – BELLELI, C. – BALDELLI, B.: Experimental trichinellosis. In: TANNER, CH. E. – MARTINEZ-FERNANDEZ, A. R. – BOLAZ-FERNANDEZ, F. (eds.): *Trichinellosis*. Madrid, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas Press 1988: 268–274.
- POPEŠKO, P.: Atlas of Topographic Anatomy of Domesticated Animals. Part I, II and III. Bratislava, SVPL 1968.
- SMITH, H. J. – SNOWDON, K. E.: Experimental trichinosis in sheep. *Can. J. Vet. Res.*, 53, 1989: 112–114.
- SMITH, H. J. – SNOWDON, K. E. – FINLEY, G. G. – LAFLAMME, L. F.: Pathogenesis and serodiagnosis of experimental *Trichinella spiralis* native infections in cattle. *Can. J. Vet. Res.*, 54, 1990: 355–359.
- SOULE, C. – DUPONY-CAMET, J. – ANCELLE, T. – GILLET, J. P. – COLLOBERT, C.: *Trichinella spiralis* larvae in muscles of experimentally infected horses in relation to the antibody response. In: TANNER, CH. E. – MARTINEZ-FERNANDEZ, A. R. – BOLAS-FERNANDEZ, F. (eds.): *Trichinellosis*. Madrid, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas Press 1988: 275–280.
- TOMAŠOVIČOVÁ, O. – ČORBA, J. – HAVASIOVÁ, K. – RYBOŠ, M. – ŠTEFANČIKOVÁ, A.: Experimental *Trichinella spiralis* infection in sheep. *Vet. Parasit.*, 40, 1991: 119–126.
- VACEK, Z.: *Histológia a histologická technika*. Bratislava, Osveta 1990.
- VELEBNÝ, S. – ŠPALDONOVÁ, R. – ČORBA, J.: Electronic counting of *Trichinella spiralis* larvae. *Helminthologia*, 16, 1979: 199–206.
- VELEBNÝ, S. – TOMAŠOVIČOVÁ, O. – STPICZYNSKÁ, R.: Pharmacokinetics of ³H-cambendazole in mice in the course of experimental trichinellosis. *Helminthologia*, 29, 1992: 207–210.

Arrived on 15th January 1996

Contact Address:

MVDr. Anton Pajerský, CSc., Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovenská republika
Tel.: 095/633 14 11–13, fax 095/633 14 14

RESISTANCE TO ANTIBIOTICS IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AT EWE MASTITIS, IN SHEEP MILK AND ITS PRODUCTS

REZISTENCIA NA ANTIBIOTIKÁ U *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PRI MASTITÍDACH OVIEC, V OVČOM MLIEKU A VÝROBKOCH Z NEHO

Š. Šimko¹, P. Bartko²

¹District Veterinary Administration, Zvolen, Slovak Republic

²University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: A study of current resistance to antibiotics was conducted in 500 strains of *Staphylococcus aureus* isolated from ewes with clinical and latent mastitis, from sheep milk and products made from it (sheep lumpy cheese, bryndza cheese). A diffusion disk method was used to assay 14 kinds of antibiotics (AMP, BAC, CEF, ERY, GEN, CMP, KAN, LIN, OXA, PEN, RIF, SPI, VAN, TET) and one chemotherapeutic drug (COT). The highest resistance was observed in the cases of clinical mastitis (from 8% and 10% in COT and KAN to 68% and 69% in PEN and TET). Resistance significantly decreased in 13 kinds of antibiotics in the group of cases with latent mastitis (from 3% in SPI to 30% in PEN), it increased in KAN (13%) and COT (12%) only. Resistance also decreased in bulk samples of sheep milk; it was the highest in PEN (27%) and AMP (17%) and the lowest in CEF, RIF and SPI (5%). Sheep lumpy cheese and bryndza cheese are mostly made from unpasteurized milk. Resistance continued to decrease even in these dairy products. It ranged from 2% in CEF to 16% in OXA in sheep lumpy sugar, while it varied from 0% in SPI to 14% in TET in bryndza cheese. The results demonstrate that sheep milk and products made from it are not any important sources of antibiotic resistance of *S. aureus* in Central Slovakia.

sheep; mastitis; milk; lumpy cheese; bryndza cheese; *Staphylococcus aureus*; resistance

ABSTRAKT: Vykonala sa štúdia o súčasnej rezistencii na antibiotiká u 500 kmeňov *Staphylococcus aureus* izolovaných z klinických i latentných mastitíd oviec, ovčieho mlieka a výrobkov z neho (ovčí hrudkový syr, bryndza). Vyšetrenia sa vykonali difúznou diskovou metódou k 14 druhom antibiotík (AMP, BAC, CEF, ERY, GEN, CMP, KAN, LIN, OXA, PEN, RIF, SPI, VAN, TET) a jednému chemoterapeutiku (COT). Najvyššia rezistencia bola u klinických mastitíd (od 8 a 10 % u COT a KAN do 68 a 69 % u PEN a TET). V skupine latentných mastitíd rezistencia sa významne znížila u 13 druhov antibiotík (od 3 % u SPI do 30 % u PEN), zvýšila sa len u KAN (13 %) a COT (12 %). V bazénových vzorkách ovčieho mlieka rezistencia sa tiež znížila; najvyššia bola u PEN (27 %) a AMP (17 %) a najmenšia u CEF, RIF a SPI (5 %). Ovčí hrudkový syr a bryndza sa vyrábajú väčšinou z tepelne neošetreného mlieka. Aj u týchto mliečnych výrobkoch sa rezistencia ďalej znižovala. U ovčieho hrudkového syra sa pohybovala od 2 % u CEF do 16 % u OXA a v bryndzi od 0 % u SPI do 14 % u TET. Výsledky dokazujú, že ovčie mlieko a výrobky z neho nie sú dôležitým zdrojom antibiotickej rezistencie *S. aureus* na strednom Slovensku.

ovce; mastitidy; mlieko; hrudkový syr; bryndza; *Staphylococcus aureus*; rezistencia

ÚVOD

Príčiny vzniku zápalov mliečnej žľazy bahnic sú rôzne. Klinicky zjavné formy sú ľahko diagnostikovateľné a neuniknú pozornosti chovateľa, a tým aj terapii. Subklinické a latentné mastitidy sa však dajú odhaliť iba laboratórnym vyšetrením.

Závažným problémom pri mastitídach je skutočnosť, že dominantnou mikroflórou sú baktérie *S. aureus* (Jaššo, 1983; Trávníček, 1985; Šimko, 1992). Dojenie bahnic podozrivých z mastitíd do spoločnej galety spôsobí kontamináciu mlieka zdravých bahnic patogénnou mikroflórou, čo je o to závažnejšie, že ovčie mlieko sa v ďalšom procese spracovania tepelne

neošetruje (Grieger, 1990; Krčál ai., 1988) a prítomné stafylokoky i vyprodukovaný toxín v ovčom hrudkovom syre zostávajú v detekovateľnom množstve i dávke dostatočnej na vyvolanie stafylokokových enterotoxikóz (Petráš, 1985; Šimko, 1993).

Infekcie mliečnej žľazy patria k tým infekčným komplikáciám, ktoré vo väčšine prípadov vyžadujú podanie účinných protimikróbových (= antibiotiká a protimikróbové chemoterapeutiká) liečiv. Pri farmakoterapii infekčných chorôb je potrebné dodržiavať zásady antibiotickej politiky i protimikróbovej terapie (Šimko, 1983a, b, 1989).

Vzhľadom na to, že stredné Slovensko sa významne podieľa na chove oviec (Šimko, 1987), aj tým aj na

produkcii ovčieho mlieka a výrobkov z neho na Slovensku, vykonali sme štúdiu o súčasnej rezistencii na antibiotiká u najčastejšieho pôvodcu mastitíd oviec (*S. aureus*) izolovaného z klinických materiálov, ovčieho mlieka a výrobkov z neho.

MATERIÁL A METÓDA

Kmene *S. aureus* pochádzali od oviec s klinickými formami mastitíd doprevádzaných príznakmi zápalu vemena, alteráciou celkového zdravotného stavu, od uhynutých a nevyhnutne zabitých oviec. Vzorky sekrétov a punktátov z mliečnej žľazy sa odobrali do transportnej injekčnej striekačky pri dodržaní zásad vyšetrovania hnisu a punktátov (Duben a Hausner, 1986).

Mikrobiologická diagnostika *S. aureus* sa vykonala podľa Veterinárnych laboratórnych vyšetrovacích metódik (1975).

Kmene *S. aureus* z bazénových vzoriek ovčieho mlieka (STN 57 0510) ovčieho hrudkového syra (STN 57 1138) a bryndze (STN 57 1140) sa izolovali štandardnými mikrobiologickými metódami (STN 56 0089).

Pre určenie rezistencie *S. aureus* k antibiotikám sa použila difúzna disková metóda (Urbášková a i., 1985) s použitím Lachema diskov citlivosti s obsahom antibiotík a hodnotením testu podľa tab. I.

Všetky kmene *S. aureus* sa izolovali v rokoch 1993 až 1995 a pochádzali zo stád oviec v okrese Zvolen s nadviazaním na produkciu mlieka a výrobkov z ne-

ho. Vo všetkých porovnávaných skupinách (klinické mastitídy, latentné mastitídy, mlieko, ovčí hrudkový syr, bryndza) výskytu rezistencie bolo rovnako – po 100 kmeňov *S. aureus*.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Chov zvierat je typická oblasť, kde extenzívne podávanie antibiotík pôsobí trvalým tlakom na mikrobiálnu flóru. Výsledkom je nárast rezistencie baktérií, ktorá ďalej vedie k zvyšovaniu dávok antibiotík, a to väčšinou nových a obyčajne aj drahších. Prax dokazuje, že náklady na liečenie infekcií spôsobených rezistentnými mikróbmi sú najmenej dvojnásobné ako u infekcií spôsobených citlivými mikróbmi rovnakého druhu. Uvážená antibiotická politika (Šimko, 1983b) môže kontrolou účelnosti a frekvencie podávania antibiotík pozitívne ovplyvniť nepriaznivú situáciu v rezistencii. Zhromažďovanie údajov a analýza rezistencie na miestnej, národnej a medzinárodnej úrovni slúži k voľbe postupov k zníženiu výskytu rezistentných kmeňov.

V podmienkach stredného Slovenska je zvolenský okres s chovom oviec mliekovo-vlnového úžitkového typu významným producentom ovčieho mlieka a výrobkov z neho. Mastitídy u oviec na strednom Slovensku sa vyskytujú často. Pri klinických formách infekčných mastitíd sa najčastejšie (96 %) vyskytoval *S. aureus*, a tak isto (54,4 %) aj pri latentných formách infekčných mastitíd (Šimko, 1992). Z tohto pohľadu vystupujú do popredia problémy etiologickej protista-

I. Interpretácia priemerov inhibičných zón – Interpretation of the averages of inhibition zones

Antibiotikum ¹ Chemoterapeutikum ²	Skratka ³	Obsah účinnej látky v disku ⁴ (µg; j)	Hodnotenie testu (priemer inhibičnej zóny v mm) ⁵	
			rezistentný ⁶	citlivý ⁷
Ampicilín	AMP	10	≤ 28	≥ 29
Bacitracín	BAC	10**	9	13
Cefalotín	CEF	30	14	18
Erytromycín	ERY	15	13	23
Gentamycín	GEN	10	12	15
Chloramfenikol	CMP	30	12	18
Kanamycín	KAN	30	13	18
Kotrimoxazol*	KOT	25	10	16
Linkomycín	LIN	2	14	15
Oxacilín	OXA	1	12	13
Penicilín	PEN	10**	28	29
Rifampicín	RIF	10	16	20
Spiramycín	SPI	20	10	13
Vankomycín	VAN	30	9	12
Tetracyklín	TET	30	14	18

Legenda – Legend:

* = chemoterapeutikum – chemotherapeutic drug

** = obsah účinnej látky je udán v j – content of active ingredient is given in j

¹antibiotic, ²chemotherapeutic drug, ³abbreviation, ⁴content of active ingredient in disk, ⁵assay evaluation (average of inhibition zone in mm), ⁶resistant, ⁷sensitive

fykokokovej terapie, vrátane rezistencie *S. aureus* na antibiotiká (V ý m o l a a i., 1983).

