

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

10

VOLUME 43
PRAHA
AUGUST 1998
CS ISSN 0375-8427

Mezinárodní vědecký časopis vydávaný z pověření Ministerstva zemědělství České republiky a pod gescí České akademie zemědělských věd

An international journal published under the authorization by the Ministry of Agriculture and under the direction of the Czech Academy of Agricultural Sciences

Editorial Board – Redakční rada

Chairman – Předseda

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

Members – Členové

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

Dr. Milan Fránek, DrSc., 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

Prof. MUDr. Drahomír Horký, DrSc., Faculty of Medicine, Masaryk University, 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

Doc. MVDr. Dr. Jozef Laurinčík, DrSc., Institute of Genetics and Experimental Biology, RIAP, Nitra, Slovak Republic

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

Prof. MUDr. RNDr. 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

World Wide Web (URL): <http://www.clark.cz/vri/casopis.htm>

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 43 vychází v roce 1998.

Přijímání rukopisů: Rukopisy ve třech vyhotoveních je třeba zaslat na adresu redakce: Ing. Zdeňka Radošová, vedoucí redaktorka, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz. Podrobné pokyny pro autory lze vyžádat v redakci.

Informace o předplatném: Objednávky na předplatné jsou přijímány pouze na celý rok (leden–prosinec) a zasílají se na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací, vydavatelské oddělení, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 1998 je 624 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 43 appearing in 1998.

Acceptance of manuscripts: Three 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.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz. Applications for detailed instructions for authors should be sent to the editorial office.

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 1998 is 145 USD (Europe), 152 USD (overseas).

EFFECT OF FREE AND LIPOSOMIZED ALBENDAZOLE ON THE IMMUNE RESPONSES IN HEALTHY AND *TOXOCARA CANIS*-INFECTED MICE*

VPLYV VOLNÉHO A LIPOZÓMOVANÉHO ALBENDAZOLU NA IMUNITNÉ PREJAVY ZDRAVÝCH A *TOXOCARA CANIS* INFIKOVANÝCH MYŠÍ

Z. Borošková¹, E. Dvorožňáková¹, P. Dubinský¹, S. Velebný¹, O. Tomašovičová¹, B. Machnicka²

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

²*Parasitological Institute of the Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland*

ABSTRACT: The effect of free and liposomized albendazole on the lymphoproliferative activity was studied in healthy and *Toxocara canis*-infected mice. The level of specific circulating antibodies was simultaneously assessed in infected animals. A replicated administration of drug-free liposomes to healthy mice considerably reduced the response of T and B cells to non-specific polyclonal activators (Concanavalin A, Lipopolysaccharide, Pokeweed mitogen). Liposomes with incorporated albendazole, administered at a dose of 10 mg/kg b.w. twice a day for 5 days, also suppressed the same cell population activity in healthy mice. On the contrary, free albendazole given to healthy animals stimulated their T- and B-cell activity to polyclonal activators. After infection of mice with *T. canis*, the proliferative activity of both cell populations and the level of specific circulating antibodies were enhanced. A therapy of infected mice with liposomized albendazole partially inhibited the lymphocyte proliferative activity and the level of specific circulating antibodies fell significantly compared with only infected animals. The efficacy of liposomized albendazole against *T. canis* larvae in the muscles during the myotrope-neurotropic phase of their migration was 41.6 to 60.8% and in the brain 52.4 to 60.8%.

mouse; toxocarosis; liposomes; albendazole; immunity

ABSTRAKT: Preskúmal sa vplyv voľného a lipozómovaného albendazolu na lymfoproliferačnú aktivitu zdravých a *Toxocara canis*-infikovaných myší. U zvierat po infikovaní sme zároveň sledovali hladinu špecifických cirkulujúcich protilátok. Opakované podávanie prázdnych lipozómov zdravým myšiam preukázane znížilo odpoveď T a B buniek na nešpecifické polyklonové aktívatory (Concanavalin A, Lipopolysaccharide, Pokeweed mitogen). Lipozómy s inkorporovaným albendazolom, aplikovaným v dávke 10 mg/kg ž.h. dvakrát denne po dobu piatich dní, aktivitu tých istých bunkových populácií u zdravých myší tiež potlačili. Ale naopak, aplikácia voľného albendazolu zdravým zvieratám odpoveď T a B buniek k polyklonovým aktívorom stimulovala. Po infikovaní myší *T. canis* sa lymfoproliferačná aktivita obidvoch bunkových populácií a hladina špecifických cirkulujúcich protilátok zvýšila. Po terapii infikovaných myší lipozómovaným albendazolom došlo k čiastočnej inhibícii proliferácie lymfocytov a hladina špecifických cirkulujúcich protilátok významne poklesla, v porovnaní s len infikovanými zvieratami. Účinnosť lipozómovaného albendazolu na larvy *T. canis* v svalstve v myotropo-neurotropnej fáze migrácie lariev bola 41,6 až 60,8 % a na larvy v mozgu 52,4 až 60,8 %.

myš; toxokaróza; lipozómy; albendazol; imunita

INTRODUCTION

One of many side effects of benzimidazole derivatives is the exposure of the host immune system. This therapy entails allergic and autoimmune reactions, stimulates T suppressors in the host organism and affects the

production of immunocomplexes (Astafyev, 1988; Cuellar et al., 1990). The adverse effects of treatment may also be caused by the immunomodulative properties of benzimidazoles themselves (Ozeretskaya, 1980). Depending on the species and strain of the animal, the drug dose levels and the application time may induce changes in the immunostatus of the

* Partially supported by the Scientific Grant Agency – VEGA (Grant No. 2/5012/98).

infected host (Ozeretskoykaya, 1980; Dvořožířáková aj., 1997).

One of the possibilities of enhancing the efficacy of albendazole is its incorporation into liposomes, which influence the pharmacokinetics of drugs, their distribution in the organism (Fielding, 1991) and have adjuvant effect on the host immune responses (Alving, 1991; Hřčková and Velebný, 1997; Velebný et al., 1995, 1996).

The aim of this study was to investigate the proliferative response of T and B lymphocytes and the level of specific antibodies after the administration of free and liposomized albendazole (lipABZ) to healthy and *Toxocara canis*-infected C57BL6 mice. The efficacy of lipABZ against *T. canis* larvae migrating in the host muscles and brain was evaluated in the same animals.

MATERIAL AND METHODS

Animals and experimental design

Experiments were conducted on 144 inbred C57BL6 female mice divided into six groups of 24 animals each. The mice were kept under a 12hr light regime (12hr light and 12hr dark) at 19–21 °C and 56% humidity on a freely available standard diet (commercial pellets) and water.

Group 1 consisted of healthy, uninfected and untreated mice.

Group 2 was composed of healthy mice given drug-free liposomes at a dose of 20 mg phospholipids per g b.w. twice a day for 5 days from day 28 to day 32 of the experiment.

Group 3 comprised healthy mice treated with free albendazole at 10 mg/kg b.w., twice a day for 5 days (total dose 100 mg/kg), at the same time as Group 2.

Group 4 of healthy mice was given liposomized albendazole (lipABZ) at 10 mg/kg b.w., twice a day for 5 days (total dose 100 mg/b.w.), at the same time as Group 2.

Group 5 was infected by oral probe with a single dose of 1000 *T. canis* eggs per mouse.

Group 6 was infected with *T. canis* like Group 5 and dehelminthized with lipABZ at 10 mg/kg b.w., twice a day for 5 days (total dose 100 mg/kg) at the same time as Group 2.

T. canis eggs were isolated from the uteri of females, recovered after dehelminthization of infected puppies, and incubated in 0.1N H₂SO₄ at room temperature for 28 days to reach infective stage.

Splenic lymphocytes from all six animal groups were isolated on day 0 (prior to the experiment) and on experimental days 14, 28, 35, 42, 56, 70 and 84. Blood samples were also taken on the same days from the tail of animals in Groups 5 and 6 to assess the level of specific antibodies. Each given day three mice of each group were sacrificed and samples from spleen and serum were examined separately.

Proliferation of T and B lymphocytes

Cells, isolated from splenic homogenate under sterile conditions, were washed twice with Dulbecco's PBS (pH 7.2) and once with RPMI 1640. Erythrocytes were lysed in 0.84% NH₂Cl and lymphocytes were diluted to a concentration of 5 x 10⁴ cells per 1 ml. Concanavalin A (ConA), mostly for T cells Lipopolysaccharide (LPS) mostly for B cells and Pokeweed mitogen (PWM) for both cell populations (all products of SIGMA) were used as polyclonal activators of the immunocompetent cells. They were used at a concentration of 5 l/ml. The lymphocytes and mitogens were placed in 200 µl of culture medium (RPMI 1640 with 5% bovine foetal serum and gentamicin at a concentration of 1 ml per l) in Eppendorf tubes and incubated under sterile conditions in CO₂ at 37 °C for 72 h. The test-tubes were than filled with 20 µl of 3,4-dimethylthiazole-2,5-diphenyltetrazolium bromide (SIGMA). The sediment after centrifugation was supplemented with 200 µl of dimethylsulphoxide (SERVA) – Page et al. (1988). DNA synthesis was measured spectrophotometrically at ^E540 and ^E680 nm. Cell activation rate was expressed as a stimulation index (SI) according to the formula:

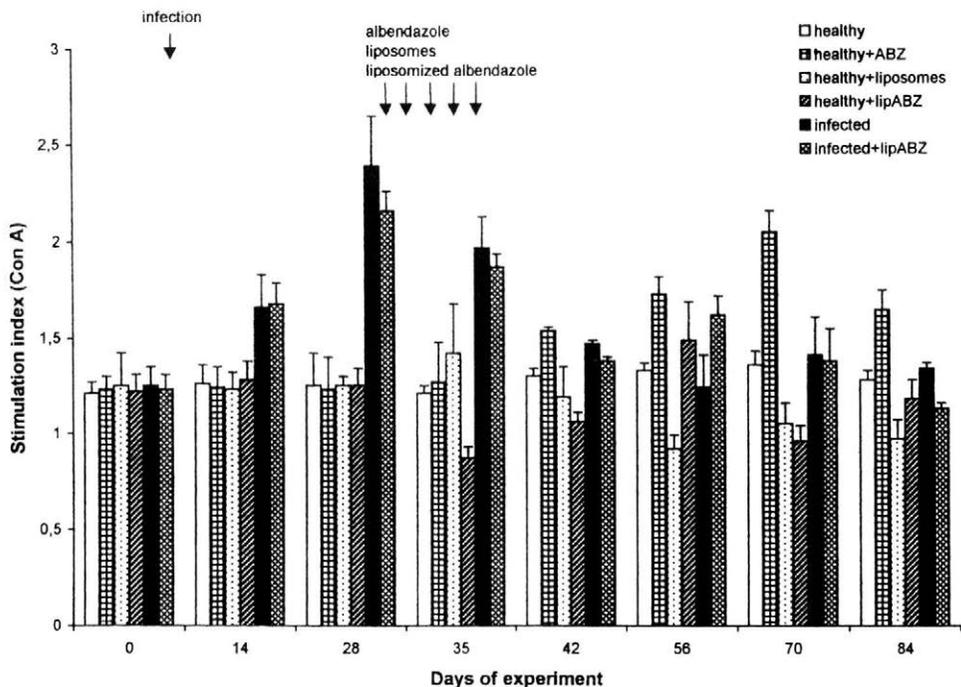
$$SI = \frac{E_{540} - E_{680} (\text{stimulated cells})}{E_{540} - E_{680} (\text{nonstimulated cells})}$$

ELISA for detection of specific circulating antibodies

Sera were examined by ELISA (Havasiová and Reiterová et al., 1995) using E/S antigen prepared by the method of de Savigny (1975). *T. canis* larvae (L3) were incubated in RPMI 1640 with addition of gentamycin at a concentration of 1 ml/l in a thermostat at 37 °C for 2–3 months under sterile conditions. The accumulated metabolites were dialyzed against physiological solution pH 7.2 at 4 °C for 24 hrs. Then they were concentrated by means of polyethylenglycol and stored at –20 °C until used. Anti-mouse, peroxidase-labelled IgG (SwAM-Ig-Px: Institute for Sera and Vaccines, Prague), diluted 1 : 2 000, and O-phenylenediamine with H₂O₂ were used as a conjugate. The assay was evaluated spectrophotometrically at 492 nm. The quadruple mean values for pooled negative control sera were considered as a cut-off in ELISA. The OD values > cut-off were positive and < cut-off negative.

Liposomes and of liposomized albendazole preparation

Albendazole (SmithKline Beecham) was incorporated into liposomes by the method of Bingham et al. (1965). Chloroformo-methanol (2 : 1 v/v) mixture, containing 0.332 mmol phospholipon 100H (Nattermann), 0.0095 mmol cholesterol, 0.047 mmol dicetylphosphate (SERVA) and 0.540 mmol albendazole was evaporated under a vacuum. The evaporation residue was dehydrated by adding 160 ml buffered saline (pH). ABZ-incorporated liposomes were measured on



1. Proliferative response of T cells to Concanavalin A after administration of free and liposomized albendazole (lipABZ) to healthy and *Toxocara canis*-infected mice

Legend:

- Group 1 – healthy mice
- Group 2 – healthy mice given drug-free liposomes
- Group 3 – healthy mice given free albendazole
- Group 4 – healthy mice given liposomized albendazole
- Group 5 – mice infected with 1 000 eggs of *T. canis*
- Group 6 – mice infected with 1 000 eggs of *T. canis* and dehelminthized with lipABZ

a Coulter Counter apparatus (man. by Coulter Electronics Ltd). The liposomes ranged between 8.8–5.93 μm in diameter. The size of as much as 73.1% of these particles ranged between 2.02–4.76 μm . The content of drug in liposomes was determined by spectrophotometric absorption analysis of chloroformo-methanol solution of liposomized ABZ at 295 nm. Liposomized albendazole contained 0.9 mg of drug/ml.