Štúdium rezistencie 500 kmeňov *S. aureus* (obr. 1) dokumentuje skutočnosť, že najvyššia rezistencia bola u klinických foriem mastitíd, tak ako sme predpokladali. V skupine latentných mastitíd rezistencia sa významne znížila, okrem k KAN a COT, u ktorých sa mierne zvýšila.

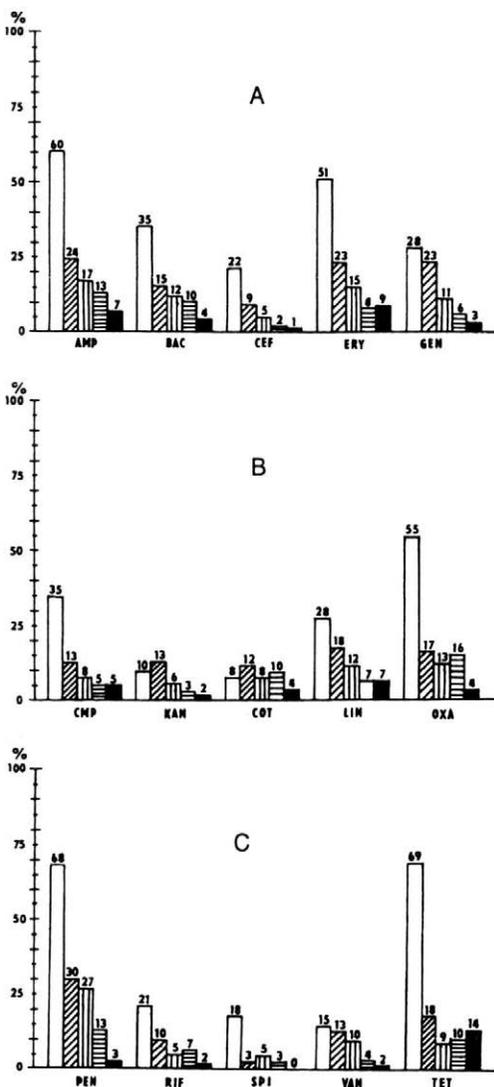
Rezistencia *S. aureus* pri mastitídach bola vysoká predovšetkým k TET, PEN, AMP, OXA, ERY, ale aj k CMP u klinických foriem mastitíd. Situácia v rezistencii *S. aureus* kopíruje spotrebu veterinárnych protimikróbových liečiv vo všetkých liekových formách, najmä liečivých aerosolis a pién. Riziko z používania CMP (P a g e, 1991) viedlo v roku 1995 k zákazu jeho používania pri terapii chorých zvierat produkujúcich potraviny aj na Slovensku.

Rezistencia *S. aureus* v ovčom mlieku, v ovčom hrudkovom syre a v bryndzi sa ďalej postupne znižovala. Pokles rezistencie v týchto surovinách (mlieko, hrudkový syr) a potravine (bryndza) je zaujímavý aj z toho hľadiska, že *S. aureus* sa v mlieku dobre rozmnožuje (G ö r n e r a Š i m k o v i č o v á, 1979) a v procese zrenia ovčieho hrudkového syra nastáva devitalizácia stafylokokov i inej patogénnej mikroflóry (G r i e g e r a i., 1980; K r č á l a i., 1988), a to najmä v dôsledku inhibície kyselinou mliečnou v syre. Tento faktor má zrejme významný vplyv nielen na obmedzovanie stafylokokových enterotoxikóz, ale aj na obmedzovanie kmeňov *S. aureus* rezistentných na antibiotiká a protimikróbové chemoterapeutiká. Výsledky poukazujú, že ovčie mlieko a výrobky z neho nie sú dôležitým faktorom pri šírení antibiotickej rezistencie *S. aureus* na strednom Slovensku.

Spomínané úvahy naznačujú, že rezistencia voči antibiotikám a jej transfer môžu byť kontrolované jedine dobrou klinickou praxou, ktorá predpokladá spoľahlivú identifikáciu patogéna, voči ktorému sa pôsobí liečivom. Odpoveď na pokračujúce účinné použitie terapeutických látok musí preto spočívať v lepšom a opatrnejšom použití antibiotík v starostlivosti o zdravie zvierat, než to bolo v období pred prvým objavením sa mikroorganizmov rezistentných voči antibiotikám.

LITERATÚRA

DUBEN, J. – HAUSNER, O.: Vyšetření při bakteriálních onemocněních. Praha, Avicenum 1986. 180 s.
 GÖRNER, F. – ŠIMKOVIČOVÁ, H.: Dynamika obsahu stafylokokov pri fermentácii kyslomliečnych produktov. Českoslov. Hyg., 24, 1979: 69–80.
 GRIEGER, C.: Hygiene mléka a mléčných výrobků. Bratislava, Príroda 1990. 397 s.
 GRIEGER, C. – BEDNARČIKOVÁ, E. – PAKÁNOVÁ, M. – VERDON, F.: Problematika hodnotenia potravín s výskytom stafylokokov so zreteľom na znalosť výrobnej technológie. Českoslov. Hyg., 25, 1980: 210–216.



1. Prehľad rezistencie u kmeňov *S. aureus* na: A = antibiotiká, B = antibiotiká a chemoterapeutikum, C = antibiotiká – An overview of resistance in the strains of *S. aureus* to: A = antibiotics, B = antibiotics and chemotherapeutic drug, C = antibiotics

- klinické mastitidy – clinical mastitis
- ▨ latentné mastitidy – latent mastitis
- ▤ mlieko – milk
- ▥ ovčí hrudkový syr – sheep lumpy cheese
- bryndza – bryndza cheese

JASŠO, J.: Mastitidy oviec v spádovej oblasti Štátneho veterinárneho ústavu Žilina v rokoch 1976 až 1980 z hľadiska laboratórnej diagnostiky. In: Zbor. Št. Vet. Správy MPVŽ SSR, 13, 1983: 233–243.

KRČÁL, Z. – PREKOPOVÁ, J. – BOROŠ, V.: Výroba a spracovanie ovčieho mlieka. Bratislava, Príroda 1988. 75 s.

- PAGE, S. W.: Chloramphenicol. 1. Hazards of use and the current regulatory environment. *Austral. Vet. J.*, 68, 1991: 1–2.
- PETRAŠ, P.: Průkaz stafylokokového enterotoxínu v ovčím sýru. *Českoslov. Epidem.*, 34, 1985: 208–211.
- ŠIMKO, Š.: Antibiotická politika vo veterinárskej praxi. *Imunoprofylaxia*, 1983a: 51–56.
- ŠIMKO, Š.: Zásady celkovej protimikróbovej terapie vo veterinárnej praxi. *Imunoprofylaxia*, 1983b: 57–64.
- ŠIMKO, Š.: Sezónnosť zabijania zdravých a chorých oviec v Stredoslovenskom kraji. In: *Zbor. Št. Vet. Správy MPVŽ SSR*, 21, 1987: 119–126.
- ŠIMKO, Š.: Farmakoterapia infekčných chorôb – teória a prax. *Veterinářství*, 39, 1989: 531–534.
- ŠIMKO, Š.: Výskyt a etiológia infekčných mastitíd bahnic. *Poľnohospodárstvo*, 38, 1992: 723–780.
- ŠIMKO, Š.: Nálezy *Staphylococcus aureus* v ovčom hrudkovom syre v regionálnych podmienkach stredného Slovenska. *Veterinářství*, 43, 1993: 29–32.
- TRÁVNÍČEK, M.: Mastitidy oviec a ich tlenie. *Spravodaj vedeckovýrobného združenia pre chov oviec v SSR*, 7, 1985: 1–45.
- URBÁŠKOVÁ, P.: Vyšetření při antimikrobiální terapii. Praha, Avicenum 1985. 152 s.
- VÝMOLA, F.: Stafylokokové infekce. Praha, Avicenum 1983. 236 s.
- STN 56 0089. Potravinárske výrobky. Stanovenie počtu *Staphylococcus aureus*. 1987.
- STN 57 0510. Ovčie mlieko. 1995.
- STN 57 1138. Ovčí hrudkový syr. 1995.
- STN 57 1140. Bryndza. 1995.
- Veterinární laboratorní vyšetřovací metodiky I–IV. Praha, Bratislava, ÚSVÚ a ÚŠVÚ 1975. 614 s.

Došlo 16. 2. 1996

Kontaktná adresa:

MVDr. Štefan Š i m k o, CSc., Okresná veterinárna správa, Nám. SNP 50, 960 76 Zvolen, Slovenská republika
Tel. 0855/203 91, 32 18 39, 32 00 57, fax 0855/220 86

LYMPHOCYTE BLASTOGENESIS TO CONCAVALIN A IN DOGS WITH LOCALIZED DEMODICOSIS ACCORDING TO DURATION OF CLINICAL DISEASE

BLASTOGENÉZA LYMFOCYTOV PO INDUKCII CONCAVALIN A U PSOV S LOKÁLNOU DEMODIKÓZOU VZHLADOM K TRVANIU KLINICKÉHO OCHORENIA

Š. Paulík, J. Mojžišová, V. Bajová, D. Baranová, I. Paulíková

University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: The aim of the study was to determine the degree of Con A induced lymphocyte blastogenesis in dogs with localized demodicosis (LD) within 1–3 and 6–8 weeks from appearance of the clinical signs. Ethidium bromide fluorescence assay was used for evaluation. In observation 9 clinically normal dogs, 6 dogs with LD and 4 dogs with generalized demodicosis (GD) were used. The results showed a statistically significant depression ($P < 0.01$) of blastogenesis in the LD dogs in comparison with that in the healthy dogs (Fig. 1). Responses to Con A were normal in dogs with LD in 1–3 weeks. However, a significantly depressed response to Con A ($P < 0.025$ – 0.001) was demonstrated in the LD dogs in 6–8 weeks (average 6.7 weeks) and it was comparable with that in the GD dogs with the duration of clinical disease on average for 8.7 weeks (Fig. 2; Tab. II). Thus, immunosuppression is not a necessary condition for dogs to develop spontaneous clinical LD and immunosuppression develops with the clinical signs of disease.

dogs; demodicosis; lymphocyte blastogenesis; mitogen

ABSTRAKT: Cieľom štúdia bolo sledovať úroveň Con A indukovanej blastogenézy krvných lymfocytov u psov s lokálnou formou demodikózy (LD), s trvaním manifestácie klinických príznakov jeden až tri a šesť až osem týždňov. K hodnoteniu blastogenézy bol použitý ethidium bromid fluorescenčný test. K sledovaniu bolo použitých deväť klinicky zdravých psov, šesť psov s LD a štyria psy s generalizovanou demodikózou (GD). V porovnaní so zdravými psami preukázali lymfocyty od psov s LD ($n = 6$) signifikantne zníženie ($P < 0,01$) odpovedavosť ku Con A (obr. 1). Normálna odpoveď k mitogénu bola zaznamenaná u psov ($n = 3$) s LD trvajúcou jeden až tri týždne. Psy ($n = 3$) s LD trvajúcou šesť až osem týždňov (priemer 6,7 týždňa) však preukázali výrazne depresovanú odpoveď ku Con A ($P < 0,025$ – $0,001$); táto bola porovnateľná s blastogenezou lymfocytov u psov s GD trvajúcou v priemere 8,7 týždňa (Fig. 2; tab. II). Výsledky demonštrujú, že imunosupresia nie je podmienkou pre spontánne prepuknutie klinického prejavu LD a vyvíja sa v závislosti od trvania manifestácie klinických príznakov.

psy; demodikóza; blastogenéza lymfocytov; mitogén

INTRODUCTION

Demodex canis, a normal inhabitant of canine skin, is associated with localized and generalized demodicosis (Muller et al., 1989). One of the more puzzling aspects of the disease is that these mites cause overt demodicosis only in certain individuals (Müller and Kirk, 1969). Demodicosis has been produced in dogs immunosuppressed with antilymphocyte serum (Owen, 1972; Healey and Gaafar, 1977a). These findings suggested that immunosuppression is important in the pathogenesis of GD and that the onset of demodicosis in dogs is a consequence of a hypoactive cellular immune system. Dogs with GD exhibited severely de-

pressed cell-mediated immune response to the T-lymphocyte mitogens, as indicated by *in vitro* lymphocyte transformation (Corbett et al., 1975; Scott et al., 1976; Krawiec and Gaafar, 1980; Paulík et al., 1996) and *in vivo* skin reactivity tests (Scott et al., 1974; Healey and Gaafar, 1977b). Most of this research in demodicosis utilized older, chronically affected dogs, making it difficult to determine if immunosuppression was present previous or subsequent to spontaneous GD. It has been recently demonstrated that immunosuppression follows rather than precedes the clinical manifestations of GD (Barriga et al., 1992). In dogs with LD the presence of immunosuppression has not been demonstrated unequivocally (compare:

Corbett et al., 1975 and Scott et al., 1976). One report demonstrated that LD is also accompanied by depression of T-lymphocytes (Barriga et al., 1992). Further studies in this respect are needed.

In the present study, we report on the cell immunocompetence of dogs with LD persisted for a different time, in comparison to the healthy dogs and to the GD dogs.

MATERIAL AND METHODS

Animals and protocols

The peripheral lymphocytes of demodicosis affected dogs were investigated at different times (according to arrival at our Clinic of Small Animals) by the same procedure for reactivity to concanavalin A (Con A) and compared with those in the healthy dogs. In the observation nine healthy (mean age 2.3 years), four GD (mean age 2.1 years) and six LD (mean age 1.1 years) dogs were used. The healthy dogs (seven breeds) were three males (5 mo.; 1.5 and 2 yr. old) and six females (4, 5 and 10 mo.; and 3, 4 and 8 yr. old). Details of ill dogs are given (Tab. I). The diagnoses were confirmed parasitologically. None of the dogs with demodicosis had clinical signs of pyogenic dermatitis in the time of investigation.

Examinations

Blood was obtained from the *v. cephalica* and placed in tube containing heparin (20 units/ml of blood). Peripheral mononuclear cells were isolated using the Ficoll (Pharmacia Biotech AB, Sweden), according the method described elsewhere (Procházková, 1979). The cultivation, mitogen stimulation and the measurement of response of lymphocytes to Con A (25 µg/ml; Sigma Chemical Co., USA) by ethidium bromide (EB) fluorescence assay were investigated, as

described in our previous work (Paulík et al., 1996). The degree of lymphocyte stimulation was expressed as fluorescence intensity (FI) and stimulation index (SI). Average values of background FI in the healthy dogs and dogs with GD and LD were 4.47 ± 0.57 , 4.38 ± 0.93 and 4.44 ± 0.42 , respectively.

Statistics

Data obtained were expressed as mean \pm standard deviation and analysed by Student's *t*-test. Only *P* values of 0.05 or smaller were considered statistically significant.

RESULTS

In this observation nine clinically normal dogs, six LD dogs and four GD dogs with duration of active disease at average 4.5 and 8.7 weeks, respectively, were used. The LD dogs ($n = 6$) showed a slightly increased ($P < 0.025$) blastogenesis of unstimulated cells and a slight ($P > 0.05$) or moderate ($P < 0.01$) decline in the mean values of FI and SI, respectively, when compared with those of the healthy dogs. In comparison with the healthy dogs, the GD dogs exhibited slightly ($P < 0.05$) increased blastogenesis of unstimulated cells but a severely depressed response of stimulated cells ($P < 0.001$) and the SI values ($P < 0.001$). Comparison of the results of lymphocyte blastogenesis in dogs with LD and dogs with GD showed that the FI values of stimulated cells and the SI values were significantly declined ($P < 0.05$) in the second group of dogs (Fig. 1; Tab. II). Dogs with LD were also evaluated regarding the duration of the manifestation of clinical signs. A significantly depressed lymphocyte response to Con A ($P < 0.001$ for FI and $P < 0.025$ for SI) was observed in the LD dogs with the disease duration 6.7 weeks, in comparison with the LD dogs manifesting skin lesions for 2.3 weeks. Moreover, in dogs

I. Breed, age, sex, length of time in dogs affected with demodicosis

Form of demodicosis	Breed	Age (year)	Sex	Time affected	
				week	mean \pm SD
LD	Boxer	0.6	F	3	2.3 \pm 1.1
	Rottweiler	2.0	F	1	
	German Shepherd	2.0	M	3	
	Great Dane	0.5	M	6	
	Doberman Pinscher	0.7	M	8	
	German Shepherd	1.0	M	6	
GD	German Shepherd	0.7	M	6	6.7 \pm 1.2
	German Shepherd	0.7	M	6	
	German Shepherd	0.7	M	12	
	Pitt-bull Terrier	1.5	M	8	
	Boxer	5.5	M	9	8.7 \pm 2.5

Legend:

LD = localized demodicosis; GD = generalized demodicosis

II. Lymphocyte blastogenic response to Con A in healthy dogs and dogs with demodicosis

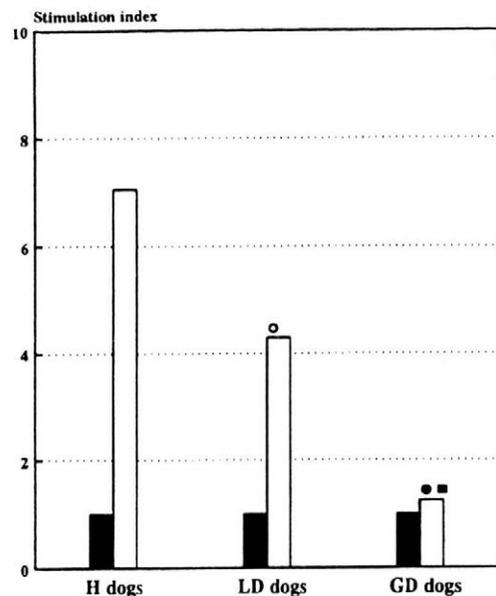
	Fluorescence intensity cells	
	stimulated	unstimulated
¹ Healthy dogs	10.60 ± 1.10*	1.55 ± 0.39
² LD dogs		
group A: 1-3 weeks	11.80 ± 0.61	2.02 ± 0.36
group B: 6-8 weeks	5.81 ± 0.83	2.27 ± 0.35
group A + B	8.81 ± 3.34	2.14 ± 0.34
³ GD dogs	3.28 ± 2.38	2.37 ± 0.82
Significance (P)		
1 vs 2A	n.s.	n.s.
1 vs 2B	<0.001	<0.025
1 vs 2A + B	n.s.	<0.025
1 vs 3	<0.001	<0.05
2A vs 2B	<0.001	n.s.
2A vs 3	<0.005*	n.s.
2B vs 3	n.s.	n.s.
2A + B vs 3	<0.05	n.s.

Legend:
* mean ± SD; LD and GD = see Tab. I; group A and B = length of time affected; n.s. = not significant

with LD lasting for 2.3 weeks, but not 6.7 weeks, the lymphocyte response to Con A stimulation was similar to that in the healthy dogs. In addition, the GD dogs showed depressed responses to Con A, in comparison with the healthy dogs and with the LD dogs with the duration of clinical disease for 2.3 weeks, but not with dogs with LD lasting for 6.7 weeks (Fig. 2; Tab. II).

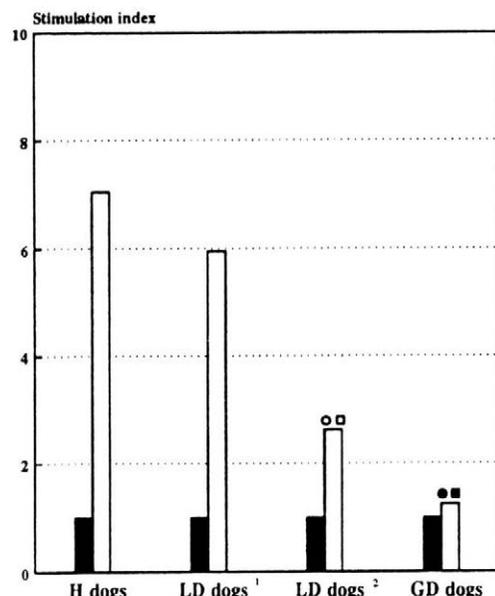
DISCUSSION

Mitogen - induced lymphocyte blastogenesis is widely used as an indicator of the functional status of lymphocytes (Oppenheim and Schechter, 1980). Con A is an efficient canine T-cell stimulant (Krankovska, 1987). Thus, Con A stimulation is suitable as an *in vitro* test to evaluate T-cell function. Previous observations showed that EB fluorescence assay is a useful method for detection of responsiveness of lymphocytes to mitogens in the healthy dogs (Nakanishi et al., 1986) and also in the GD dogs (Paulik et al., 1996). For these reasons the response of lymphocytes to Con A in the LD dogs, using EB fluorescence assay, was evaluated.



1. Blastogenesis in dogs with demodicosis

Legend:
H dogs = healthy dogs
LD dogs = localized demodicosis
GD dogs = generalized demodicosis
■ unstimulated
□ Con A
○ LD vs.H (P < 0.01)
● GD vs.H (P < 0.001)
■ GD vs.LD (P < 0.05)



2. Blastogenesis in LD dogs with different duration of the disease

Legend:
LD^{1,2} = 1-3 and 6-8 weeks after appearance of clinical signs, resp.
H, LD and GD = see Fig. 1
■ unstimulated
□ Con A
○ LD² vs.H (P < 0.001)
□ LD² vs.LD¹ (P < 0.025)
● GD vs.H (P < 0.001)
■ GD vs.LD¹ (P < 0.001)

The results indicate that the lymphocyte response to Con A was moderately ($P < 0.01$) and severely ($P < 0.00$) depressed in dogs with LD and GD, respectively, in comparison with that in healthy dogs (Fig. 1). T-cell suppression apparently exists in the GD dogs (Scott et al., 1974; Hirsh et al., 1975; Barriga et al., 1992; Paulík et al., 1996 and others). However, the presence of T-cell depression in the LD dogs has not been demonstrated unequivocally until Barriga et al. (1992) reported that the lymphocytes from the LD dogs have a declining response to Con A. This finding, confirmed in our study (Fig. 1; Tab. II), suggested that depression of cell-mediated immunity accompanied not only GD, but also LD.