Isolation of *T. canis* larvae from organs

The whole brain and all muscles were examined on days 10, 24, 38 and 52 after the last dose of the drug. Larvae were isolated from tissues (Velebný et al., 1992) in artificial digestive solution (1% pepsin 10 000 U and 0.45% hydrochloric acid), sedimented and counted under microscope at a 60-fold magnification.

Statistical evaluation

Probability significance was determined by a two-tailed Student's test, assuming equal variances. Statis-

tical significance for all comparisons was set at $P < 0.05$ or $P < 0.01$.

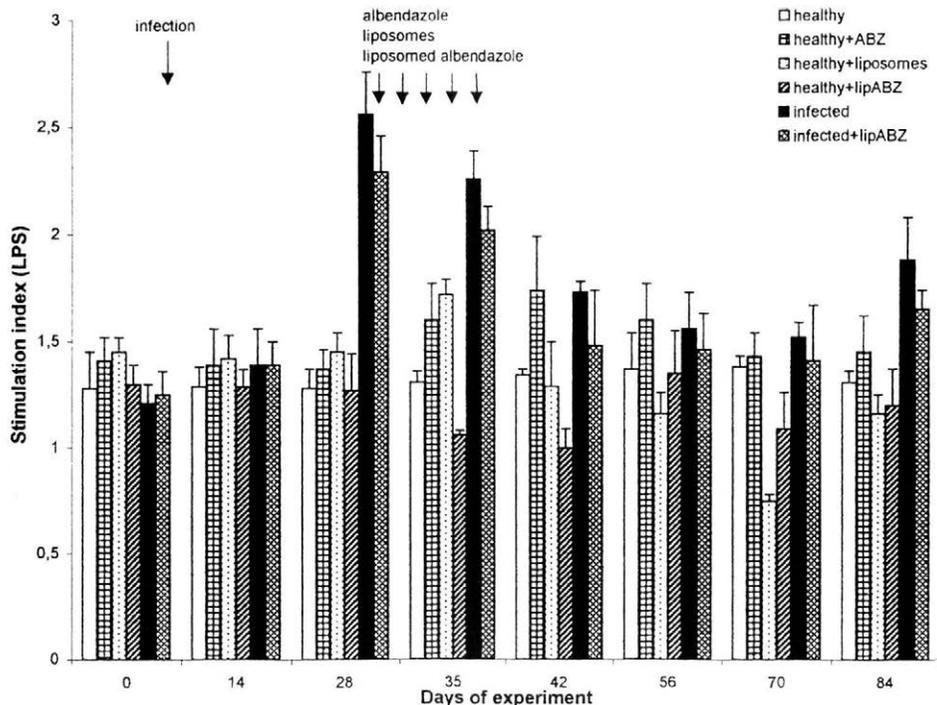
RESULTS

Proliferative response of T and B lymphocytes to polyclonal activators

The lymphoproliferative activity in Group 1 (healthy, uninfected and untreated animals) showed almost no variation throughout the experiment (Figs. 1–3).

ConA (Fig. 1)

SI values in Group 2 (healthy mice, treated with drug-free liposomes), after a short moderate increase, remained below the SI values for Group 1. From day 24 after liposome application this decrease was statistically significant ($P < 0.01$). Compared with Group 1, Group 3 (healthy mice, treated with free ABZ) exhibited an enhanced activity of T cells from day 3, with



2. Proliferative response of B cells to lipopolysaccharide after administration of free and liposomized albendazole (lipABZ) to healthy and *Toxocara canis*-infected mice

Legend: see Fig. 1

maximum *SI* on day 38. From day 10 after drug administration until the termination of the experiment the response of T cells was significant ($P < 0.05$; $P < 0.01$).

In Group 4 (healthy animals, treated with lipABZ) the phases of marked decline in *SI* alternated with their moderate increase. Compared with Group 1, *SI* values for Group 4 were significantly ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) lower only on days 3, 10 and 38 after treatment with lipABZ. In Groups 5 (infected mice) and 6 (infected, lipABZ-treated mice), the *SI* values curve followed almost the same pattern throughout the entire experiment, with the values for Group 6 being insignificantly lower than for Group 5. The different *SI* values in Groups 5 and 6 were not statistically significant except for day 3, 10 and 42 after treatment ($P < 0.05$).

LPS (Fig. 2)

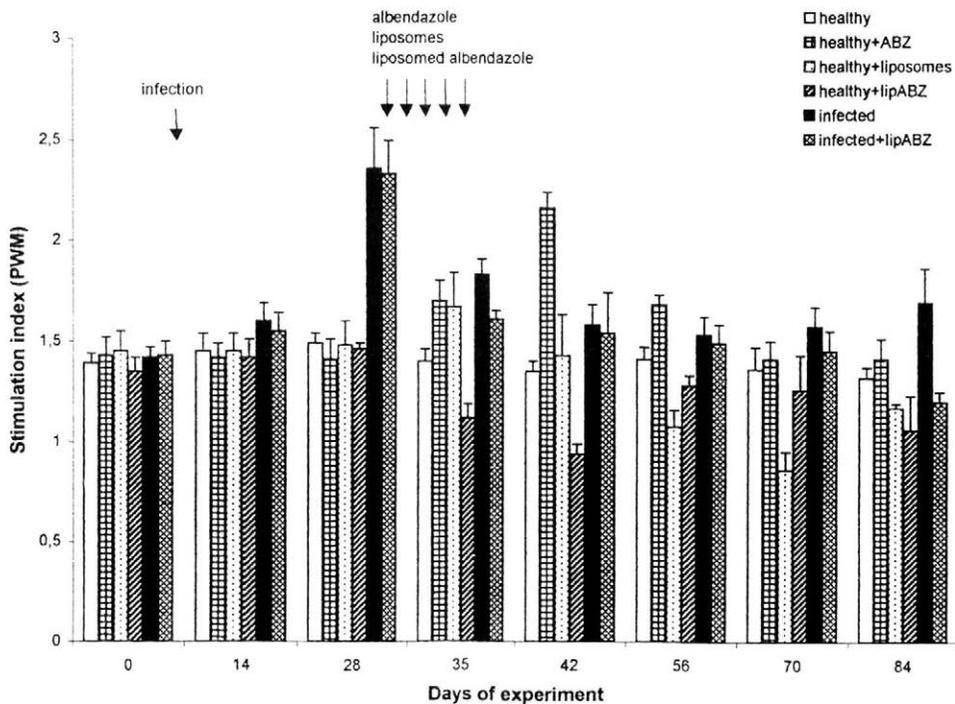
Like with ConA, the response of T cells to LPS in Group 2 was suppressed for most of the experiment, with the most conspicuous decline in their mitotic activity being observed on day 38 after liposome administration ($P < 0.01$). On the contrary, animals in Group 3 compared with Group 1 exhibited a short-term elevated activity of T cells. Statistically significant ($P < 0.05$) were only on day 10 after treatment.

A short-term inhibition of the values in Group 4, recorded on days 3 and 10 after lipABZ administration was significant compared with Group 1 ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively). A noticeable stimulation of the cell activity occurred in Groups 5 and 6, with maximum *SI* observed on day 28 p. i., with the only difference in an insignificantly lower proliferative response recorded in Group 6 for the duration of the experiment. The differences in values among Groups 5 and 6 were not statistically significant.

PWM (Fig. 3)

A considerable inhibition of the proliferative activity of T and B cells was detected in Group 2 compared with Group 1. The inhibitory effect of liposomes in Group 2 was noticeably manifested from day 24 after liposome administration ($P < 0.05$) until the end of the experiment.

On the other hand, the administration of free ABZ largely stimulated the response of both cell populations to the polyclonal activator and significantly ($P < 0.01$) increased *SI* values on days 3, 10 and 24 post treatment. A significant ($P < 0.05$; $P < 0.01$) inhibition of the lymphocyte proliferative activity in Group 4, compared with Group 1, was observed from day 3 to day 24 after



3 Proliferative effect of T and B cells to Pokeweed mitogen after administration of free and liposomized albendazole (lipABZ) to healthy and *Toxocara canis*-infected mice

Legend: see Fig. 1

treatment with lipABZ. The *SI* value curve in Groups 5 and 6 followed the same pattern, with the increase recorded from day 14 and maximum reached on day 28 p. i. The lower *SI* values in Group 6 compared with Group 5 were significant ($P < 0.05$) only on day 3 post treatment.

Specific circulating antibodies (Fig. 4)

The cut-off in ELISA was considered $OD = 0.400$. Group 5 had a noticeably increased level of antibodies from day 35, with maximum titre values on day 42 p. i. In Group 6 the antibodies were only slightly elevated with the maximum reached on day 24 after treatment. Compared with Group 5, the antibodies in Group 6 had significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$) lower titres from day 3 to day 24 after treatment.

Effect of liposomized albendazole on *T. canis* larvae (Tab. 1)

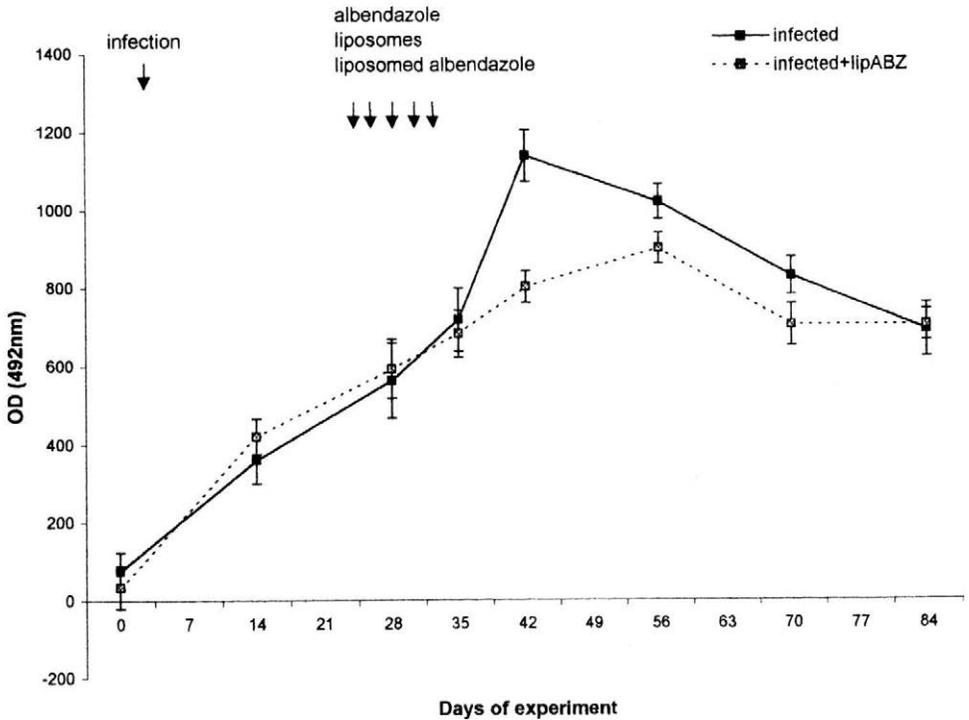
The larval egg count in the muscles of Group 6 treated with lipABZ was reduced by 41.5–60.8% compared with Group 5. The greatest reduction was recorded on day 84 p.i. The larval count in the brain was reduced between 52.4 and 68.2%. The lowest reduction

was found on day 42 p.i. and the highest on day 56 p.i. The difference between the mean larval count in the muscles and the brain was statistically significant ($P < 0.05$).

DISCUSSION

Benzimidazole derivatives have been known to exert embryotoxic, carcinogenic, neurotoxic and other side effects, but little is known about their influence on the immune system in helminthic diseases. Moreover, the existing data about their effect on the host immune reactivity are inconsistent and depend on the kind of benzimidazole derivative, its dose level and on a particular helminthosis (Barta et al., 1986; Fallon et al., 1993; Džabárova et al., 1994; Jacobs et al., 1996). It is possible to enhance the efficacy of benzimidazoles by their incorporation into liposomized vesicles, and thus to ensure the prolonged transport of the drug into the organism (Velebný et al., 1997).

Although liposomes have been known for some time for their immunoadjuvant effect, little attention has been paid to the direct effect of phospholipids on the immune system of the healthy organism. Our findings suggest that drug-free liposomes in healthy animals inhibit the



4. Dynamics of specific circulating antibodies after administration of liposomized albendazole (lipABZ) to mice infected with *Toxocara canis*

Legend:

- mice infected with 1 000 eggs of *T. canis*
- - ■ - - mice infected with 1 000 eggs of *T. canis* and dehelminthized with lipABZ

I. Effect of liposomized albendazole on *Toxocara canis* larvae in mice

Localization of larvae	Mice group	Number of <i>T. canis</i> larvae in 1 g of tissue and their reduction after treatment							
		day 42 p.i.		day 56 p.i.		day 70 p.i.		day 84 p.i.	
		$\bar{x} \pm S.D.$	reduction of larvae (%)	$\bar{x} \pm S.D.$	reduction of larvae (%)	$\bar{x} \pm S.D.$	reduction of larvae (%)	$\bar{x} \pm S.D.$	reduction of larvae (%)
Muscles	group 5	31.0 ± 3.7	—	29.4 ± 1.2	—	27.1 ± 4.0	—	26.8 ± 3.8	—
	group 6	16.6 ± 1.2	46.4	17.2 ± 3.4	41.5	15.2 ± 3.5	43.9	10.5 ± 1.4	60.8
Brain	group 5	491.2 ± 55.3	—	400.0 ± 12.9	—	601.0 ± 20.9	—	568.2 ± 16.7	—
	group 6	233.8 ± 29.4	52.4	127.3 ± 9.5	68.2	209.0 ± 9.5	65.2	191.5 ± 2.9	66.3

proliferative response of splenic T- and B-cell populations for almost the entire experiment since their administration. The results show that drug-free liposomes given to healthy animals inhibit the functional activity of cells, more that of T cells than of B cells. This inhibition concerns mainly the response of T cells to ConA to which according to Stobo (1980), primarily the subpopulation of cytotoxic T lymphocytes responds. It cannot be deduced whether this is the result of a slow increase in the absolute number of individual

subpopulations or of the reduced number of surface receptors for individual subpopulations.

Contrary to drug-free liposome vesicles, albendazole incorporated into the vesicles and given to healthy mice moderately enhanced the proliferative activity of T and B lymphocytes, which was the most conspicuous in the cell response to ConA and PWM. The enhancement of the lymphoproliferative activity after the administration of free ABZ to healthy animals is likely to be associated with the stimulative effect of free drug.

Our previous study (Borošková et al., 1996) also showed that therapy with free ABZ increased the lymphoproliferative activity of mice with experimental toxocariasis, while the level of specific antibodies remained unchanged.

The strongest lymphoproliferative response to polyclonal activators was observed after infection of animals. After their treatment with lipABZ, however, *SI* values did not reach the level of those in untreated infected animals. Liposome vesicles alone are not immunogenic and for assertion of their adjuvant effect they require the incorporation of antigen (Allison, 1979; Velebný et al., 1995). Since in our study not antigen but only drug was incorporated into liposomized particles, their immunoadjuvant effect was unlikely.

Animals treated with lipABZ had a significantly inhibited production of specific circulating antibodies throughout the most of the experiment. A weaker humoral response occurred as early as the first week after drug administration and on day 35 p.i., i.e. at the time when migrating *T. canis* larvae reach as far as the brain. Decreased levels of antibodies after treatment of lambs with another benzimidazole (fenbendazole) were also reported by Cabaj et al. (1994). This anthelmintic, however, was given in suspension and animals were immunized with nonspecific antigens. The reduced levels of circulating antibodies after lipABZ treatment in our studies could have been connected with the suppression of the functional activity of B cells, responsible for their production. Contrary to these results, treatment of experimental larval toxocariasis with another benzimidazole derivative (mebendazole) and with diethylcarbamazine showed that the temporary decrease in the level of antibodies was succeeded by their further increase and persistence (Kato, 1973; Cuel-lar et al., 1990).

According to some authors, the influencing of the immune system with benzimidazoles may result from a release of large numbers of antigens after the destruction of larvae by drug (Fallon et al., 1993; Džabárová et al., 1994). We believe that in our study the decreased lymphocyte proliferation rate and the significant suppression of specific antibody production in infected and treated animals may also partially be attributed to the inhibited production of E/S antigen by *T. canis* larvae. ES antigens in the case of toxocariasis are considered as the most effective immunogenes produced by larvae (Loyd, 1987).

The results obtained suggest that the inhibitory effect of liposomized drug on the immunocompetent cells of healthy and infected animals and the decreased level of specific anti-*Toxocara* antibodies may entail the changes in the immunological balance of the healthy and the infected host. This impairment could affect the result of pharmacotherapy and the susceptibility to infection, as it was observed in the treatment of other helminthoses (Džabárová et al., 1994). In this connection, the immunomodulatory effect of albendazole

could have a relationship to the induction of resistance to anthelmintic, which is the subject of studies with other antiparasitic drugs (Cox, 1992; Doenhoff and Davies, 1992).

Despite the negative effect of drug-free liposomes on the selected immune parameters, their role in the improvement of drug pharmacokinetics in larval toxocariasis is indisputable (Velebný et al., 1997). In following the effect of lipABZ on the reduction of larval count, it was observed that the dynamics of *T. canis* larval count reduction in the muscles of mice after drug-administration was taking a relatively steady course for 38 days since the last dose, i.e. until day 70 p.i.

A moderate reduction in larval count was recorded as late as day 84 p.i. On the contrary the utmost reduction in the larval count in the brain (68.2%) was observed as early as day 24 after the termination of treatment, i.e. on day 56 p.i. A mean reduction in the larval count in the mouse brain was by some 15% higher than that in the muscles. This finding leads to the assumption that the biological availability of liposome-incorporated albendazole was higher in the brain than in the muscles.

Albendazole given as pure substance is known for its larvicidal effect on *T. canis* larvae in the brain (Delgado et al., 1989). This suggests that the drug has the properties by which it is able to bypass the blood-brain barrier (BBB). With respect to its chemical structure, albendazole is classed with base compounds that are transported through the BBB. The more lipophilic the base compound, the easier is the transport (Terasaki and Tsuji, 1994). The same authors believe that the use of a suitable transport system is one of the possibilities of increasing the drug permeability through the BBB. Our results suggest that liposomes contribute to the enhanced transport of albendazole through the BBB.

Based on the mentioned findings and on the results of this study, we believe that the main reason for the enhanced larvicidal efficacy of albendazole against *T. canis* larvae in the brain is the higher lipophilicity of liposomes compared with the drug alone.

REFERENCES

- ALLISON, A. C. (1979): Mode of action of immunological adjuvants *J. Reticuloendothel. Soc.*, 26, 619-630.
- ALVING, C. R. (1991): Liposomes as carriers of antigens and adjuvants. *J. Immunol. Methods*, 140, 1-13.
- ASTAFJEV, B. A. (1988): Immunological reactions in the pathogenesis and clinical course of helminthiases. *Gel'mint. Lab.*, 36, 4-16.
- BANGHAM, A. D. - STANDISH, M. M. - WATKINS, J. C.: Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Molec. Biol.*, 13, 238-247.
- BARTA, O. - STEWART, T. B. - SHAFFER, L. M. - HUANG, L. J. - SIMMONS, L. A. (1986): *Ascaris suum* infec-

- tion in pigs sensitizes lymphocytes but suppresses their responsiveness to phyto mitogens. *Vet. Parasitol.*, *21*, 25–36.
- BOROŠKOVÁ, Z. – ŠOLTÝS, J. – DUBINSKÝ, P. – TOMAŠOVIČOVÁ, O. – VELEBNÝ, S. – DVOROŽNÁKOVÁ, E. – MACHNICKA, B.: Imunitné prejavy po dehelmintizácii myši pri experimentálnej toxokaróze. In: Sbor. Ref. České a slovenské helmintologické dny, Měřín, Slapská přehrada 11.–13. června 1996. 44 s.
- CABAJ, W. – STANKIEWICZ, M. – JONAS, W. E. – MORE, L. G. (1994): Fenbendazole and its effect on the immune system of the sheep. *N. Z. Vet. J.*, *42*, 216–220.
- COX, F. E. G. (1992): Interactions between chemotherapy and immunity in bovine theileriosis. *Parasitology*, *S105*, 79–84.
- CUELLAR, C. – FENOY, S. – AGUILLA, C. – GUILLEN, J. L. (1990): Evaluation of chemotherapy in experimental toxocarosis by determination of specific immune complexes. *J. Helminth.*, *64*, 279–289.
- DELGADO, O. – BOTTO, C. – MATTEI, R. – ESCALANTE, A. (1989): Effect of albendazole in experimental toxocarosis of mice. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, *83*, 621–624.
- DOENHOFF, M. J. – DAVIES, A. J. S. (1992): Hypothesis: impaired immunity as a factor which contributes to the spread of drug-resistance. *Parasitology*, *S105*, 103–105.
- DVOROŽNÁKOVÁ, E. – BOROŠKOVÁ, Z. – DUBINSKÝ, P. – VELEBNÝ, S. – TOMAŠOVIČOVÁ, O. – MACHNICKA, B. (1997): Proliferative response of T and B lymphocytes of two mouse strains treated for experimental larval toxocarosis. *Helminthologia*, *34*, 121–126.
- DŽABAROVA, V. I. – VERETNIKOVA, N. L. – KOVROVA, E. A. (1994): Experimental drug therapy of echinococcus. *Med. Parazit. Parazit. Bolez.*, *1*, 26–29.
- FALLON, P. G. – COOPER, R. O. – PROBERT, A. J. – DOENHOFF, M. J. (1993): Immunodependent chemotherapy of schistosomiasis. *Parasitology*, *S105*, 41–48.
- FIELDING, R. M. (1991): Liposomal drug delivery. Advantages and limitations from a clinical pharmacokinetic and therapeutic perspective. *Clin. Pharmacokinet.*, *21*, 155–164.
- HAVASIOVÁ-REITEROVÁ, K. – TOMAŠOVIČOVÁ, O. – DUBINSKÝ, P. (1995): Effect of various doses of infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs on the humoral response and distribution of larvae in mice. *Parasitol. Res.*, *81*, 13–17.
- HRČKOVÁ, G. – VELEBNÝ, S. (1997): Effect of praziquantel and liposome-incorporated praziquantel on peritoneal macrophage activation in mice infected with *Mesocostoides corti tetrahyridia* (Cestoda). *Parasitology*, *114*, 475–482.
- JACOBS, D. E. – HUTCHINTON, M. J. – ABBOT, E. M. (1996): Evaluation of the effect of the fenbendazole sustained-release intraruminal device on the immunity of calves to lungworm. *Vet. Rec.*, *139*, 60–63.
- KATO, N. (1973): Studies on experimental toxocarosis. 3. Resistance against challenge infection in infected or nonimmunized mice and treatment with diethylcarbamazine of infected mice. *Acta Schol. Med. Univ. Gifu.*, *21*, 159–168.
- LLOYD, S. (1987): Immunology of *Toxocara canis* and visceral larva migrans. In: SOULSBY, E. J. L. (ed.): *Immune Responses in Parasitic Infections*. Vol. 1. Florida. CRC Press Inc., pp. 299–324.
- OZERETSKOVSKAYA, N. N. (1980): Chemotherapy of parasitic diseases and immunosuppression. *Med. Parazit. Parazit. Bolez.*, *46*, 3–12.
- PAGE, M. – BEJAOUNI, N. – CIQO-MARS, B. – LEMIEUX, P. (1988): Optimization of the tetrazolium based colorimetric assay for the measurement of cell number and cytotoxicity. *Int. J. Immunopharmacol.*, *10*, 785–793.
- SAVIGNY, D. H. de (1975): *In vitro* maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in diagnostic test for visceral larva migrans. *J. Parasitol.*, *61*, 781–782.
- STOBO, J. D. (1980): Mitogens. *Clin. Immunol.*, *4*, 55–72.
- TERASAKI, T. – TSUJI, A. (1994): Drug delivery to the brain utilized blood-brain barrier transport systems. *J. Control. Release*, *29*, 163–169.
- VELEBNÝ, S. – TOMAŠOVIČOVÁ, O. – STPICZYSKA, R. (1992): Pharmacokinetics of ³H-cambendazole in mice in the course of experimental trichinellosis. *Helminthologia*, *29*, 207–210.
- VELEBNÝ, S. – HRČKOVÁ, G. – POSPÍŠILOVÁ, D. – ŽUFFA, T. (1995): Adjuvant effect of liposomes. *Slov. Vet. Čas.*, *1*, 20–24.
- VELEBNÝ, S. – TOMAŠOVIČOVÁ, O. – HRČKOVÁ, G. – DUBINSKÝ, P. (1996): Effect of combined therapy with anthelmintics and an immunomodulator on the elimination of the migrating *Toxocara canis* larvae in the paratenic host. *Helminthologia*, *33*, 181–186.
- VELEBNÝ, S. – TOMAŠOVIČOVÁ, O. – HRČKOVÁ, G. – DUBINSKÝ, P. (1997): *Toxocara canis* in mice: Are liposomes and immunomodulator able to enhance the larvicidal effect of the anthelmintic? *Helminthologia*, *34*, 147–153.