Currently, the onset of GD occurs only in animals with a pre-existing defect in the cell-mediated immunity (Müller et al., 1989; Wedell, 1994). It seems that in the older dogs the sudden onset of demodicosis need not be explained in this way. In these cases, several diseases (i. e. hyperadrenocorticism, diabetes mellitus, hepatic disease and neoplasia) of potentially immunosuppressive nature have been suspected to cause the onset of demodicosis (Scott, 1979; Miller, 1980; Müller et al., 1989). However, this relationship is currently under discussion (Duclos et al., 1994). The immunopathogenesis of adult-onset demodicosis has not been studied, and it is not known whether there is a difference between the juvenile and the adult form (Hirsh et al., 1975; Corbett et al., 1975; Scott et al., 1976). There is an indication that in young dogs the onset of demodicosis may be initiated by age-related primary lymphocyte unresponsiveness (Krawiec and Gaafar, 1980). The lymphocytes from healthy puppies respond to mitogens normally when they are three months old (Gerber and Brown, 1974). Regarding this, the dogs used in our observation were immunocompetent at time of the onset of active demodicosis.

Our results demonstrate that lymphocytes from the LD dogs responded to mitogen normally within 3 weeks from the appearance of clinical signs (Fig. 2, Tab. II). This supported the belief of Barriga et al. (1992) that immunosuppression is not a necessary condition for dogs to develop clinical LD. Another LD dogs with the disease duration 6–8 weeks showed severely depressed lymphocyte responses comparable to those in the GD dogs, but significantly different from those in the healthy dogs (Fig. 2, Tab. II). This indicates that immunosuppression develops with the clinical signs of disease. It turned out that in the LD dogs the responsiveness of lymphocytes to Con A within 4–6 weeks after the appearance of clinical signs declined by 52 percent, in comparison to those of the healthy dogs (Barriga et al., 1992). It is completely comparable with our results (the decline by 45 percent), however, in dogs with longer duration of clinical disease (6–8 weeks). Therefore, there is no assumption that immunosuppression in the LD dogs will increase further more with increased duration of the disease. The de-

crease of the SI values in dogs with GD and LD was mainly due to decline in the FI of stimulated cells, but partially also due to increase in the FI of unstimulated cells (Tab. II). The meaning of this is not clear at present. Barta and Oyekan (1981) concluded that a decrease of the SI from these reasons in dogs with respiratory problems was due not only to the serum containing mitogenesis suppressing factor, but also that cells had a modified response to the mitogens. It seems that the similarity in this respect may be also in demodicosis affected dogs. It has been shown that in some GD dogs in addition to serum suppressing factor, there may also be a cellular modified response to PHA (Hirsh et al., 1975) and to Con A (Paulík et al., 1996). Al-Khalidi and Barriga (1986) indicated that in the primary infection of dogs with *Echinococcus granulosus*, the blastogenesis of unstimulated cells in the inverse direction to the mitogen response can be a result of depressive or stimulating effects of the parasite products on different subsets of lymphocytes. Further studies are necessary to elucidate this relation.

REFERENCES

- AL-KHALIDI, N. W. – BARRIGA, O. O.: Cell-mediated immunity in the prepatent primary infection of dogs with *Echinococcus granulosus*. *Vet. Immunol. Immunopath.*, 11, 1986: 73–82.
- BARRIGA, O. O. – AL-KHALIDI, N. W. – MARTIN, S. – WYMAN, M.: Evidence of immunosuppression by *Demodex canis*. *Vet. Immunol. Immunopath.*, 32, 1992: 37–46.
- BARTA, O. – OYEKAN, P. P.: Lymphocyte transformation test in veterinary clinical immunology. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 4, 1981: 209–221.
- CORBETT, R. – BANKS, K. – HINRICHS, B. – BELL, T.: Cellular immune responsiveness in dogs with demodectic mange. *Transpl. Proc.*, 7, 1975: 557–559.
- DUCLOS, D. D. – JEFFERS, J. G. – SHANLEY, K. J.: Prognosis for treatment of adult-onset demodicosis in dogs: 34 cases (1979–1990). *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 204, 1994: 616–619.
- GERBER, J. D. – BROWN, A. L.: Effect of development and aging on the response of canine lymphocytes to Phytohemagglutinin. *Infect. Immun.*, 10, 1974: 695–699.
- HEALEY, M. C. – GAAFAR, S. M.: Immunodeficiency in canine demodectic mange. I. Experimental production of lesions using antilymphocyte serum. *Vet. Parasitol.*, 3, 1977a: 121–131.
- HEALEY, M. C. – GAAFAR, S. M.: Immunodeficiency in canine demodectic mange. II. Skin reactions to phytohemagglutinin and concanavalin A. *Vet. Parasitol.*, 3, 1977b: 133–140.
- HIRSH, D. C. – BAKER, B. B. – WIGER, N. – YASKULSKI, S. C. – OSBURN, B. I.: Suppression on *in vitro* lymphocyte transformation by serum from dogs with generalized demodicosis. *Amer. J. Vet. Res.*, 36, 1975: 1591–1595.
- KRAKOWKA, S.: *In vitro* and *in vivo* methods in immunotoxicology. *Toxicol. Pathol.*, 15, 1987: 276–280.

- KRAWIEC, D. R. – GAAFAR, S. M.: Studies on the immunology of canine demodicosis. *J. Amer. Anim. Hosp. Assoc.*, 16, 1980: 669–676.
- MILLER, W. H.: Canine demodicosis. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, 2, 1980: 334–342.
- MÜLLER, G. H. – KIRK, R. W.: Small animal dermatology. Philadelphia, W. B. Saunders Co. 1969: 242–250.
- MÜLLER, G. H. – KIRK, R. W. – SCOTT, D. W.: Small animal dermatology. Philadelphia, W. B. Saunders Co. 1989: 376–426.
- NAKANISHI, A. – AIMI, K. – EJIMA, H. – KUROKAWA, K.: Measurement of blastogenesis of canine peripheral blood lymphocytes against PHA by glucose consumption test. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 48, 1986: 53–60.
- OPPENHEIN, J. J. – SCHECTER, B.: Lymphocyte transformation. In: ROSE, N. – FRIEDMAN, H. (ed.): Normal of clinical immunology. Washington, D. C., American Society for Microbiology 1979: 233–243.
- OWEN, L. M.: Demodectic mange in dogs immunosuppressed with antilymphocyte serum. *Transpl.*, 13, 1972: 616–617.
- PAULÍK, Š. – MOJŽISOVÁ, J. – BAJOVÁ, V. – BARANOVÁ, D. – PAULÍKOVÁ, I.: Evaluation of canine lymphocyte blastogenesis prior and after *in vitro* suppression by dog demodicosis serum using ethidium bromide fluorescence assay. *Vet. Med. – Czech.*, 41, 1996: 7–12.
- PROCHÁZKOVÁ, A.: Separation of lymphocytes by means of verografin. *Immunol. Zprav.*, 2, 1979: 17–19.
- SCOTT, D. W.: Canine demodicosis. *Vet. Clin. North. Amer. (Small Anim. Pract.)*, 9, 1979: 79–92.
- SCOTT, D. W. – FARROW, B. R. H. – SCHULTZ, R. D.: Studies on the therapeutic and immunologic aspects of generalized demodectic mange in the dog. *J. Amer. Anim. Hosp. Assoc.*, 10, 1974: 233–244.
- SCOTT, D. W. – SCHULTZ, R. D. – BAKER, E.: Further studies on the therapeutic and immunologic aspects of generalized demodectic mange in the dog. *J. Amer. Anim. Hosp. Assoc.*, 12, 1976: 203–213.
- WEDELL, H.: Demodicose (*D. canis*) beim hund. *Mh. Vet.-Med.*, 49, 1994: 329–332.

Arrived on 1st February 1996

Contact Address:

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

Upozornění pro autory vědeckých časopisů

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

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

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

Redakce časopisu

EFFICACY OF PERORALLY ADMINISTERED IVERMECTIN AGAINST LARVAL STAGES OF WARBLE FLY (*HYPODERMA DIANA* B.) IN ROE DEER

ÚČINNOST PERORÁLNĚ PODANÉHO IVERMEKTINU PROTI LARVÁLNÍM STADIÍM STŘEČKA SRNČÍHO (*HYPODERMA DIANA* B.) U SRNČÍ ZVĚŘE

J. Lamka, J. Suchý, F. Štaud

Faculty of Pharmacy Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

ABSTRACT: Hypodermosis and cephenemyiosis are largely widespread diseases in roe deer in the conditions of the Czech Republic. Both kinds of parasitosis cause great losses of game. The aim of this study was to test peroral administration of ivermectin with respect to the control of larval stages of hypodermosis (*Hypoderma diana* B.) in roe deer. Studies were performed on three localities within one three-year study and two 18-month studies. Ivermectin was administered for two days at a daily dose of 0.30 mg/kg body weight during winter game feeding. The shot deer were checked for the presence of larvae throughout the year. Prevalence and intensity of infection were determined. A total of 147 animals were checked in 1992–1994 (Tab. I); prevalence and intensity of infection were very low in comparison with the situation before treatment and with the control group (1994). Similar results were obtained in both shorter studies (Tab. II) performed on 27 animals in total. The results suggest (on the base of detail discussion) that the low values of prevalence and intensity of infection should be taken as partly distorted due to the methodical conditions of checks. The efficacy of ivermectin treatment was complemented by observation of several cases and their results employing direct checks of shot deer (Tab. III), including a six-year observation of a group of 6 to 10 individuals of tame deer treated year by year. These results explicitly document the high efficacy of mass peroral ivermectin administration in the control of warble fly larvae. Ivermectin is the first drug suitable for the treatment of roe deer hypodermosis.

ivermectin; *Hypoderma diana* B.; roe deer

ABSTRAKT: V jedné tříleté a dvou jeden a půlletých studiích byla ověřována účinnost dvoudenní zimní aplikace ivermektinu (dávka 0,30 mg/kg živé hmotnosti/den) proti larválním stadiím *Hypoderma diana* B. srnčí zvěře. Bylo prokázáno, že léčivo výrazně snižuje prevalenci i intezitu infekce. Larvy střečka srnčího jsou k léčivu vysoce citlivé. Jsou diskutovány metodické přístupy k ověřování účinnosti léčiva proti hypodermóze srnčí zvěře.

ivermektin; *Hypoderma diana* B.; srnčí zvěř

ÚVOD

Hypodermóza a cephenemyióza srnčí zvěře zaujímají v České republice mezi ektoparazitózami spárkaté zvěře nejvýznamnější postavení, neboť jejich vlivem (v porovnání s ostatními ektoparazitózami) dochází k nejvyšším ztrátám na zvěři. Na rozdíl od cephenemyiózy, která je úspěšně léčitelná přípravkem s obsahem rafoxanidu (Ševčík aj., 1986), hypodermóza hromadně perorálně léčitelná doposud není. Z výsledků parenterálního podání ivermektinu (IVM) atypickým hostitelům napadených hypodermózou (původce *Hypoderma diana* B.) je známa velmi dobrá účinnost IVM (Váhala aj., 1991) proti larválním stadiím parazitózy. Také perorální, příp. lokální podání IVM je vysoce účinné v terapii nejruznějších ektoparazitóz hlavně

hospodářských zvířat (Campbell, 1989). Účinnost IVM proti ektoparazitózám spárkaté zvěře (mimo příbuzného soba – Oksanen aj., 1993) však z literatury známa není.