Received: 98–03–06

Accepted after corrections: 98–08–04

Contact Address:

MVDr. Zora BOROŠKOVÁ, CSc., Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovenská republika
Tel. +421 95 633 14 11–13, fax +421 95 633 14 14, e-mail: pausav@saske.sk

OCCURRENCE OF COCCIDIA (*CARYOSPORA NEOFALCONIS* AND *CARYOSPORA KUTZERI*) IN BIRDS OF PREY IN FALCON BREEDING FACILITY IN MILOTICE IN THE CZECH REPUBLIC

VÝSKYT KOKCIDIÍ (*CARYOSPORA NEOFALCONIS* A *CARYOSPORA KUTZERI*) U DRAVÝCH PTÁKŮ V ODCHOVNĚ SOKOLOVITÝCH DRAVCŮ V MILOTICÍCH V ČESKÉ REPUBLICE

I. Pavlík¹, J. Černík¹, J. Bárta², J. Kundera², Z. Pecka³

¹ *Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic*

² *Falcon Breeding Facility, Milotice, Czech Republic*

³ *Institute of Parasitology, Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice, Czech Republic*

ABSTRACT: Parasitological examinations of 430 faecal samples collected from 91 birds of prey kept in the Falcon Breeding Facility in Milotice belonging to 10 species were conducted in 1991–1992. *Caryospora neofalconis* was first detected in 4 falcons suffering from diarrhoea and lethargy in 1991. Subsequently oocysts *C. neofalconis* were found in 68 samples collected from 30 birds. The first finding of *C. kutzeri* was recorded in 1992 in faecal samples from a clinically normal gyrfalcon (*Falco rusticolus*) imported from Denmark. Subsequent examinations of 327 faecal samples demonstrated oocysts of *C. kutzeri* in 11 of the 77 birds examined. Concurrent infection by oocysts of both species was found in one kestrel (*F. tinnunculus*). Repeated examinations demonstrated that *C. neofalconis* was replaced by *C. kutzeri* in two hobby falcons (*F. subbuteo*) and two saker falcons (*F. cherrug*). Of the falcons showing weight loss, lethargy and diarrhoea, seven were infected by *C. neofalconis* and three by *C. kutzeri*. Treatment of the infected birds with Sulfakombin (Galena, Opava, Czech Republic) resulted in full clinical recovery and suppression of oocysts shedding for several weeks. Although oocysts shedding resumed later, no clinical signs developed in the prior treated animals.

Caryospora neofalconis; *Caryospora kutzeri*; birds of prey; diagnostics; therapy; prevention

ABSTRAKT: V letech 1991 až 1992 bylo vyšetřeno 430 vzorků trusu 91 dravých ptáků 10 druhů z Odchovny sokolovitých dravců v Miloticích. Druh *Caryospora neofalconis* byl poprvé zjištěn v roce 1991 u čtyř sokolovitých dravců s příznaky průjmu a apatie. Celkem byly oocysty tohoto druhu zjištěny postupně v 68 vzorcích trusu 30 sokolovitých dravců. Druh *Caryospora kutzeri* se poprvé vyskytl v roce 1992 v trusu importovaného zdravého sokola loveckého (*Falco rusticolus*) z Dánska. Po jeho uhybnutí z důvodu perikarditidy byly zjištěny ojedinělé oocysty v tenkém střevě oproti masivnímu nálezu v obsahu tlustého střeva. V následujících vyšetřeních 327 vzorků trusu 77 dravců byly oocysty tohoto druhu postupně prokázány u 11 sokolovitých dravců. Současně oba druhy kokciidií byly zjištěny u poštolky obecné (*F. tinnunculus*). U dvou ostřížů lesních (*F. subbuteo*) a dvou rarohů velkých (*F. cherrug*) se při opakovaném vyšetření vyskytl nejdříve druh *C. neofalconis* a potom druh *C. kutzeri*. Z 10 sokolovitých dravců s klinickými příznaky hubnutí, apatie a průjmu byly u sedmi dravců zjištěny kokciodie druhu *C. neofalconis* a u tří dravců kokciodie druhu *C. kutzeri*. Při terapii se osvědčil Sulfakombin, který způsobil vymizení klinických příznaků a zastavení vylučování oocyst na několik týdnů. Pozdější průkaz oocyst u léčených dravců již nebyl doprovázen klinickými příznaky.

Caryospora neofalconis; *Caryospora kutzeri*; draví ptáci; diagnostika; terapie; prevence

INTRODUCTION

Infections of raptors by coccidia of the family Eimeriidae, genera *Eimeria* (Schwalbach, 1959; Huber, 1964) and *Isospora* (Scholtyscek, 1954, 1956) have been described. Also of importance are coccidia of the genus *Caryospora* which includes more than 30 species and infects particularly birds of prey

and reptiles (Upton et al., 1986). Two species of caryosporan coccidia, *C. neofalconis* and *C. kutzeri*, were described in 1982 (Böer, 1982). Infections by *C. neofalconis* have been diagnosed in the following falconid birds in Germany: peregrine falcon (*Falco peregrinus*), lanner falcon (*F. biarmicus*), hobby falcon (*F. subbuteo*) and prairie falcons (*F. mexicanus*). *C. kutzeri* has been found in Germany, Austria and ter-

ritories of the former Soviet Union in the following falconid species: prairie falcon (*F. mexicanus*), kestrel (*F. tinnunculus*), lanner falcon (*F. biarmicus*), lugger falcon (*F. jugger*), saker falcon (*F. cherrug*), gyrfalcon (*F. rusticolus*), peregrine falcon (*F. peregrinus*), and hobby falcon (*F. subbuteo*). Some of the birds infected by eimerian or caryosporan coccidia showed signs of intestinal disease including diarrhoea (Wetzell and Enigk, 1939; Cooper, 1969; Böer, 1982; Isenbügel and Rübél, 1987).

Free-living falcons, particularly peregrines falcons (*F. peregrinus*) and gyrfalcons (*F. cherrug*), are rare in the Czech Republic, therefore active protection is provided to maintain these populations. The Falcon Breeding Facility (FBF) was established in Milotice in 1979 for the purpose of artificial breeding and the introduction of young birds into their natural environment. The establishment of a large colony of birds of prey, translocations of the birds' accessions from other colo-

nies and from the birds' natural environment gave rise to a specific and unprecedented epidemiological situation. Regular comprehensive checks by veterinarians revealed caryosporan coccidia as one of the causes of health disorders.

The aim of our investigations was to assess, by systematic health checks in the FBF in 1991–1992, the incidence and significance of caryosporan coccidia in artificially bred birds reared in captivity.

MATERIAL AND METHODS

Birds

Parasitological examinations of 430 faecal samples collected from 91 birds belonging to 10 species as well as crosses of peregrine falcons and saker falcons were completed (Tab. 1). Three faecal samples were col-

I. Parasitological examinations of faecal samples collected in the Falcon Breeding Facility in 1991–1992

Bird species	No. sampled	<i>C. neofalconis</i>		<i>C. kutzeri</i>		<i>C. neofalconis</i> and <i>C. kutzeri</i>	
		No. infected	No. clinically affected ⁺	No. infected	No. clinically affected ⁺	No. infected	No. clinically affected ⁺
Peregrine falcon	94 [*]	14 (14.9)		10 (10.6)		0	
<i>F. peregrinus</i>	25 ^{**}	7 (28.0)	3 (42.9)	6 (24.0)	1 (16.7)	0	0
Saker falcon	192	38 (19.8)		3 (1.6)		2 (1.0)	
<i>F. cherrug</i>	39	14 (35.9)	2 (14.3)	1 (2.6)	1 (100)	2 (5.1)	0
Merlin	6	0		0		0	
<i>F. columbarius</i>	2	0	0	0	0	0	0
Kestrel	13	0		0		1 (7.7)	
<i>F. tinnunculus</i>	2	0	0	0	0	1 (50.0)	0
Lanner falcon	5	0		0		0	
<i>F. biarmicus</i>	1	0	0	0	0	0	0
Hobby falcon	6	0		0		6	
<i>F. subbuteo</i>	2	0	0	0	0	2 (100)	0
Gyrfalcon	18	0		13 (72.2)		0	
<i>F. rusticolus</i>	2	0	0	2 (100)	0	0	0
Hybrids ^{&}	67	14 (20.9)		8 (11.9)		0	
	12	7 (58.3)	2 (28.6)	2 (16.7)	1 (50.0)	0	0
Goshawk	27	1 ^{***} (3.7)		0		0	
<i>A. gentilis</i>	4	1 (25.0)	0	0	0	0	0
Sparrowhawk	1	1 ^{***} (100)		0		0	
<i>A. nisus</i>	1	1 (100)	0	0	0	0	0
Eagle owl	1	0		0		0	
<i>Bubo bubo</i>	1	0	0	0	0	0	0
Total samples	430	68 (15.8)		34 (7.9)		9 (2.1)	
Total birds	91	30 (33.0)	7 (23.3)	11 (12.1)	3 (27.3)	5 (5.5)	0

Legends:

() %

* number of sampled samples

** number of sampled birds

*** small number of oocysts

+ clinically affected (diarrhoea, reduced feed intake) birds

& hybrids of peregrine falcons (*Falco peregrinus*) and saker falcons (*Falco cherrug*)

C. = *Caryospora*

F. = *Falco*

A. = *Accipiter*

lected at two-day intervals from birds in the colony to detect oocysts shedding. Moreover, samples of large and small intestinal contents were collected from a dying gyrfalcon (*F. cherrug*). Twelve pairs of birds were kept in separate aviaries and others were tied to roosts. Clinical signs were assessed in all birds by the collection of the samples.

Parasitological examinations

Faecal and intestinal samples were screened for coccidia using flotation in Breza's solution (Breza, 1959) with specific gravity 1300. A loopful of the surface layer (diameter 5 mm) was put on a slide and viewed at the magnification 80x and the finding was scored as + (less than 10 oocysts per loop), ++ (less than 6 oocysts per 1 viewing field), or +++ (6 or more oocysts per 1 viewing field). Samples containing coccidian oocysts were placed in 2.0% (w/v) potassium dichromate in Petri dishes at room temperature till oocysts sporulate. Measurements of oocysts were made by means of a calibrated ocular micrometre to obtain morphologic data of fifty sporulated oocysts.

Therapy

Oral Sulfakombin (50 mg/ml of sulfadimidine and 12.5 mg/ml of diaveridine, Galena, Opava, Czech Republic) was administered (5 ml/kg bodyweight) on three successive days in selected birds (clinical ill birds and some shedders). The three-day regime was repeated after a two-day pause.

RESULTS

Reduced food intake, impairment of physical condition and less commonly diarrhoea (thin droppings containing mucus and occasionally blood) were observed in several birds kept in the FBF at the end of July 1991. The isolated coccidia were identified according to morphology as the species *C. neofalconis* (Böer, 1982), which was demonstrated by parasitological examination in droppings of four birds showing the most severe clinical signs.

The parasitological findings in clinically affected birds prompted us to make 3 examinations of colony birds. A total of 430 samples was collected from 91 birds. *C. neofalconis* was detected in 68 samples collected from 30 falcons and in 2 samples collected from 2 hawks (Tab. I). No coccidia were found in three birds: one wounded peregrine falcon (*F. peregrinus*) living in the wild and two saker falcons (*F. cherrug*) coming from another owner in the Czech Republic introduced into the colony during the first sampling of the colony in November 1991.

Oocysts, which were identified according to morphologic data, were identified as *C. kutzeri* and were detected during the second examination of colony birds

in March 1992. The infected bird was a gyrfalcon (*F. rusticolus*) imported from Denmark in February 1992.

No oocysts were detectable in droppings of gyrfalcon (*F. rusticolus*) 7 days after the onset of treatment (Tab. II). However, oocysts of *C. kutzeri* were found in droppings of 11 falcons over a period of several subsequent months (Tab. I). The imported gyrfalcon (*F. rusticolus*) died of heart failure (fibrinous pericarditis and hydropericardium) in December 1992. While only sporadic oocysts of *C. kutzeri* were found in the small intestine, their number in the large intestine was very high.

Both coccidia species (Tab. II), first *C. neofalconis* and later *C. kutzeri*, were found in droppings of two saker falcons (*F. cherrug*), two lanner falcons (*F. biarmicus*) and a weak concurrent infection by both species in a clinically normal kestrel (*F. tinnunculus*). Oocysts of either *C. neofalconis* or *C. kutzeri* were found in samples collected from 46 birds (50.6 per cent) kept in the FBF. Clinical signs (weight loss, lethargy, diarrhoea) were observed in seven (23.3 per cent) and three (27.3 per cent) birds infected by *C. neofalconis* and *C. kutzeri* (Tab. I).

Tab. II shows that a majority of birds, in which a caryospora infection was confirmed during the first examination, developed no clinical signs. Clinical signs disappeared and shedding of oocysts was suppressed for several weeks in birds treated with the coccidiostat Sulfakombin. Although renewed shedding was observed in some birds later, no clinical disease was observed.

DISCUSSION

Caryospora sp. are the most important causes of health disorders in falconid birds of prey (Böer, 1982; Upton et al., 1990). Our findings of *C. neofalconis* and *C. kutzeri* in birds of prey have been the first reported cases in the Czech Republic. Although *C. neofalconis* was first identified in the FBF only as recently as in 1991, owners of birds of prey had been noting similar oocysts in microscopic examinations of ejaculates of peregrine falcons (*F. peregrinus*) and saker falcons (*F. cherrug*) for several years. Most probably the ejaculates were contaminated in the cloaca at their outflow from gonoducts. Thus the source of infection and the time of the introduction of this species into the bird colony could be determined.

It is evident that *C. kutzeri* was introduced into the FBF by the gyrfalcon (*F. rusticolus*) imported in February 1992, because no oocysts of this species were found in previous systematic examinations started in 1991. Feedborne infection is also highly improbable because the birds were fed chicks, laboratory mice and rats, and quail (incl. eggs) coming from sources free of the two coccidia species (Böer, 1982).

Treatment with the coccidiostat Sulfakombin, started immediately after *C. kutzeri* had been demonstrated, suppressed shedding of oocysts within 7 days.

II. Demonstration of *Caryospora neofalconis* and *Caryospora kutzeri* on repeated examinations of 14 birds in the Falcon Breeding Facility in 1991–1992

Date Bird No.	Demonstration of a single coccidia species									
	P1	P2	P3	P4	X1	X2	G	S1	S2	X3
30. 7. 91	<i>n+++*</i> &	<i>n+++*</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12. 8. 91	–	–	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9. 9. 91	–	<i>n+</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1. 10. 91	–	–	ND	ND	<i>n+++*</i> &	ND	ND	ND	ND	ND
29. 10. 91	–	<i>n+</i>	ND	ND	–	ND	ND	ND	ND	ND
6. 11. 91	<i>n+&</i>	–	ND	–	–	–	ND	–	–	ND
22. 11. 91	–	–	ND	–	ND	–	ND	ND	ND	ND
1. 12. 91	–	–	ND	–	ND	–	ND	ND	ND	ND
5. 3. 92	–	<i>n+</i>	ND	–	–	<i>n+</i>	<i>k++</i>	–	–	–
7. 3. 92	–	<i>n++</i>	ND	–	<i>n+</i>	–	<i>k+</i>	–	–	–
9. 3. 92	–	<i>n+</i>	ND	<i>n+</i>	–	–	<i>–&</i>	–	–	–
16. 3. 92	–	ND	ND	–	ND	–	–	ND	ND	ND
11. 5. 92	–	ND	ND	–	–	–	–	–	–	–
13. 5. 92	–	ND	ND	–	–	–	–	–	–	–
15. 5. 92	–	ND	ND	–	–	–	<i>k+</i>	–	–	<i>k+</i>
30. 6. 92	–	ND	<i>–**</i>	–	ND	ND	–	ND	ND	–
10. 8. 92	–	ND	–	–	ND	ND	<i>k+</i>	ND	ND	–
25. 9. 92	–	ND	<i>n+</i>	–	–	–	<i>k+</i>	<i>k++</i>	–	<i>k+</i>
27. 9. 92	–	ND	<i>n++</i>	–	–	<i>n+</i>	–	<i>k++</i>	–	<i>k+++</i>
29. 9. 92	–	ND	<i>n+</i>	–	–	–	–	–	–	<i>k+</i>
19. 10. 92	ND	ND	<i>n+++</i>	–	ND	–	<i>k+</i>	–	<i>k+</i>	<i>k+++</i>
27. 10. 92ND	ND	<i>n+</i>	–	ND	ND	–	–	–	–	<i>k+++</i>
Demonstration of both coccidia species in one bird										
Date Bird No.	S3	S4	H	K						
6. 11. 91	<i>n+</i>	<i>n+</i>	–	ND						
22. 11. 91	–	–	ND	ND						
5. 3. 92	–	–	<i>n+</i>	ND						
7. 3. 92	–	–	<i>n++</i>	ND						
9. 3. 92	–	–	<i>n+++</i>	ND						
25. 9. 92	–	–	<i>k+</i>	–						
27. 9. 92	–	–	<i>k+</i>	–						
29. 9. 92	<i>k+</i>	–	<i>k+++</i>	–						
19. 10. 92	–	<i>k+</i>	ND	<i>n+, k+</i>						
27. 10. 92	–	<i>k++</i>	ND	–						

Legends:

- * clinical signs (weight loss, diarrhoea)
- & beginning of therapy (coccidiostat-Sulfakombin)
- P1–P4 peregrine (*Falco peregrinus*)
- X1–X3 hybrids of peregrine (*Falco peregrinus*) and saker falcons (*Falco cherrug*)
- S1–S4 saker falcons (*Falco cherrug*)
- G gyrfalcon (*Falco rusticolus*)
- H hobby (*Falco subbuteo*) – pooled sample collected from one couple in one aviary
- K kestrel (*Falco tinnunculus*)
- n, k* infection of *Caryospora neofalconis* and/or *Caryospora kutzeri* (+ to +++)
- + to +++ degree of positivity
- negative finding
- ND not done

However, the environment was already contaminated by oocysts to such an extent that coccidia were detected subsequently also in other birds kept in the FBF. The

transmission was facilitated by the long patency and high tenacity of sporulated oocysts (Böer, 1982). A transmission by contaminated ejaculate is not prob-

able because sporogony requires three days. The interval between ejaculation and artificial insemination is a few hours and thus not sufficient for sporogony.

Among birds of prey, falcons were reported as the only hosts of *C. neofalconis* (Böer, 1982; Schaffrath-Böer, 1983). Our examinations revealed infections by this species in one goshawk (*Accipiter gentilis*) and one sparrowhawk (*A. nisus*). Both birds were clinically normal and only sporadic oocysts were seen in their droppings, suggesting a mild infection, or merely intestinal passage. Secondary contamination of the samples should have been avoided as the birds were tied separately to roosts.

Our data from the FBF and data published by others (Böer, 1982; Isenbügel and Rübél, 1991) are suggestive of considerable differences in susceptibility among birds of prey. Shedding of large numbers of oocysts was observed occasionally in clinically normal birds. Resistance acquired after the first contact with a parasite inducing clinical disease may persist for a long time (Böer, 1982). Clinical diseases can also develop following exposure to various stresses, such as climatic factors (high or low ambient temperatures), poor feed quality, intercurrent diseases of the intestinal tract or other organs, etc.

No deaths occurred in caryospora-infected birds we studied, but the observed signs resembled closely those described in available literature (Wetzel and Enigk, 1939; Cooper, 1969; Böer, 1982; Isenbügel and Rübél, 1987). Our results have also confirmed Böer's (1982) and Schaffrath-Böer (1983) observation that clinical diseases induced by either of the coccidia were more severe in peregrine falcons (*F. peregrinus*) than in other species of birds of prey.

Our results of treatment of infected birds in the FBF have confirmed earlier reports by others (Böer, 1982; Isenbügel and Rübél, 1987). The administration of coccidiostats is followed by a significant improvement of clinical status within a few days. However, it is necessary to remark that Böer (1982) used amprolium for the treatment, with a specific effect on coccidia. In our study sulphonamides has been used, which most probably improved clinical status of the birds of prey due to the effect also on other bacterial enteropathogens. A slow recovery (within 1 to 3 weeks) was observed also in untreated birds with mild clinical signs. Reduced shedding of oocysts was observed in both treated and untreated birds. Oocysts were found irregularly in droppings for several weeks or months following clinical recovery.

Histological examination of the intestinal tract of the gyrfalcon (*F. rusticolus*) dying of heart failure was not possible owing to advanced autolysis. High number of coccidia in the large intestine contrasted with the finding of only sporadic oocysts in the small intestine.

Several oocysts were found occasionally in droppings of clinically normal birds in repeated examinations. It is, therefore, evident that both *Caryospora* sp.

are circulating in the colony and that, conforming with the views of Böer (1982) and Isenbügel and Rübél (1991), a complete elimination from the FBF will be difficult to achieve.

Repeated parasitological examinations during the obligatory quarantine of newly introduced birds is the most effective way of protecting against the introduction of caryosporan coccidia into healthy colonies of birds of prey. Control of infections in affected colonies consists of regular examinations of all birds repeated at least twice a year. Additional steps should be taken to isolate and provide protection of young birds which are most sensitive to the infection (Cooper, 1969).

Acknowledgement

The authors wish to thank Mrs. Z. Rozsypalová, I. Ryšavá and L. Sedláková for their skilful assistance and Mr. O. Fischer (Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic) and Mr. K. Šesták (The Ohio State University, USA) for the critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- BÖER, B. (1982): Untersuchungen über das Vorkommen von Kokzidien bei Greifvögeln und über die Entwicklungen von zwei *Caryospora* Arten der Falken (*Caryospora neofalconis* n. sp. und *Caryospora kutzeri* n. sp.). [Dissertation.] Hannover, Institut für Parasitologie der Tierärztlichen Hochschule.
- BREZA, M. (1959): Improved methodology of coproovoscopic faecal examination in swine using a new flotation solution and mucogel (Mucogel lig.) (In Slovak). Vet. Čas., 8, 569–577.
- COOPER, J. W. (1969). Some diseases of birds of prey. Vet. Rec., 84, 454–457.
- HUBER, E. (1964): Die Endoparasiten von Vögeln des Münchner Tierparks Hellabrunn unter besonderer Berücksichtigung der jahreszeitlichen Schwankungen in der Wurmausscheidung. [Inaugural-Dissertation.] Univ. München, Tierärztl. Fak.
- ISENBÜGEL, E. – RÜBEL, A. (1987): Greifvögel. In: GABRISH, K. – ZWART, P. (eds.): Krankheiten der Wildtiere. Hannover, Schlütersche Verlagsanstalt, pp. 191–252.
- SCHAFFRATH-BÖER, A. (1983): Untersuchungen über das endogene Entwicklungszyklus von *Caryospora kutzeri* (Böer, 1982). [Dissertation.] Hannover, Institut für Parasitologie der Tierärztlichen Hochschule.
- SCHOLTYSECK, E. (1954): Untersuchungen über die bei einheimischen Vogelarten vorkommenden Coccidien der Gattung *Isospora*. Arch. Protistenkde., 100, 91–112.
- SCHOLTYSECK, E. (1956): Untersuchungen über die Coccidieninfektion bei Vögeln. Zbl. Bakteriol., Abt. I. Orig., 165, 275–289.
- SCHWALBACH, G. (1959): Untersuchungen und Beobachtungen an Coccidien der Gattungen *Eimeria*, *Isospora* und *Caryospora* bei Vögeln mit einer Beschreibung von sechzehn neuen Arten. Arch. Protistenkde., 104, 431–491.

UPTON, S. J. – CURRENT, W. L. – BARNARD, S. M. (1986): A review of the genus *Caryospora* Léger, 1904 (*Apicomplexa: Eimeriidae*). Syst. Parasitol., 8, 3–21.

UPTON, S. J. – CUMPBELL, T. W. – WEIGEL, M. – MCKOWN, R. D. (1990): The *Eimeriidae* (*Apicomplexa*) of raptors: Review of the literature and description of new species of the genera *Caryospora* and *Eimeria*. Can. J. Zool., 68 (6): 1256–1265.

WETZEL, R. – ENIGK, K. (1939): Beobachtungen über parasitäre Erkrankungen der Falken und Vorschläge zu ihrer Bekämpfung. Jb. Dtsch. Falkenorden, 1, 24–33.

Received: 98–04–08

Accepted after corrections: 98–06–09

Contact Address:

MVDr. Ivo Pavlík, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika
Tel. +420 5 41 32 12 41, fax +420 5 41 21 12 29
e-mail: pavlik@vri.cz, WWW: http://www.clark.cz/vri/wwwrflp_text.htm

CHLAMYDIOSIS IN THE FISH

CHLAMYDIÓZA RYB (EPITHELIOCYSTIS)

L. Pospíšil

Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: A review on chlamydia in fish, commonly called "epitheliocystis" (earlier "mucophilosis"), is presented. The disease characterized by hypertrophied epithelial cells of gills and skin, is a chronic infection with a mortality rate of 4–8% induced by chlamydial agents (chlamydia-like agents). Data on etiology, incubation period, diagnostic methods, clinical signs, gross and microscopic lesions, mode of transmission, host range, and geographical distribution are reviewed. So far the infection has been demonstrated in 32 fish species.

chlamydia organisms; fish; epitheliocystis

ABSTRAKT: Přehledný článek o chlamydióze ryb, pro něž se dosud užívá název („epitheliocystis“, dříve „mucophilosis“). Je to chronické onemocnění ryb, způsobené mikroorganismy podobnými chlamydiím. Projevuje se hypertrofií epiteliálních buněk, především žabrových, někdy i kožních. V článku jsou popsány zevní příznaky, histopatologický obraz, etiologie, přenos nákazy, inkubační doba, hostitelské rybí druhy a geografické rozšíření nákazy. Onemocnění bylo již prokázáno u 32 druhů ryb s mortalitou 4 až 8 %.

chlamydie; ryby; epitheliocystis

ÚVOD

Existenci chlamydií – ať už se jejich pojmenování v průběhu let jakkoliv proměňovalo (*Myiagawanella*, *Neorickettsia*, *Pararickettsia*, *Rakeia*, *Colessia*, *Halprovia*, *Bedsonia*, PL virus, PLV virus, *Psittacosis-LGV-Trachom* agens, OLT skupina (*Ornithosa-Lymphogranuloma-Trachom*), TRIC skupina (*Trachom-inkluzní conjunctivitis*) – potvrdili Halberstaedter a Prowazek (1907). Práce pojednávající o patogením působení chlamydií na člověka a teplotně obratlovce jdou do tisíců. Rovněž na našem pracovišti se chlamydiovými infekcemi, jako interdisciplinární problematikou, po několik období konsekvantně zabýváme (Pospíšil aj., 1990, 1997, 1998; Pospíšil a Pospíšilová, 1990; Věžník a Pospíšil, 1995, 1997; Věžník aj., 1996a, b, 1998). Svým choroboplodným potenciálem pro celou živočišnou říši jsou chlamydie mezi bakteriemi tak výjimečné, že nemají obdobu. Jejich výjimečnost je dále dána zcela jedinečným vývojovým cyklem, probíhajícím výhradně nitrobuňčně. Striktní intracelulární parazitismus jejich výjimečnost jen podtrhuje. Vzhledem k tak bohaté literatuře došlo relativně pozdě k poznání, že chlamydie mohou infikovat, kromě různých druhů teplotně obratlovců, i ryby, obojživelníky a ústřice (Newcomer aj., 1982; Renault a Cochenne, 1995).