Cílem této práce bylo ověřit upotřebitelnost IVM v hromadném perorálním podání srnčí zvěři v oblastech s výskytem hypodermózy.

MATERIÁL A METODA

Lokality ověřování

Pro potřeby ověřování bylo spojeno území šesti honitěb (Nový Hradec Králové, Býšít, Vysoká, Běleč, Městské lesy Hradec Králové a Lesy ČR) v okrese Hra-

dec Králové. Oblast byla nazvána Hradecko (celková rozloha 7 845 ha). Dále bylo ověřování uskutečněno v samostatných honitbách mysliveckých sdružení (MS Luže (okres Chrudim, 3850 ha) a MS Blešno (okres Hradec Králové, 1 210 ha).

Podání IVM

Léčivo bylo aplikováno ve formě přípravku Cermix ad usum veterinarium (antiparazitární premix s obsahem IVM pro spárkatou zvěř – výrobce Biopharm VÚBLV, Jilové u Prahy) v době zimního přikrmování dva dny po sobě v dávce 0,30 mg/kg živé hmotnosti/den. Předložení léčiva předcházela přípravná fáze, tj. přikrmování obilninami, soustředění zvěře na krmelištích, stanovení početních a druhových stavů zvěře. Premix byl ve všech honitbách centrálně zamíchán do šrotovaných zrnin, výsledná medikovaná krmná směs (MKS) byla na krmeliště zakládána podle aktuálních stavů. V každé honitbě byl kontrolován příjem MKS.

Parazitologická metodika

V období od 1. 11. do 31. 12. každého roku byla hospodáři honiteb u ulovených kusů zvěře prováděna kontrola na přítomnost larev střečka srnčího (*Hypoderma diana* B.) v podkoží hřbetu, plecí a kýt. Zvlášť byly evidovány kusy rušené a nerušené (vyšetření pouze pohmatem). Kontrolní skupina byla sestavena ze zvěře vlastnoručně rušené a kontrolované ve spolupráci se společností Interlov, středisko Hradec Králové. Zvěř byla původem z různých okresů východních Čech.

V průběhu celého období ověřování hospodáři jednotlivých honiteb sestavovali podle jednotné metodiky protokoly, které byly předány k celkovému vyhodnocení na farmaceutickou fakultu. Z podkladových materiálů byly stanoveny základní parametry ověřování, tj. prevalence (procento výskytu pozitivních jedinců z celkově sledovaného počtu zvěře) a intenzita infekce (počet larev/pozitivní kus zvěře).

VÝSLEDKY

V letech 1992 až 1994 bylo na Hradecku zkontrolováno celkem 147 kusů holé zvěře (tab. I). Prevalence se pohybovala v rozmezí 9,1 až 16,0 % při průměrném rozpětí intenzity infekce 4,5 až 28,2 larev. Podíl rušených kusů zvěře z celkového odlovu se v jednotlivých letech postupně zvyšoval z výchozích 22,2 % (1992) až na 47,6 % (1994).

V honitbách MS Luže a Blešno v roce 1994 dosáhla prevalence hodnot 10,5 % (MS Luže), resp. 0,0 % (MS Blešno) – tab. II. Intenzita infekce (MS Luže) byla v jednom případě nevyčíslitelná, u druhého kusu bylo nalezeno 10 larev.

V kontrolní skupině (rok 1994, 52 kontrolovaných kusů) dosáhla prevalence 57,6 % při průměrné intenzitě infekce 48 larev.

Je doloženo devět případů odlovu či úhynu zvěře a výsledek dlouhodobého sledování skupiny živé zvěře (tab. III), které dokumentují přímo vysokou účinnost IVM proti larvám střečka srnčího.

DISKUSE

Současná promořenost srnčí zvěře střečkou je v České republice značně vysoká. Důsledkem jsou hmotnostně slabí až velmi slabí jedinci zvěře, v těžkých případech úhynu zvěře, konfiskace zvěřiny po odlovu, neschopnost produkce maximálních trofejí, postižení prenatalního vývoje plodů. Obecně jsou střečci původcem vysokých ztrát srnčí zvěře. Jejich omezení nebo eradikace je proveditelné pouze potlačením vývoje larválních stádií parazitů.

Ve všech spolupracujících honitbách byla výchozí prevalence i intenzita infekce střečkovitostí odhadnuta nebo stanovena na základě dlouholetých pozorování. Kromě jediné honitby MS Nový Hradec Králové (oblast Hradecko – 20 %, kde již v předchozích letech proběhlo ověřování IVM) se v ostatních MS prevalence pohybovala v rozmezí 30 až 85 % (značně převládaly hodnoty nad 50 %) a občas (v některých honitbách podle sezony velmi často) byly evidovány případy masivních infekcí s následnou konfiskací zvěřiny. S počátkem zahájení aplikace IVM prevalence i intenzita infekce (v porovnání s výchozím stavem a v roce 1994 v porovnání s kontrolní skupinou) významně poklesly. Tento stav lze na první pohled považovat za vysoce příznivý výsledek. Pro objektivní vyhodnocení výsledků je třeba brát v úvahu následující důležité faktory:

- termín uskutečněné kontroly ulovených kusů: v listopadu a prosinci ještě převládají na zvěři mladé, a tedy laicky špatně identifikovatelné larvy,
- věková struktura lovených kusů (srnčata, dospělá holá zvěř): srnčata jsou postihována parazitózou výjimečně a přitom tvoří na konci roku pravidelně nejvyšší podíl z odlovu,
- poměr rušené a nerušené zvěřiny: pro přesné vyhodnocení účinnosti léčiva je použitelná pouze zvěřina rušená.

Pokud vezmeme v úvahu výše zmíněné faktory a budeme-li předpokládat nárůst prevalence i intenzity infekce během roku a současně přihlídneme k výsledkům porovnání hodnot získaných z léčených honiteb s nálezy kontrolní skupiny, je třeba konstatovat, že dosažené parametry účinnosti léčby uvedené v tab. I až III jsou zkrácené. Podle užití metodiky, tj. evidence nálezů v holé zvěři v době podzimního odlovu, je účinnost IVM proti larválním stádiím střečka srnčího obtížně hodnotitelná. Uvedené poznatky z oblasti Hradecka jsou platné i pro nálezy v MS Luže a Blešno, kde sledované parametry dosáhly dokonce ještě příznivějších hodnot.

Účinnost léčby infekcí střečkou srnčím lze vyhodnotit objektivně pouze přímou a odbornou kontrolou léčených kusů, která bude uskutečněna buď v době há-

I. Střeček srnčí, Hradecko 1992 až 1994 – Warble fly in roe deer, Hradecko area 1992–1994

Rok ověřování ¹	Vyšetřeno zvěře celkem (ks) ²	Prevalence ³ (%)	Intenzita infekce (průměrně larev/ks) ⁴	Rušená zvěř [ks (%)] ⁵	Poznámky ⁶
1991		20–80			vysoká prevalence s občasnými masivními infekcemi ⁷
1992	36	13,1	4,9	8 (22,2)	
1993	69	16,0	4,5	24 (34,8)	
1994	42	9,1	28,2	20 (47,6)	

¹year of study, ²deer examined in total (number of animals), ³prevalence, ⁴intensity of infection (average counts of larvae per animal), ⁵dissected deer [animals (%)], ⁶notes, ⁷high prevalence with contingent massive infections

II. Střeček srnčí, MS Luže a Blešno 1994 až 1995 – Warble fly in roe deer; hunting grounds Luže and Blešno, 1994–1995

Rok ověřování ¹	Vyšetřeno zvěře celkem (ks) ²	Prevalence ³ (%)	Intenzita infekce (průměrně larev/ks) ⁴	Rušená zvěř [ks (%)] ⁵	Poznámky ⁶
MS Luže					
1993	21	65,0		12 (57,1)	6 ks konfiskováno pro masivní infekci ⁷
1994	19	10,5	1. ks – ∞ 2. ks – 10 larev	13 (68,4)	1 ks konfiskován ⁸
MS Blešno					
1993		30–50			občas masivní infekce ⁹
1994	8	0,0	0,0	8 (100)	

For 1–6 see Tab. I, ⁷6 animals were confiscated due to severe infection, ⁸1 animal confiscated, ⁹occasional massive infection

III. Přehled případů s přímým průkazem účinnosti ivermektinu proti larvám střečka srnčího – A survey of cases with direct proofs of ivermectin efficacy in the control of warble fly larvae in roe deer

Honitba ¹	Zdroj informace ²	Celkový počet larev ³	Larvy odumřelé po léčbě ⁴	Poznámka ⁵
Černíkovice	odlov (♂)	11	9	16. 3. 1994 mimořádný odlov ⁶ Nahořany
Nahořany	úhyn (♂)	30	30	19. 4. 1994 střet s autem ⁷
Nahořany	úhyn (♂)	10	10	1. 6. 1994 stržení psem ⁸
Ratibořické údolí	odlov (♀)	70	70	20. 5. 1995
Černčice	odlov (♂)	–	11	1. 7. 1994
Černčice	odlov (♂)	–	8	2. 8. 1994
Nové Město	odlov (♂)	–	10	14. 6. 1994
Luže	odlov (♀)	–	42	15. 12. 1994
Jeníkovice	pozorování živé zvěře ⁹	B. N.	–	od roku 1990 každoročně 6–10 kusů ¹⁰

B. N. – bez nálezu – no finding

¹hunting ground, ²information source, ³total larval counts, ⁴larvae died after treatment, ⁵note, ⁶emergency shot, ⁷collision with a car, ⁸seized by a dog, ⁹observation of live deer, ¹⁰6–10 animals every year since 1990

jení zvěře, nebo v době lovu. V prvním případě lze využít mimořádných odlovů, kontroly uhynulé zvěře apod., ve druhém případě kontroly řádně odlovených kusů. Druhý přístup vychází z biologického vývoje larev, které neléčenou zvěř kompletně opouštějí v předjaří. Pokud je zvěř předtím v zimě úspěšně léčena, odumřelé larvy jsou postupně resorbovány, přesto (v závislosti na postiženém instaru) zůstávají v podkoží tělní obaly dlouhodobě patrné. Pečlivou prohlídkou kusů zvěře lovených na jaře a v létě lze nálezy využít k průkazu účinků IVM. Oba zmíněné přístupy byly

v několika případech použity, získané poznatky jsou uvedeny v tab. III. Zcela ojedinělou možností, která byla také zahrnuta do výsledků ověřování, bylo šestileté sledování skupiny živé srnčí zvěře v honitbě Jeníkovice (okres Hradec Králové). Šest až deset kusů zvěře celoročně denně dochází do sadu selského stavení. Zvěř byla v jednotlivých letech v různém časovém období (říjen až leden) léčena IVM a ani u jediného kusu prošlého léčbou nebyl v předjaří zaznamenán vývoj typických hypodermálních bouli. Přitom zmíněná honitba leží v oblasti, kde promořenost střečkem srnčím je mi-

nimálně na předléčebné úrovni blízké honitby MS Blešno (tab. II). Shrnutím poznatků z tab. III lze konstatovat, že tyto výsledky jsou již jednoznačné, bez zkreslení, a hlavně z hlediska zdravotního stavu srnčí zvěře vysoce příznivé. Larvální stadium hypodermózy je perorálním podáním IVM vysoce účinně léčitelné.