Jelikož se nám jevil výskyt chlamydií a chlamydióz u ryb jako nejméně probádaný z celé živočišné říše, jako terra ignota, obrátili jsme svou pozornost v poslední době tímto směrem při akcentaci základních poznatků epizootologických a experimentálně patologických. Chlamydiové infekce u ryb byly dlouho zahaleny nesprávnými názvy „mucophilosis“ a „epitheliocystis“. Poslední z těchto dvou názvů přetrvává často v odborné literatuře doposud.

Podle popisů chorobných změn na ulovených rybách lze usuzovat, že se u nich chlamydiová infekce vyskytovala již v 16. století (Wolf, 1988). Přetrvávající název „epitheliocystis“ charakterizuje chronické onemocnění ryb způsobené mikroorganismy podobnými chlamydiím, které se projevuje hypertrofií epiteliálních buněk, zpravidla žabrových, ale někdy také kožních. Bylo zjištěno u řady sladkovodních a mořských ryb. Sama epitheliocystis je onemocnění povrchové a benigní. Nicméně proces na žábřácích může podnítit hyperplazii a slepení žaberních lamel. U rozsáhlejšího procesu je pak dýchání postižené ryby nedostatečné a výsledkem toho je její úhyn.

Závažnost a letalita epitheliocystis může být mnohem vyšší u případů smíšené infekce, kdy k základnímu onemocnění se přidružuje infekce způsobená některými prvky, trematody nebo vibrií (Cruz-e-Silva aj., 1997; Padros a Crespo, 1995).

Někteří autoři udávají masivní mortalitu ryb infikovaných epitheliocystis, zejména v těch případech, u nichž kromě žaber a kůže jsou postiženy destrukčním procesem nozdry a bukální dutina (Venizelos a Benetti, 1996). Graff aj. (1996) udávají mortalitu u chovných ryb (vyza bílá) stížených epitheliocystis 4 až 8 %. Průběh onemocnění epitheliocystis u chovných ryb neovlivňuje skladba krmiva (Gonzales aj., 1995).

Historie onemocnění začíná v roce 1920, kdy Plehn popsal nové onemocnění žaber kapra obecného: mnohočetné malé cystičky obklopené proliferovanými epiteliálními buňkami, které, v případě značného rozsahu, způsobují nedostatečné dýchání vedoucí k úhynu postiženého jedince. Za původce tohoto onemocnění označil jednobuněčnou řasu *Mucophilus cypriini* a onemocnění nazval „mucophilosis“. Tento, jak se později ukázalo, nepřipadný název nicméně byl přebírán i jinými autory až do osmdesátých let přesto, že již v roce 1969 Hoffman aj. označili za původce onemocnění prvoka a pro onemocnění použili název „epitheliocystis“. Prvok se vyskytuje u měsíčníku (druh amerického okouna), a to nejen na žábřácích a kůži, ale i na ploutvích. Při histologickém vyšetření bylo zjištěno, že „cysty“ jsou neobvykle hypertrofické epiteliální buňky s granuly. Hoffman aj. (1969) se domnívali, že intracelulární granula jsou virového původu. Jeden z Hoffmanových spolupracovníků však při elektronoptickém vyšetření prokázal přítomnost velkého množství buněk podobných kokovitým bakteriím (cocci-like), které prohlásil za bedsonie (dnešní název chlamydie).

Epitheliocystis byla v dalších letech prokázána v žábřácích okouna pruhovaného z atlantského pobřeží (*Morone saxatilis*) a okouna říčního (*M. americanus*) z brakických vod severoamerických (Wolke aj, 1970). Srovnávacími studii přispěl k rozpoznání epitheliocystis Wolf (1980). Další případy epitheliocystis u okouna pruhovaného popsali Paperna a Zwerner (1976) z jiné oblasti a přesný elektronoptický obraz podali Zachary a Paperna (1977). Protože epitheliocystické buňky obsahovaly množství kokoidních až tyčinkových mikroorganismů, autoři usoudili, že jde o rickettsie.

Další zpráva o výskytu epitheliocystis, tentokrát u parmice nachové (*Liza ramada*) a pražmy mořské (*Sparus aurata*) z odchovu, pochází z Izraele (Paperna, 1977). Zde se také poprvé objevuje zmínka o značné mortalitě mladých infikovaných jedinců svědčící pro skutečnost, že epitheliocystis je vážné, často letálně končící onemocnění.

Elektronoptická studie ryb s příznaky epitheliocystis přinesla mimo jiné také dočasný názor o dvou pravděpodobných původcích onemocnění (Paperna aj., 1978).

Další zpráva o výskytu epitheliocystis pochází z Francie, a sice u mořského okouna, *Dicentrarchus labrax* (Paperna a Baudin-Laurencin, 1979). O rok později Paperna a Sabnai (1980) pořídili seznam všech do té doby známých rybních hostitelů epitheliocystis a potvrdili, že její původce má vývojová stadia stejná jako chlamydie. Přesto však zcela nevyloučili etiologickou úlohu rickettsií.

V roce 1981 došlo k zásadnímu zvratu v objasňování etiologie epitheliocystis, neboť Molnar a Borros, unifikovali toto označení s názvem „mucophilosis“. Dále byl popsán vývojový cyklus původce epitheliocystis na zástupcích všech čtyř čeledí ryb (Paperna aj., 1981) a domněnka o chlamydiích se zdála být potvrzena, zvláště když Wolf (1981) ve své review téměř vyloučil jako etiologické agens rickettsie.

Přesto však ještě v roce 1992 například Anderson a Prior vyslovují pochybnosti, zda nalezené inkluze u juvenilních bahníků australských s příznaky kožní iritace a změn na žábřácích jsou chlamydiové nebo rickettsiové.

Epitheliocystis přitahovala stále více pozornosti. Postupně byla zjištěna u mořského platyže (Morrison a Shum, 1983), dále jako příčina úhynu ryb lososovitých (Rourke aj., 1984) a jako benigní, velmi rozšířená infekce u sumecků (Zimmer aj., 1984). Rovněž bylo definitivně rozhodnuto, že epitheliocystis je identická s chorobou dříve zvanou mucophilosis (Paperna a Alves-de-Matos, 1984).

Zajímavá historie epitheliocystis není stále úplná. Chybí zprávy o úspěšné izolaci agens a o jeho exaktně popsaném vývojovém cyklu v experimentu *in vivo* a *in vitro*.

PATOLOGIE

Epitheliocystis je onemocnění různě závažné – od benigních lehkých případů až po těžké infekce zasahující kožní epitel. Lehké infekce se také objevují na žábřácích, avšak těžké postižení žaber má za následek proliferativní bujení zmenšující dýchací kapacitu tak, že dojde k úhynu infikované ryby. Byla vyslovena domněnka, že u volně žijících ryb se infekce epitheliocystis nerozvine a zůstává ve stavu latentní inaparentní infekce, zatím co u ryb za různých podmínek chovu se infekce rozvine do klasických příznaků na kůži a žábřácích (Crespo aj., 1990; Grau a Crespo, 1991).

Epitheliocystis může být zaměněna s lymphocystis, ale tato infekce obvykle probíhá ve větších buňkách a zřídka postihuje žábry. Lymphocystis se nikdy nevyskytuje u lososovitých a kaprovitých ryb, které jsou vnímavé k epitheliocystis. Kožní těžká forma epitheliocystis může být také zaměněna s parazitární infekcí, způsobenou prvokem *Ichthyobodo necatrix*.

Ryba s lehkou formou epitheliocystis se chová normálně. Ryba v terminálním stadiu proliferativní formy je letargická, její žábry jsou zbytnělé, zřetelné je zrychlené dýchání.

PŘÍZNAKY

Lehká forma epitheliocystis může být inaparentní, zatímco těžká infekce je dramaticky zřetelná. Při vyšetření infikovaných žaber jsou již s malým zvětšením patrné buňky epitheliocystis (některými autory také nazývané „cysty“) jako malé, oválné nebo sférické útvary. Rozsah postižení kůže může být od několika milimetrů u mladých jedinců až po rozsáhlé plochy u ryb dospě-

lych. Buňky nabývají hnědavé barvy a dojde-li k jejich ruptuře, má vytékající obsah podobu masy složené z množství zcela minuciózních kokoidních elementů. Specifické vnitřní patologické změny u epitheliocystis nejsou popisovány.

HISTOPATOLOGICKÝ OBRAZ

Byly popsány postupné změny infikovaných buněk žaber kapra (M o l n a r a B o r o s, 1981). Buňky nejranějšího stadia (10 až 15 μm v průměru) mají centrálně uloženou inkluzi obklopenou pěnovitou cytoplazmou. Jak se buňka postupně zvětšuje (20 až 30 μm), zvětšuje se i inkluze, chlamydie jsou zřetelné a pěnovitá cytoplazma se kontrahuje. Cytoplazma se při barvení PAS jeví červená a při elektronoptickém vyšetření je zřejmé, že inkluze je obklopena kapičkami mucinu 1 až 3 μm v průměru. Zralé buňky (60 až 70 μm v průměru) si podrží pouze úzký lem cytoplazmy. Vnitřní inkluze s obsahem velkého množství chlamydií zaplňuje celý vnitřní objem buňky.

V době zralosti jsou epitheliocystické buňky mimořádně zvětšené a obklopené tenkou vrstvičkou hyalinního pouzdra. Cytoplazma obsahuje velké bazofilní inkluze uniformně granulované s vakuolizací nebo bez vakuolizace. Tyto variace jsou patrně závislé na stádiu buňky nebo na způsobu fixace. *Nucleus* i *nucleolus* jsou několikanásobně zvětšeny. Jádro je lokalizováno typicky excentricky.

Epitheliocystické buňky jsou často obklopeny jednou nebo i více vrstvami normálních epiteliálních buněk s náznaky proliferace. Hypertrofické buňky se nedělí. Tyto změny jsou patrné zejména na žábřácích. V pokročilém stadiu proliferovaná tkáň může být infiltrována makrofágy a eosinofily a kapiláry bývají neprůchodné (P a p e r n a, 1977). Granula v cytoplazmě nebo inkluzích dávají pozitivní reakci v barvení dle Macchiavello (W o l k e aj., 1970).

ETIOLOGIE

Za kauzální etiologické agens je současně všeobecně považována chlamydie, i když nebyla dosud prokázána úspěšnou izolací. Právě od izolace a experimentální infekce je možné očekávat další podrobnosti o etiologii epitheliocystis. Pokud etiologické agens nebude izolováno, není možné získat informace o jeho vlastnostech. Analogicky, podle jiných známých chlamydií, lze usuzovat na jeho citlivost k antibiotikům, například k tetracyklinu, azitromycinu apod. H o f f m a n aj. (1969) snad úspěšně izolovali původce epitheliocystis na tkáňové kultuře BF-2, ale další subkultury se nepodařily. Stejně neúspěšné byly izolační pokusy na kuřecích embryích. Rovněž neúspěšné byly izolační pokusy, které uskutečnil W o l f (1981) na tkáňových kulturách BF-2 ozářených kobaltem 60.

V současnosti se zdá nejspolehlivějším identifikačním postupem chlamydií z epitheliocystis elektronoptické vyšetření.

Byla provedena komparativní studie vývojového cyklu chlamydieového izolátu od vyšších obratlovců s chlamydiálním mikroorganismem izolovaným z ryb (D e s s e r aj., 1988)

PŘENOS A INKUBACE

Epitheliocystis je snadno horizontálně přenosná, avšak vstupní brána infekce není ještě přesně známa. P a p e r n a (1977) se domnívá, že v přenosu nákazy hrají důležitou úlohu infikované sítě a různá jiná zařízení používaná při chovu ryb. Podařil se experimentální přenos nákazy infikovanými žábřácími na ryby v akváriu. Při teplotě vody 20 až 25 °C se infekce rozvinula za 25 dnů. Rovněž hrubá emulze žaber z infikovaného okouna, přimísená do vody akvária se zlatými rybkami (*Carassius auratus*), způsobila u nich epitheliocystis žaber do tří až čtyř týdnů (W o l f, 1988).