Hypodermóza probíhá na jediném kusu zvěře často paralelně s cephenemyiózou. Také u této parazitózy byla prokázána vysoká účinnost léčby IVM (L a m k a aj., 1995). Dalším velmi podstatným nálezem ověřovacích prací u této parazitózy je ale sezónní vývoj nemoci, kdy v zimě vysoce účinně léčená zvěř je přes letní období roku opět silně infikována. Tato situace se týká zvěře léčené v malých honitbách nebo jejich menších celcích. Řešením je každoroční zimní ošetření zvěře proti původcům cephenemyiózy. Zmíněný sezonně vývojový aspekt bude s velkou pravděpodobností platný i pro původce hypodermózy. Shodně s cephenemyiózou bude třeba postupovat i terapeuticky.

LITERATURA

- CAMPBELL, W. C.: Ivermectin and abamectin. New York, Springer-Verlag 1989. 363 s.
- LAMKA, J. – SUCHÝ, J. – ŠTAUD, F.: Účinnost perorálně podaného ivermektinu proti larválním stádiím střečka hltanového (*Cephenemyia stimulator* C) a srnčího (*Hypoderma diana* B.) u srnčí zvěře. In: Sbor. Ref., Symp. Využitelnost ivermektinu u zvěře, Zídlochovice, 1995: 60–68.
- OKSANEN, A. – NIEMINEN, M. – SOVERI, T.: A comparison of topical, subcutaneous and oral administration of ivermectin to reindeer. *Vet. Rec.*, 133, 1993: 312–314.
- ŠEVČÍK, B. – KINKOROVÁ, J. – DANĚK, J. – STRAKOVÁ, J. – DVOŘÁK, M. – LAMKA, J.: Vývoj kombinovaného přípravku s obsahem rafoxanidu a mebendazolu se zaměřením na parazitózy spárkaté zvěře. *Biol. Chem. Vet. (Praha)*, 22, 1986: 157–171.
- VÁHALA, J. – MOUCHA, P. – MINÁŘ, J. – PERŠÍN, M.: Invasion of warble fly on captive african antelope. *Verh. Ber. Erkrgr. Zootiere*, 33, 1991: 295–303.

Došlo 29. 1. 1996

Kontaktní adresa:

Doc. RNDr. Jiří L a m k a, CSc., Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Heyrovského ul. 1203, 500 05 Hradec Králové, Česká republika
Tel. 049/523 50 21, fax 049/521 00 02

USE OF HYDRATED LIME FOR DISINFECTION OF MODEL PATHOGENS *SALMONELLA TYPHIMURIUM* AND *ASCARIS SUUM* IN SEWAGE SLUDGES

VYUŽITIE VÁPENNÉHO HYDRÁTU NA DEZINFEKCIU MODELOVÝCH PATOGÉNOV *SALMONELLA TYPHIMURIUM* A *ASCARIS SUUM* V ČISTIARENSKÝCH KALOCH*

P. Plachý¹, P. Juriš¹, I. Plachá², J. Venglovský²

¹Parasitological Institute, Slovak Academy of Science, Košice, Slovak Republic

²Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: Hydrated lime was lethal to the strain of *Salmonella typhimurium* (Sk 14/39) after 60 min of exposure. In the control without addition of hydrated lime this strain was still viable after 168 hours, counting 6.1×10^5 pathogens/1 ml sludge. 168-hr disinfection of primary sludges with 10 g/l hydrated lime showed no significant reduction in the viability of *Ascaris suum* eggs. In three experiments, the number of viable eggs was reduced only by 3.6%. Indicator microorganisms, except psychrophilic ones that survive for only 24 hr, were destroyed after 60 min of exposure. The temperature of stabilized sludges did not vary considerably during experiments, ranging between 21 and 25 °C. With the addition of $\text{Ca}(\text{OH})_2$, sludge pH increased to the values for COD, organic matters and total nitrogen were reduced throughout the experiments. The values for sludge dry residues remained unchanged.

disinfection; *Ascaris suum* eggs; *Salmonella typhimurium*; sewage sludge; hydrated lime

ABSTRAKT: Vápenný hydrát devitalizoval kmeň *Salmonella typhimurium* (Sk 14/39) po expozícii 60 minút. V kontrole bez prídavku vápenného hydrátu bol uvedený kmeň prítomný ešte aj po 168 hodinách v počte $6,1 \times 10^5$ zárodkov v 1 ml kalu. Po 168 hodinách dezinfekcie primárnych kalov z čistiarne odpadových vôd (ČOV) vápenným hydrátom v dávke 10 g/l nedošlo k významnému zníženiu vitality vajíčok *Ascaris suum*. V troch experimentoch sa počet vitálnych vajíčok znížil iba o 3,6 %. Indikátorové mikroorganizmy, s výnimkou psychrofilných, ktoré preživali len 24 hodín, boli devitalizované vápenným hydrátom po 60-minútovej expozícii. Teplota stabilizovaného kalu počas experimentov sa výrazne nemenila a pohybovala sa v rozpätí od 21 do 25 °C. pH kalu sa po prídavku $\text{Ca}(\text{OH})_2$ zvýšilo na hodnoty v rozpätí od 12,3 do 12,6. V priebehu experimentov došlo k poklesu hodnôt CHSK, organických látok a celkového dusíka. Hodnoty sušiny kalov sa počas experimentu nemenili.

dezinfekcia; vajíčka *Ascaris suum*; *Salmonella typhimurium*; čistiarske kaly; vápenný hydrát

ÚVOD

Využívanie kalov z čistiarní odpadových vôd je celosvetovým problémom. Z hľadiska životného prostredia, ako aj pre obsah hnojivých zložiek je najvýhodnejším spôsobom ich použitia aplikácia na poľnohospodársku pôdu. Hlavným problémom pri takomto spôsobe likvidácie kalov je obsah patogénnych zárodkov, chemických polutantov i ťažkých kovov (Hamer a Zwiefelhofer, 1986; Plachý a Juriš, 1993; Krupiccer, 1995; Krupiccer ai., 1996). Zo širokého spektra patogénov epidemiologicky, ale aj epizootologicky najvýznamnejšie riziko predstavujú predovšetkým mik-

roorganizmy *Salmonella* spp. a vajíčka helmintov. Frekvencia ich výskytu v kaloch je veľmi vysoká a devitalizačný efekt procesov čistenia odpadových vôd nízky. Z toho dôvodu sa viacero autorov zaoberalo hľadaním vhodných metód, schopných znížiť hygienické riziko pri aplikácii na poľnohospodársku pôdu a zabrániť prenosu patogénnych mikróbov na ľudí i hospodárske zvieratá. Tieto technológie sú založené na rôznych fyzikálnych, chemických a biologických procesoch (kompostovanie, pasterizácia, aeróbná exotermná stabilizácia) – Pike ai. (1988), Novák (1994). Nevýhodou technológií založených na fyzikálnych i niektorých biologických metódach (pasterizácia, anaeróbná

* Práca bola čiastočne financovaná z grantu VEGA 2/2078/95.

termofilná stabilizácia) je ich vyššia energetická náročnosť. Pri používaní chemických dezinfekčných prostriedkov je hlavnou nevýhodou negatívny účinok na životné prostredie, cena a požiadavky na náročnú technológiu aplikácie. Výnimku predstavujú látky, ktoré sú schopné zabezpečiť dezinfekciu čistiarenských kalov, nezaťažujú životné prostredie, sú cenovo dostupné a sú schopné dokonca zvýšiť hnojivové vlastnosti kalov.

Jednou z metód splňujúcich vyššie uvedené kritériá je i vápnenie čistiarenských kalov. Na vápnenie sa využíva vápno vo forme hydroxidu alebo oxidu vápenatého. Oxid vápenatý, ak je prídavaný do kalov, reaguje s vodou v kaloch na $\text{Ca}(\text{OH})_2$ za tvorby tepla (exotermická reakcia). Dosiahnutá teplota a zásadité pH sú rozhodujúcimi dezinfekčnými faktormi (Eckert a i., 1992). Nevýhodou pri jeho aplikácii je náročnejšia technológia, keď je potrebné používať izolované a uzavreté reaktory (Strauch a De Bertoldi, 1985). Vápenný hydrát sa často používa ako flokulant pri odvodňovaní kalov a v závislosti na použitej dávke a vlastnostiach kalov dochádza k vzrastu pH na zásadité. Podmienkou pre aplikáciu je, aby došlo k jeho rovnomernému rozptýleniu v kaloch.

Zámerom našej experimentálnej práce bolo porovnať vplyv dezinfekcie čistiarenských kalov vápenným hydrátom na prežívanie zárodokov *S. typhimurium* a na neembryonované vajíčka *A. suum* v laboratórnych podmienkach.

MATERIÁL A METÓDY

Na stabilizáciu primárnych kalov vápenným hydrátom sme použili laboratórne zariadenie vyrobené z kovovej, dvojpláštvej nádoby s odnímateľným vekom a miešadlom na homogenizáciu obsahu. Do vnútra zariadenia boli pripevnené štyri plastové nádoby s uzáverom a otvormi po obvode, ktoré slúžili na umiestnenie molitanových nosičov s testovanými vajíčkami *A. suum*. V priebehu stabilizácie sme zaznamenávali pH registračným zariadením Bioblock Scientific 93317.

V experimentoch sme použili surový primárny kal zo sedimentačných nádrží ČOV Poprad. Vykonali sme celkom tri experimenty, pričom v každom sme použili 5 l surového kalu s prídavkom komerčne vyrábaného vápenného hydrátu (Vápenný hydrát, ľahký, vzdušný, biely; výrobca Kalcit s. s r. o., Gombasek) v množstve 10 g/l (100 mg/g sušiny kalu). Každý experiment trval päť dní, pričom sme odoberali nosiče a kal na mikrobiologické a fyzikálno-chemické vyšetrenie.

Na otestovanie vplyvu vápenného hydrátu na modelové vajíčka sme použili metódu polyuretánového nosiča (Plachý a Juriš, 1995). Neembryonované vajíčka modelového helminta *A. suum* sme získali pitvou distálnej časti materníc dospelých samíc a boli uložené vo fyziologickom roztoku pri teplote 4 °C. Polyuretánové nosiče sme inokulovali testovanými vajíčkami v množstve asi 5 000 exemplárov do jedného nosiča.

Vitalitu neembryonovaných vajíčok *A. suum* sme zisťovali ich kultiváciou do embryonovaného štádia v termosťate pri teplote 26 °C po dobu 21 dní. Ako kultivačné médium sme použili fyziologický roztok s prídavkom niekoľkých kvapiek $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

Kaly boli pred stabilizáciou inokulované kultúrou *S. typhimurium* (kmeň 14/39 zo zbierky Štátneho zdravotného ústavu v Prahe). Uvedený kmeň sme v priebehu experimentu izolovali na XLD agare (Imuna, Šarišské Michalany). Ostatné mikrobiologické vyšetrenia sme vykonávali podľa ČSN 83 0531. Na kvantitatívny rozbor psychrofilných a mezofilných baktérií sme použili Živný agar č. 2 (Imuna), fekálne koliformných a koliformných baktérií Endo agar (Imuna) a fekálnych streptokokov Selektívny agar na izoláciu fekálnych streptokokov (Imuna).