HOSTITELÉ A GEOGRAFICKÉ ROZŠÍŘENÍ EPITHELIOCYSTIS

Infekce je kosmopolitní. Byla zaznamenána v Severní Americe, východní i západní Evropě, Jižní Africe, na Blízkém Východě, dále v akváriích mezi tropickými mořskými druhy importovanými z Filipín. Vnímavé ryby k této nákaze patří k 11 čeledím: *Centrarchidae*, *Chaetodontidae*, *Cichlidae*, *Cyprinidae*, *Hippoglossidae*, *Ictaluridae*, *Moronidae*, *Mullidae*, *Salmonidae*, *Sparidae* a *Zanclidae*. Infekce se vyskytuje ve vodě mořské i říční, ve vodách severských i tropických. Epitheliocystis byla prokázána nejméně u 32 druhů ryb (L e w i s aj., 1992).

K nejzajímavějším zprávám o jejím výskytu patří onemocnění mořského koníka (L a n g d o n aj., 1991).

LITERATURA

- ANDERSON, I. G. – PRIOR, H. C. (1992): Subclinical epitheliocystis in barramundi, *Lates calcarifer*, reared in sea cages. *Aust. Vet. J.*, 69, 226–227.
- CRESPO, S. – GRAU, A. – PADROS, F. (1990): Epitheliocystis disease in the cultured amberjack, *Seriola dumerili* Risso (*Carangidae*). *Aquaculture*, 90, 197–207.
- CRUZ-e-SILVA, M. P. – FREITAS, M. S. – ORGE, M. L. (1997): Co-infection by monogenetic trematodes of the genus *Microcotyle* V. Beneden and Hesse 1863, *lamellogiscus ignovoratus* Palombi, 1943, the protozoan *Trichodina* sp. Ehrenberg, 1838 and the presence of epitheliocystis, *Vibrio alginolyticus* and *V. vulnificus* in cultured seabream (*Sparus aurata* L.) in Portugal. *Bull. Europ. Assoc. Fish Pathol.*, 17, 40–42.
- DESSER, S. – PETERSON, W. – STEINHAGEN, D. (1988): Ultrastructural observations on the causative agent of epitheliocystis in the brown bullhead, *Ictalurus nebulosus* Lesueur, from Ontario and comparison with the chlamydiae of higher vertebrates. *J. Fish. Dis.*, 11, 453–460.
- GONZALES, G. – GARCIA, A. – JOVER, M. – CRESPO, S. (1995): Influence of artificial food on amberjack (*Seriola dumerili*, Risso) sanguinicoliiasis and epitheliocystis. *Bull. Europ. Assoc. Fish Pathol.*, 15, 14–16.
- GRAFF, J. M. – LaPATRA, S. E. – MUNN, R. J. – ANDERSON, M. L. – OSBURN, B. I. (1996): Epitheliocystis infec-

- tion in cultured white sturgeon (*Acipenser transmontanus*): antigenic and ultrastructural similarities of the causative agent to the chlamydiae. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 8, 172–180.
- GRAU, A. – CRESPO, S. (1991): Epitheliocystitis in the wild and cultured amberjack, *Seriola dumerili* Risso: ultrastructural observations. *Aquaculture*, 95, 1–2.
- HALBERSTAEDTER, L. – PROWAZEK, S. (1907): Zur Ätiologie des Trachoms. *Dtsch. Med. Wschr.*, 33, 1285–1287.
- HOFFMAN, G. L. – DUNBAR, C. E. – WOLF, K. – ZWILLENBERG, L. O. (1969): Epitheliocystis - a new infectious disease of bluegill *Lepomis macrochirus* Antonie Van Leeuwenhoek. *J. Microbiol. Serol.*, 35, 146–158.
- LANGDON, J. S. – ELLIOT, K. – MACKAY, B. (1991): Epitheliocystitis in the leafy sea-dragon. *Aust. Vet. J.*, 68, s. 244.
- LEWIS, E. J. – McLAUGHLIN, S. M. – BODAMER, J. E. – SAWYER, T. K. (1992): Epitheliocystitis in ten new host species of marine fish. *J. Fish. Dis.*, 15, 267–271.
- MOLNAR, K. – BOROS, G. (1981): A light and electron microscopic study of the agent of carp mucophilosis. *J. Fish. Dis.*, 4, 325–334.
- MORRISON, C. – SHUM, G. (1983): Epitheliocystitis in American plaice *Hippoglossoides platessoides* (Fabricius). *J. Fish. Dis.*, 6, 303–308.
- NEWCOMER, CH. E. – ANVER, M. R. – SIMMONS, J. L. – WILCKE, B. W. – NACE, G. W. (1982): Spontaneous and experimental infections of *Xenopus laevis* with *Chlamydia psittaci*. *Lab. Anim. Sci.*, 32, 680–886.
- PADROS, F. – CRESPO, S. (1995): Proliferative epitheliocystitis associated with monogenean infection in juvenile sea bream *Sparus aurata* in north coast of Spain. *Bull. Europ. Assoc. Fish Pathol.*, 15, 42–44.
- PAPERNA, I. (1977): Epitheliocystitis infection in wild and cultured sea bream (*Sparus aurata*) and grey mullets (*Liza ramada*, *Mugilidae*). *Aquaculture*, 10, 169–176.
- PAPERNA, I. – ALVES de MATOS, A.P. (1984): The developmental cycle of epitheliocystitis in carp *Cyprinus carpio* L. *J. Fish. Dis.*, 7, 137–147.
- PAPERNA, I. – BAUDIN-LAURENCIN, F. (1979): Parasitic infections of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, and gilthead sea bream, *Sparus aurata*, in mariculture facilities in France. *Aquaculture*, 16, 173–175.
- PAPERNA, I. – SABNAI, I. (1980): Epitheliocystitis disease in fishes. In: AHNE, W. (ed.): *Fish Diseases*. Berlin, Springer Verlag, pp. 228–234.
- PAPERNA, I. – SABNAI, I. – CASTEL, M. (1978): Ultrastructural study of epitheliocystitis organisms from gill epithelium of the fish *Sparus aurata* (L.) and *Liza ramada* (Risso) and their relation to the host cell. *J. Fish. Dis.*, 1, 181–189.
- PAPERNA, I. – SABNAI, I. – ZACHARY, A. (1981): Ultrastructural studies in piscine epitheliocystitis: evidence of a pleomorphic development cycle. *J. Fish. Dis.*, 4, 459–472.
- PAPERNA, I. – ZWERNER, D. E. (1976): Parasites and diseases of striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), from the lower Chesapeake Bay. *J. Fish. Biol.*, 9, 267–287.
- PLEHN, M. (1920): Neue Parasiten in Haut und Kiemen von Fischen. *Ichthyocytrium* und *Mucophilus*. *Zbl. Bakt. Parasitenkd. I. Orig.*, 85, 275–281.
- POSPÍŠIL, L. – KRATOCHVÍL, F. – POSPÍŠILOVÁ, A. (1990): Diagnostická hodnota IgA a IgM protilátek u chlamydiových genitálních infekcí. *Prakt. Lék.*, 70, 579–581.
- POSPÍŠIL, L. – POSPÍŠILOVÁ, A. (1990): Výsledky serologických testů u genitálních chlamydiových infekcí. *Čs. Derm.*, 65, 195–199.
- POSPÍŠIL, L. – VĚZNIK, Z. – DIBLÍKOVÁ, I. – PEJČOCH, M. (1997): Výskyt protilátek proti skupinovému chlamydiovému antigenu u lidské populaci ČR. *EMI*, 46, 13–17.
- POSPÍŠIL, L. – VĚZNIK, Z. – DIBLÍKOVÁ, I. (1998): Prevalence chlamydiové infekce u osob z exponovaného prostředí. *Remedia – Klin. Mikrobiol.*, 2, 83–86.
- RENAULT, T. – COCHENNEC, N. (1995): Chlamydia-like organisms in stentidia and mantle cells of Japanese oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. *Dis. Aquat. Org.*, 23, 153–159.
- ROURKE, A. W. – DAVIS, R. W. – BRADLEY, T. M. (1984): A light and electron microscopic study of epitheliocystitis in juvenile steelhead trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). *J. Fish. Dis.*, 7, 301–309.
- VENIZELOS, A. – BENETI, D. D. (1996): Epitheliocystitis disease in cultured yellowtail *Seriola mazatlanica* in Ecuador. *J. Wild Aquacult. Soc.*, 27, 223–227.
- VĚZNIK, Z. – POSPÍŠIL, L. (1995): Surveillance živočišných chlamydióz 1994. In: *Sbor. XIII. Pečenkových epidemiologických dnů. Vsetín*, 3.–5. 5. 1995, s. 179–183.
- VĚZNIK, Z. – POSPÍŠIL, L. (1997): Chlamydiové infekce. *Brno, IDVPZ*, 163 s.
- VĚZNIK, Z. – POSPÍŠIL, L. – JEŽEK, P. – PILKA, L. – PEJČOCH, M. (1996a): Podíl chlamydií na nemocnosti zvířat a lidí v ČR. Závěrečná zpráva grantového projektu 508/93/0314. Praha, GA ČR.
- VĚZNIK, Z. – ŠVECOVÁ, D. – POSPÍŠIL, L. – DIBLÍKOVÁ, I. (1996b): Přímý průkaz chlamydií v semeni zvířat a lidí imunofluorescencí. *Vet. Med. – Czech.*, 41, 201–206.
- VĚZNIK, Z. – POSPÍŠIL, L. – ŠVECOVÁ, D. – ZAJICOVÁ, A. (1998): Chlamydie v ejakulátech. *Remedia – Klin. Mikrobiol.*, 2, 79–82.
- WOLF, K. (1980): Epitheliocystitis and lymphocystitis, a review. *J. Aquaric.*, 1, 58–62.
- WOLF, K. (1981): Chlamydia and rickettsia of fish. *Fish Health News*, 10/3.
- WOLF, K. (1988): *Fish Viruses and Fish Viral Disease*. Itaka, N.Y., USA. Comstock Publishing Associates. Cornell University Press, p. 476.
- WOLKE, R. E. – WYAND, D. S. – KHAIZALLAH, L. H. (1970): A light and electron microscopic study of epitheliocystitis disease in the gills of Connecticut striped bass (*Morone saxatilis*) and white perch (*Morone americanus*). *J. Compt. Pathol.*, 80, 559–563.
- ZACHARY, A. – PAPERNA, I. (1977): Epitheliocystitis disease in the striped bass *Morone saxatilis* from the Chesapeake Bay. *Can. J. Microbiol.*, 23, 1404–1414.
- ZIMMER, M. A. – EWING, M. S. – KOCAN, K. M. (1984): Epitheliocystitis disease in the channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Dis.*, 7, 407–410.

Received: 98–05–18; Accepted: 98–05–26

Kontaktní adresa:

Prof. MUDr. Leopold Pospíšil, DrSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika
Tel. +420 5 41 32 12 41, fax +420 5 41 21 12 29, e-mail: kahr@vuvet.anet.cz

ESTROGENIC ACTIVITY OF XENOBIOTICS*

ESTROGENNÍ AKTIVITA CIZORODÝCH LÁTEK

M. Machala¹, J. Vondráček^{1,2}¹*Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic*²*Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, Czech Republic*

ABSTRACT: Environmental contaminants, drugs and other xenobiotics have been found to affect both reproduction and developmental processes in various organisms. Exogenous compounds that mimic or inhibit the effects of endogenous hormones are known as endocrine disruptors. Recent studies have been focused mainly on mechanisms of action of estrogen-like compounds (xenoestrogens). Some synthetic steroid analogues, phytoestrogens, and many environmental pollutants such as metabolites of organochlorine pesticides, degradation products of surfactants, dialkyl phthalates, are considered to be the most important of them. The objective of this review has been to summarize the currently known mechanisms of action of endocrine disruptors and methods suitable for a detection of their effects. Recent studies show that the effects of xenoestrogens include interactions not only with the estrogen receptor (ER) pathway but also with other receptor systems. Beside the receptor-mediated effects, various other mechanisms exist that may modulate the endocrine system, including modulations of steroidogenesis and drug-metabolizing enzymes. A number of biochemical and cellular methods for the assessment of endocrine disruptors, allowing both the identification of individual chemicals as xenoestrogens and evaluation of their potential risk in the environment, are being developed and implemented. A combination of both *in vitro* and *in vivo* methods (e.g., recombinant receptor/reporter gene assays and detection of vitellogenin in plasma as well as the determination of activities of key steroidogenic and steroid-metabolizing enzymes) seems to be the most appropriate strategy.

endocrine disruption; xenoestrogens; cytochrome P450; steroid synthesis; vitellogenin; reporter gene assay

ABSTRAKT: Rada kontaminantů životního prostředí, léčiv a dalších xenobiotik negativně působí na reprodukci a vývoj organismů. Cizorodé látky, které zasahují do biosyntézy, transportu či metabolismu steroidních hormonů nebo ovlivňují vazbu steroidů na specifické receptory a následně způsobují poruchy rovnováh funkcí hormonů, jsou označovány jako endokrinní disruptory. Velká většina publikovaných prací v této oblasti se týká xenoestrogenů, tj. cizorodých látek, které vykazují estrogenní aktivitu. Nejvýznamnějšími xenoestrogeny jsou některá syntetická steroidní analoga hormonů, estrogény rostlinného původu a řada environmentálních kontaminantů, například určité metabolity organochlorových pesticidů, degradační produkty surfaktantů, dialkylestery kyseliny ftalové a jiné. Tato práce shrnuje známé mechanismy působení endokrinních disruptorů, především estrogenů, a metody detekce jejich účinku. Poslední studie ukazují, že xenoestrogeny mohou působit nejen přes vazbu na estrogenní receptor, ale i na jiné receptorové systémy. Další mechanismy xenoestrogenní aktivity zahrnují například modulace enzymů syntézy a katabolismu steroidů. Druhou oblastí studia endokrinních poruch je rozvoj *in vivo* a *in vitro* metod detekce xenoestrogenní aktivity, popř. antiestrogenních, androgenických a jiných negativních efektů. Pro potřeby toxikologie a pro hodnocení environmentálních rizik je v práci navržen omezený počet testů, včetně využití transgenických buněk s reporterovým genem (*in vitro* stanovení estrogenní aktivity) a stanovení plazmatických hladin vitelogeninu (*in vivo* stanovení estrogenity u samců). Hodnocení rizika estrogenní nebo androgenní aktivity xenobiotik *in vivo* by mělo zahrnovat také stanovení modulací hlavních enzymů steroidogeneze a metabolismu steroidů.

endokrinní poruchy; xenoestrogeny; cytochrom P450; syntéza steroidů; vitelogenin; test s využitím reporterového genu

INTRODUCTION

Environmental contaminants, drugs and other xenobiotics have been found to affect both reproduction and

developmental processes in various organisms. Exogenous compounds interfering with the biosynthesis, transport, binding, action, or metabolism of endogenous hormones are known as endocrine disruptors

* Supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Grant No. 525/98/1266) and by the Ministry of Environment (Grant No. VaV 340/1/96).