Ako kontrola boli použité vajíčka z pôvodných kultúr uložené pri teplote 4 °C v primárnom kale inokulovanom kultúrou *S. typhimurium*.

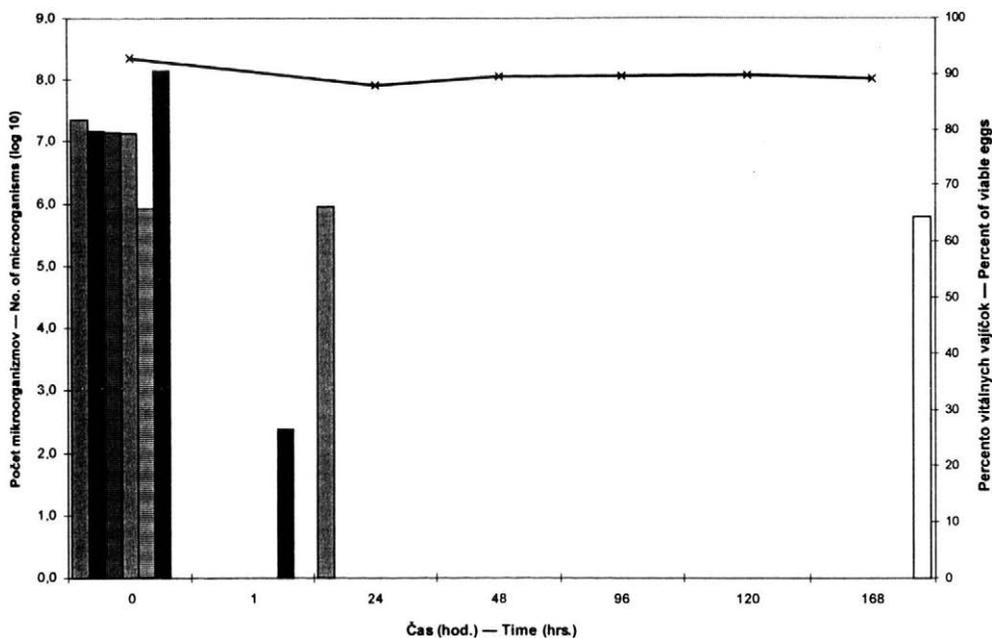
Z fyzikálno-chemických parametrov vápnenia sme sledovali pH, sušinu, CHSK, organické látky, celkový dusík a teplotu kalu. Na získanie týchto parametrov sme použili metódy podľa ČSN 83 0550.

VÝSLEDKY

Kmeň *S. typhimurium* (Sk 14/39) po inokulácii v množstve $1,39 \times 10^8$ v 1 ml prežival v uvedených podmienkach iba 60 minút, keď sme zaznamenali v priemere $2,4 \times 10^2$ zárodokov v 1 ml. V kontrole sme zaznamenali po 60 minútach v priemere $8,07 \times 10^6$ zárodokov a na konci experimentu bol ich počet $6,1 \times 10^5$ zárodokov *S. typhimurium* v 1 ml kalu (obr. 1). Potvrdením vysokého dezinfekčného účinku vápenného hydrátu na mikroorganizmy boli i zistenia o redukcii indikátorových mikroorganizmov, s výnimkou psychrofilných mikroorganizmov. Tie preživali 24 hodín ($9,0 \times 10^5$ v 1 ml), ostatné sledované mikroorganizmy (mezofilné, fekálne koliformné, fekálne streptokoky) boli po prídavku vápenného hydrátu devitalizované do 60 minút.

Po aplikácii vápenného hydrátu v koncentracii 10 g/l kalu, došlo po 168 hodinách stabilizácie k zníženiu vitality vajíčok *A. suum* v troch experimentoch v priemere z 92,8 % iba na hodnotu 89,2 %. Štatistiky sme nezistili vzťah medzi vitalitou vajíčok a časom v priebehu stabilizácie vápenným hydrátom pri dávke 10 g/l. Vysoká hodnota vitálnych vajíčok svedčí o tom, že i napriek vysokému pH kalov po pridaní vápenného hydrátu (>12), nie je zvýšenie pH dostatočné na devitalizáciu vajíčok.

Teplota stabilizovaného kalu počas experimentov sa výrazne nemenila a pohybovala sa v rozpätí od 21 do 25 °C. pH kalu sa po aplikácii $\text{Ca}(\text{OH})_2$ zvýšilo na hodnoty v rozpätí od 12,3 do 12,6. V priebehu experimentov došlo k poklesu hodnôt CHSK (53,24 g/l na konci experimentu), organických látok (62,75 %) a celkového dusíka (4,19 g/l). Hodnoty sušiny kalov (4,84 %) sa počas experimentu nemenili (tab. I).



I. Prežívanie *S. typhimurium*, vajčiek *A. suum* a indikátorových mikroorganizmov – Survival of *S. typhimurium*, *A. suum* eggs and indicator microorganisms

- psychrofilné – psychrophilic
- koliformné – coliforms
- fekálne streptokoky – faecal streptococci
- fekálne koliformné – faecal coliforms
- mezofilné – mesophilic
- *S. typhimurium*
- kontrola – control (*S. typhimurium*)
- ✕ percento vitálnych vajčiek *A. suum* – percent of viable eggs of *A. suum*

I. Fyzikálno-chemické parametre v priebehu dezinfekcie vápenným hydrátom – Physico-chemical parameters in the course of disinfection with hydrated lime

Čas ¹ (h)	Sušina ² (%)	CHSK ³ (g/l)	Organické látky ⁴ (%)	Celkový dusík ⁵ (g/l)	pH
0	4,85	70,45	70,3	6,07	5,51
24	4,78	75,11	66,76	3,93	12,12
48	4,95	57,06	66,44	4,19	12,05
120	4,91	57,69	60,92	3,91	12,14
168	4,84	53,24	62,75	4,19	12,37

aritmetický priemer troch experimentov – arithmetic mean of three experiments

¹time, ²dry matter, ³COD, ⁴volatile matter, ⁵total nitrogen

DISKUSIA

Vysoký počet vitálnych vajčiek *A. suum* svedčí o tom, že zmena pH kalov na alkalické po pridaní vápenného hydrátu neovplyvnila vitalitu vajčiek. V našich experimentoch sme zámerne použili dávku vápen-

ného hydrátu, u ktorej sme mali potvrdenú inými autorami (Strauch, 1988 a iní), že je dostatočná na dezinfekciu mikrobiálnych patogénov, najmä *Salmonella* spp. Tieto zistenia sme potvrdili, keď mikróby *S. typhimurium* i indikátorové mikroorganizmy boli v priebehu 60 minút devitalizované. Po prídavku vápenného

hydrátu sme po 24 hodinách kultivačne neprekročili žiadnu mikrobiálnu aktivitu a kal sa stal z hľadiska mikrobiálneho sterilný, čo podstatne znižuje riziko prenosu mikrobiálnych patogénov na hospodárske zvieratá a následne do potravinového reťazca (C a b a d a j a i., 1995). K podobným zisteniam dospel aj P f u d e r e r (1985), keď zvýšenie pH na hodnotu 12,8 v priebehu stabilizácie zabezpečilo kompletnú inaktiváciu *S. senftenberg*. Rozdielne zistenia sme zaznamenali pri modelových vajíčkach *A. suum*, ktoré preživali experimenty bez výraznejších zmien vitality, čím sme potvrdili zistenia B i t t o n a (1994) o nízkom efekte stabilizácie vápenným hydrátom na propagatívne štádiá endoparazitov. Podobne i Pike a Carrington (1985) poukazujú na nízky účinok vápenia na vajíčka *A. suum*, avšak ak je pH vyššie ako 12, dochádza podľa nich k významnej redukcii vitality už za 7 až 10 dní. Naše experimenty nepotvrdili tento fakt a vitalita vajíčok na 7. deň experimentu sa štatisticky nelíšila od kontroly. Strauch a De Bertoldi (1985) uvádzajú, že na významné zníženie epidemiologického rizika kalov obsahujúcich vajíčka *Ascaris* spp. a *Taenia* spp., je potrebné dosiahnuť pH 12,5 alebo vyššie po dobu dvoch mesiacov. Na základe uvedených experimentov pri stabilizácii vápenným hydrátom v použitej dávke, je potrebné venovať pozornosť tomu fakt, že nezaručuje devitalizáciu propagatívnych štádií helmintov a z tohto pohľadu nie je kal dostatočne dezinfikovaný. Tu sa prejavuje všeobecne známa extrémna tenacita testovaných vajíčok, keď sa všeobecne považuje vzrast pH na uvedené hodnoty za letálny pre propagatívne štádiá helmintov z dôvodu narušenia permeability vaječných obalov.

Hoci náklady na stabilizovanie vápnom sú vyššie, ak sa však takto spracovaný kal používa na hnojenie kyslých pôd, ekonomicky je takýto proces prijateľnejší. Z tohto aspektu je vápenie efektívne hlavne z dôvodu stabilizácie kalov, inaktivácie mikróbov, zvyšovania hnojivej hodnoty kalu a nahradenia periodického vápenia poľnohospodárskej pôdy. Pri aplikácii kalov zo zásaditým pH dochádza i k výraznému zníženiu príjmu ťažkých kovov rastlinami čo je účinným opatrením proti ich vstupu do potravinového reťazca (P a r d u s a N e r u d o v á, 1985).

Pri aplikácii kalov dezinfikovaných vápenným hydrátom je však potrebné vziať do úvahy, že vitalita vajíčok helmintov ostáva zachovaná a preto kaly predstavujú potenciálne riziko pre hospodárske zvieratá i ľudí. Najväčšie riziko pre hospodárske zvieratá pri aplikácii kalov majú vajíčka *Taenia* spp. a *Ascaris* spp. Viacerí autori poukazujú na fakt zvýšeného počtu atypických pneumónii hovädzieho dobytku, vyvolávaných larvami *Ascaris* spp. (Greenway a Mc Graw, 1970; Breza, 1981 a iní). Ide vlastne o syndróm *larva migrans visceralis*, ktorý môže byť spôsobovaný tiež vajíčkami ostatných helmintov (*Toxocara* spp.) diseminovaných do prostredia aj čistiarenskými kalmi. Zníženie tohto rizika je možné predĺžením doby stabilizácie (až na niekoľko mesiacov), aplikáciou kalov na plodiny

ktoré sa neskrmujú na zeleno (kukurica na zrno, cukrová repa a pod.) resp. použitím ďalších technológií schopných devitalizovať uvedené zárodoky.

LITERATÚRA

- BITTON, G.: Wastewater microbiology. Willey-Liss, Inc. 1994.
- BREZA, M.: *Larva migrans visceralis* domácich zvierat z hľadiska epidemiológie antropohelminthozoonóz. Folia Vet., 25, 1981: 77-88.
- CABADAJ, R. – PÍPOVÁ, M. – TUREK, P.: Poultry, eggs, and their products as sources of human Salmonellosis in Slovakia. In: World Veterinary Congress, 3-9 September, Yokohama, Japan, 1995: 168.
- ECKERT, J. – KUTZER, E. – ROMMEL, M. – BÜRGER, H. J. – KÖRTING, W.: Veterinärmedizinische Parasitologie. Berlin, Paul Parey Verlag 1992.
- GREENWAY, J. A. – MCGRAW, B. M.: *Ascaris suum* infection in calves. I. Clinical signs. Can. J. Comp. Med., 34, 1970: 227-237.
- HAMER, G. – ZWIEFELHOFER, H. P.: Aerobic thermophilic hygienisation – a supplement to anaerobic mesophilic waste sludge digestion. Chem. Eng. Res. Des., 64, 1986: 417-424.
- KRUPICER, I.: Vplyv imisii ťažkých kovov na vývin a prežívanie propagačných štádií gastrointestinálnych nematódov oviec v prirodzených ekologických podmienkach. In Zbor. Ref. Bioklimatológia a hygiena chovu hospodárskych zvierat. Košice, UVL 1995: 43-46.
- KRUPICER, I. – JURÍŠ, P. – NOVÁK, P.: Riziká využívania komunálnych kompostov na hnojné účely. Slov. Vet. Čas., 27, 1996: 4-6.
- NOVÁK, P.: Dynamika indikátorových mikroorganizmů v průběhu kompostování zemědělských odpadů. In: Zbor. 2. Ved. Konf. Ekológia a veterinárna medicína, Košice, 24.-25. 5. 1994: 69-73.
- PARDUS, I. – NERUDOVÁ, M.: Úprava kalů pro hnojení. In: Zbor. Ref. Využití kalů z čistíren odpadních vod v zemědělství. Plzeň, ČSVTS 1985: 25-39.
- PFUDERER, G.: Influence of lime treatment of raw sludge on the survival of pathogens, on the digestability of the sludge and on the production of methane: Hygienic investigations. In: STRAUCH, D. – HAVELAAR, A. H. – HERMITE, P. L. (eds.): Inactivation of Microorganisms in Sewage Sludge by Stabilization Processes. London, Elsevier Applied Science 1985: 85-97.
- 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. IAWPRC – Microb. of Water and Wastewater, February 1988 (Separatum, 6 p.).
- PIKE, E. B. – CARRINGTON, E. G.: Inactivation of parasitic ova during disinfection and stabilisation of sludge. In: Proc. of the Fourth Int. Symp. Processing and use of organic sludge and liquid agricultural wastes. Roma, Italy CEC 1985: 198-209.

PLACHÝ, P. – JURIŠ, P.: Hygienisation of community wastewater of the urban Košice area from the point of view of helminthology. Českoslov. Hyg., 38, 1993: 27–33.

PLACHÝ, P. – JURIŠ, P.: Use of a polyurethane carrier for assessing the survival of helminth eggs in liquid biological sludges. Vet. Med. – Czech, 40, 1995: 323–326.

STRAUCH, D. – De BERTOLDI, M.: Microbiological specifications of disinfected sewage sludge. In: Proc. of the Fourth Int. Symp. Processing and use of organic sludge and liquid agricultural wastes. Roma, Italy, CEC 1985: 178–197.

STRAUCH, D.: Improvement of the quality of sewage sludge – microbiological aspects. In: Hygienic aspects of the treatment and use of organic sludge and liquid agricultural wastes. Proceedings of a Workshop of Working-Party 3 „Hygienic Aspects Related to Treatment and Use of Organic Sludge“, Lelystad, Holland, 1988: 121–145.

ČSN 83 0550. Chemický a fyzikální rozbor kalov. 1985.

Došlo 12. 2. 1996

Kontaktná adresa:

MVDr. Peter Plachý, CSc., Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/633 14 11–13, fax 095/633 14 14, e-mail: plachy@linux1.saske.sk

PUBLISH YOUR PAPERS OR YOU WON'T RECEIVE A NEW GRANT!

PUBLIKUJTE NEBO NEDOSTANETE NOVÝ GRANT!

Známé heslo šedesátých let (před jehož naplněním byla naše věda velkoryse chráněna) jsem si dovolil poněkud upravit. Pravidla grantového systému GA ČR předpokládají ukončování grantů uveřejněním dosažených výsledků v časopisech, jejichž redakční rady vyžadují náročné posouzení příspěvku svými lektory. Jak ukázaly závěrečné zprávy projektů, předložené v lednu t.r. po ukončení grantů prvního kola, dávají někteří řešitelé přednost hmotnějším dokladům o svém tříletém úsilí, na které bylo často vynaloženo více než jeden milion korun. Náklady na sepsání, výtisk, rozmnožení a vazbu nejméně deseti výtisků stostránkové zprávy, na jejich rozeslání, na jejich studium nejméně dvěma oponenty, na přípravu posudků, cestovné účastníků oponentního řízení, ztrátu času účastníků tohoto řízení, přípravu a rozeslání zápisu, káva, občas i cukr a jiné nezbytnosti však představují hodnotu vyslání nejméně jednoho pracovníka na dva týdny do zámorí a to by se rozhodně nemusel plavit na voru. A jaký je výsledek? I při náročném a objektivním řízení (které nelze vždy předpokládat) jsou výsledky zcela ztraceny, pokud je autoři stejně neuveřejní. Jsou-li však autoři skutečně vědeckými pracovníky, jistě jim řešení přineslo mnoho

podnětů pro další práci, která jim často nedovolí věnovat přípravě rukopisu potřebnou pozornost. A tak krásně svázané zprávy (dříve v černém plátně se zlatým tiskem za 50 Kčs kus, dnes spíš v jásavém plastu) ozdobí pracovny řešitelů a stanou se novým přírůstkem čísel knihoven jejich pracovišť. A pokud si je někdo jiný než oponentní přečte, tak častěji proto, aby získané informace použil bez citace zdroje než aby citací zasuté a obtížně dostupné práce přispěl k rozšíření věhlasu jejich autorů.

Takže současní a budoucí řešitelé grantů: již při přípravě pokusů myslte na to, v jakém časopisu předkládáte uveřejnění výsledků. Přizpůsobte tomu nikoliv výsledky, ale způsob jejich získání a neztrácejte „body“ utajováním svých skvělých zjištění v nedostupných zprávách. Oponentní projednání nepublikovaných výsledků řešení grantů, udělených GA ČR, by mělo být zcela výjimečné v případech, kdy by uveřejnění výsledků ohrozilo jejich patentové nebo komerční využití nebo když je třeba prokázat, že žádné publikovatelné výsledky nebyly dosaženy přesto, že řešitelé věnovali grantu potřebnou pozornost a finanční prostředky byly účelně využity.

Karel Hraška

P.S.

Věnujte pozornost i názvům svých projektů a prací. Někdy je to to jediné, podle čeho si o Vás udělá představu uživatel databáze projektů, čtenář Bulletinu GA ČR, Věstníku MŠMT nebo jiných zdrojů všeobecných informací. A může být mezi nimi i pan premiér, prezident NKÚ nebo poslanec, hlasující o rozpočtu. Pište je proto česky, vyvarujte se profesionálního slangu a zbytečné vznešenosti. Nejste-li si jisti, podívejte se na význam pro Vás běžných slov jako aklimace, validizace, validace, vokalizace, prekociální, hepatický apod. do slovníku. Možná je nenajdete nejen ve Slovníku jazyka českého, ale ani ve Slovníku cizích slov nebo budete jejich významem trochu překvapeni.

Převzato z Bulletinu Grantové agentury ČR 2/96, str. 16.

POKYNY PRO AUTORY

Časopis uveřejňuje původní vědecké práce, krátká sdělení a výběrově i přehledné referáty, tzn. práce, jejichž podkladem je studium literatury a které shrnují nejnovější poznatky v dané oblasti. Práce jsou uveřejňovány v češtině, slovenštině nebo angličtině. Rukopisy musí být doplněny krátkým a rozšířeným souhrnem. 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 používat jednotky odpovídající soustavě měrových jednotek SI (ČSN 01 1300).

Vlastní úprava rukopisu má odpovídat státní normě ČSN 88 0220 (formát A4, 30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, mezi řádky dvojitě mezery). K rukopisu je vhodné přiložit disketu s textem práce, popř. s grafickou dokumentací pořízenou na PC s uvedením použitého programu. 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 informaci, 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 nedostacích 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 prvních autorů. Odkazy na literaturu v textu uvádějí jméno autora a rok vydání. Do seznamu se zařadí jen práce citované v textu. Na práce v seznamu literatury musí být odkaz v textu.

Klíčová slova mají umožnit vyhledání práce podle sledovaných druhů zvířat, charakteristik jejich zdravotního stavu, podmínek jejich chovu, látek použitých k jejich ovlivnění 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 PŠČ, 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 with the paper text or graphical documentation should be provided with the paper manuscript, indicating the used editor program. 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 41, No. 8, August 1996

CONTENTS

Pajerský A., Tomašovičová O., Kinčeková J., Zubrický P., Koreň J.: Susceptibility and reactivity of sheep to <i>Trichinella spiralis</i> infection.....	233
Šimko Š., Bartko P.: Resistance to antibiotics in <i>Staphylococcus aureus</i> at ewe mastitis, in sheep milk and its products.....	241
Paulík Š., Mojžišová J., Bajová V., Baranová D., Paulíková I.: Lymphocyte blastogenesis to Concanavalin A in dogs with localized demodicosis according to duration of clinical disease	245
Lamka J., Suchý J., Štaud F.: Efficacy of perorally administered ivermectin against larval stages of warble fly (<i>Hypoderma diana</i> B.) in roe deer.....	251
Plachý P., Juriš P., Plachá P., Venglovský J.: Use of hydrated lime for disinfection of model pathogens <i>Salmonella typhimurium</i> and <i>Ascaris suum</i> in sewage sludges	255
INFORMATION	
Hruška K.: Publish your papers or you won't receive a new grant	260

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 41, č. 8, Srpen 1996

OBSAH

Pajerský A., Tomašovičová O., Kinčeková J., Zubrický P., Koreň J.: Vnímovosť a reaktívny prejav oviec k infikovaniu <i>Trichinella spiralis</i>	233
Šimko Š., Bartko P.: Rezistencia na antibiotiká u <i>Staphylococcus aureus</i> pri mastitídach oviec, v ovčom mlieku a výrobkoch z neho	241
Paulík Š., Mojžišová J., Bajová V., Baranová D., Paulíková I.: Blastogenéza lymfocytov po indukcii Concanavalinom A u psov s lokálnou demodikózou vzhľadom k trvaniu klinického ochorenia.....	245
Lamka J., Suchý J., Štaud F.: Účinnosť perorálne podaného ivermektínu proti larválnim štádiám sťahča srnčího (<i>Hypoderma diana</i> B.) u srnčí zvěře.....	251
Plachý P., Juriš P., Plachá P., Venglovský J.: Využitie vápenného hydrátu na dezinfekciu modelových patogénov <i>Salmonella typhimurium</i> a <i>Ascaris suum</i> v čistiarenských kaloch	255
INFORMACE	
Hruška K.: Publikujte nebo nedostanete nový grant.....	260

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA ● Vydává Ústav zemědělských a potravinářských informací ● Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38 ● Sazba: Studio DOMINO – ing. Jakub Černý, Bří. Nejedlých 245, 266 01 Beroun, tel.: 0311/229 59 ● Tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1996

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