(Kavlock et al., 1996). Recent studies have been focused mainly on the mechanisms of action of modulators of steroid hormones. However, only a few studies have been concerned with the modulations of levels of glucocorticosteroids and xenobiotic-induced dysfunction of steroidogenic cells, such as interrenal cells in fish. Impaired cortisol secretion in fish and other wildlife species could be a prospective biochemical marker of disruption of this endocrine pathway by environmental pollutants (Hontela et al., 1997). On the other hand, a majority of investigators studied perturbations of action of sex steroid hormones, especially estrogens (Ankley et al., 1998). Much attention has been given to 1) the identification of xenobiotics acting as endocrine disruptors, 2) the elucidation of mechanisms of action, and 3) the development of methods for detecting endocrine disruptors within risk assessment of both individual chemicals and environmental mixtures of contaminants.

Several recent reviews deal with various aspects of this subject (Korach and McLachlan, 1995; Kavlock et al., 1996; Ankley et al., 1998; Crisp et al., 1998). This paper has been prepared with the aim to summarize briefly the currently known mechanisms of action of endocrine disruptors and methods suitable for the detection of their effects. Complex interrelationships are known to exist between different endocrine pathways. Thus, our goal is to emphasize the importance of a study of the mechanisms of endocrine disruption mediated through alternative signal transduction pathways. A limited number of screening tests for endocrine disruptors is suggested for toxicological and environmental risk assessment studies.

MAJOR MECHANISMS OF ACTION OF ENDOCRINE DISRUPTORS

Endocrine-disrupting chemicals can mimic or inhibit effects of endogenous estrogens and other steroid hormones. Various reproductive disorders, such as abnormal sexual development, reproductive failures, and adverse effects on concentrations of steroid hormones have been detected in various wildlife and laboratory animal species, including invertebrates (Ankley et al., 1998; Crisp et al., 1998). A variety of structurally unrelated industrial chemicals, environmental pollutants, pharmaceutical products, and phytochemicals have been demonstrated to be estrogenic. These compounds include *o,p'*-DDT and its metabolites, some hydroxylated polychlorinated biphenyls, alkylphenols, bisphenol A, dialkyl phthalates, phytoestrogens and others. Estrogenic activity has been detected in effluents, sediments, air particulate matter, and animal tissue extracts (Gillesby and Zacharewski, 1998).

It is believed that although xenobiotics may elicit only weak hormonal activity, their lipophilic nature, persistence, and accumulation in liver tissues allow

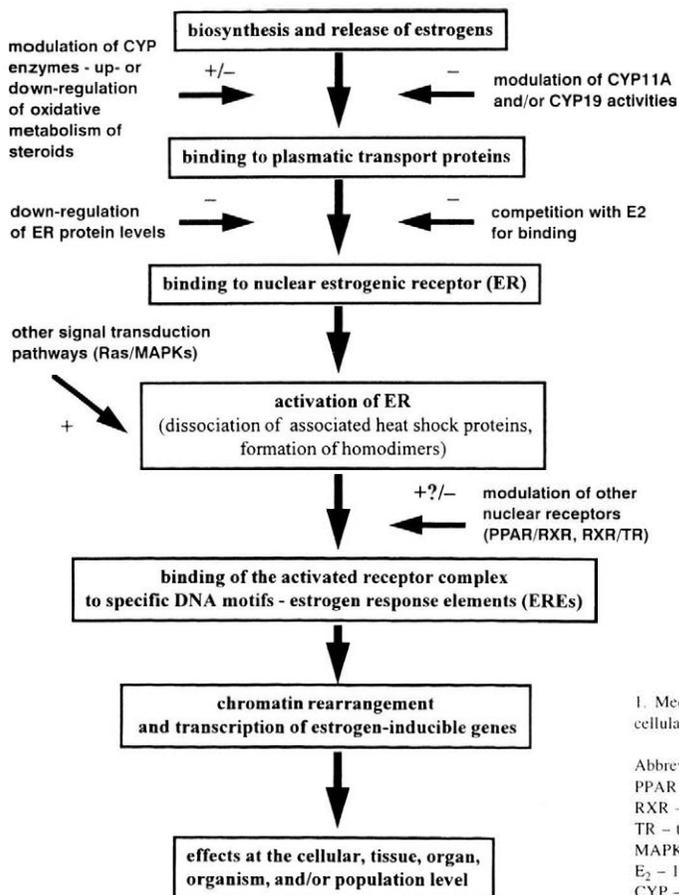
interferences with the steroidal regulation mechanisms (Danzon, 1997). This idea is supported by a recent observation that mixtures of environmental xenobiotics may have synergetic effects (Arnold et al., 1996). However, some results of synergism-oriented studies are controversial. Thus, the synergism of endocrine disruptors should be confirmed by additional *in vivo* and *in vitro* studies. The data obtained only from the chemical monitoring of a limited number of contaminants are not sufficient for risk assessment. Moreover, the chemical tests might not detect possible cumulative, synergetic and/or antagonistic effects of xenobiotics. Thus, it is necessary to develop biochemical and biological tests of endocrine disruption and include them among routine toxicological and environmental risk assessment methods.

ER-related mechanisms of action

Endocrine-disrupting chemicals can either mimic or inhibit effects of endogenous steroid hormones (Ankley et al., 1998; Crisp et al., 1998). Xenoestrogens are defined as chemicals that elicit biological responses induced by estrogens. Most of the known xenoestrogens are known to bind to nuclear estrogen receptors (ER) in target cells. The xenoestrogen-receptor complex is then activated and binds to specific DNA motifs – estrogen responsive elements (EREs). Consequently, the expression of specific genes is enhanced (Fig. 1). Estrogen antagonists (antiestrogens) can bind competitively to ER, but the binding of the receptor complex to EREs is reduced or completely abolished (Kramer and Giesy, 1995). Similar mechanisms also underlie androgenic or antiandrogenic activities of certain endocrine disruptors that are associated with adverse effects observed in males. Thus, it has been demonstrated, that the androgen receptor, rather than ER, is the site of endocrine modulation by environmental pollutants such as *p,p'*-DDE (Kelle et al., 1995).

ER-independent mechanisms of action

Many of the environmental reproductive toxicants are thought to be estrogen or androgen agonists or antagonists. However, endocrine-disrupting chemicals may function through a number of mechanisms. Recent studies have shown that the above definitions of endocrine disruptors are too narrow. Several sites within the endocrine systems present potential targets for xenobiotics: the synthesis and release of hormones, binding of steroid hormones to their specific receptors in target cells, as well as catabolism of steroid hormones. Interactions of xenobiotics with other receptor systems leading to interplay ("cross-talk") between signal transduction pathways, can also disrupt the endocrine response (Fig. 1). Therefore, estrogenic/androgenic action can be modulated at least at three different levels by the ER-independent mechanisms (Zacharewski, 1997;



1. Mechanisms of action of xenoestrogens at the cellular level

Abbreviations:
 PPAR – peroxisome proliferator-activated receptor
 RXR – retinoid X receptor
 TR – thyroid receptor
 MAPKs – mitogen-activated protein kinases
 E₂ – 17 beta-estradiol
 CYP – cytochrome P450

Danzo, 1997; Gillesby and Zacharewski, 1998):

- alterations in steroid synthesis or metabolism;
- interaction of xenobiotics with plasmatic estrogen- and/or androgen-binding proteins (increased bio-availability of endogenous hormones);
- impairment of estrogenic responses by xenobiotic-induced modulation of signal pathways employing other nuclear receptors (down-regulation of the ER protein, estrogen-independent activation of the ER, ER-independent activation of ERE sequences, and inhibition of estrogen-induced protein expression).

Moreover, reduced reproductive success in several wildlife vertebrate species exposed to organochlorine contaminants may be associated with other than estrogenic effects, such as inhibition of Ca-ATPase or modulation of prostaglandin levels (Kramer and Giesy, 1995). Non-specific toxic effects of endocrine-disrupting chemicals (on both the steroidogenic and target cells), such as an impairment of mitochondrial function, may also be of importance.

As mentioned above, alterations in steroid synthesis and/or metabolism may strongly affect endocrine homeostasis. Xenobiotic-modulated activities of both the steroidogenic and steroid-metabolizing enzymes alter steroid hormone concentrations or the estrogen : testosterone ratio. Cytochrome P45011A (CYP11A, known also as the P450 side chain cleavage enzyme, P450_{scc}), is responsible for the first step of steroid biosynthesis. Some xenobiotics can alter the CYP11A expression and thereby increase the steroid production (Gillesby and Zacharewski, 1998). Alternatively, inhibition of steroidogenic enzymes may significantly affect the concentrations of steroids. Polychlorinated biphenyls depress both progesterone and testosterone synthesis in steroidogenic tissues (Fuller et al., 1980; Johansson, 1989). A depression of testicular steroidogenesis in rats was found to be a direct consequence of both inhibition of the CYP11A-dependent conversion of cholesterol to pregnenolone and an impairment of cholesterol mobilization and transport to the CYP11A (located in the inner mitochondrial mem-

brane) (Kleeman et al., 1990; Moore et al., 1991). Estrogen biosynthesis can be inhibited also due to an exposure to inhibitors of aromatase (i.e. the cytochrome P450 responsible for the conversion of testosterone to estrogens, CYP19) such as the fungicide fenarimol (Hirsch et al., 1987).

Modulation of steroid-metabolizing enzymes by xenobiotics is another mechanism of action of endocrine-disrupting chemicals. Antiestrogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) may be at least partially explained by its potent induction of the CYP1A enzymes that are involved in 17 beta-estradiol metabolism (Spink et al., 1994). On the other hand, mammalian testosterone metabolism is not significantly affected by TCDD or TCDD-like inducers (Zimniak and Waxman, 1992). The prevailing hepatic steroid monooxygenase activity is cytochrome P4503A (CYP3A) dependent 6 β -hydroxylation. Many xenobiotics can induce CYP3A and may act as endocrine disruptors. Interestingly, a decrease of CYP3A-dependent testosterone 6 β -hydroxylase activity was found in hepatic tissues of fish collected at heavily contaminated sites (Machala, unpublished results) or after treatment with estradiol, nonylphenol and/or p,p'-DDE (Arukwe et al., 1997a; Machala et al., 1998a).

Environmental endocrine disruptors may also affect the dissociation of steroid hormones from their binding proteins. It was shown that selected environmental contaminants may inhibit the binding of physiological ligands not only to estrogen and androgen receptors, but also to the androgen-binding protein and the sex hormone-binding globulin (Danzo, 1997).

Recently, some *in vitro* studies have demonstrated that xenobiotics interacting with other members of the nuclear receptor superfamily, such as retinoid X receptor (RXR) and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), could modulate the ER-mediated signal transduction pathway (Gillesby and Zacharewski, 1998). Down-regulation of ER protein levels by TCDD (Safe et al., 1991) or the binding of PPAR/RXR complex to estrogen responsive elements and consequent inhibition of ER-mediated gene transcription (Keller et al., 1995) are examples of this interplay. Signaling cross-talk between distinct xenobiotic-activated nuclear receptors may represent important mechanisms of action of peroxisomal proliferators or TCDD. However, the only method for elucidation of such a mechanism is the detection of integral responses, such as estrogen-induced synthesis of specific proteins (vitellogenin or prolactin, see below).

METHODS FOR DETECTION OF ESTROGENIC AND ANDROGENIC ACTIVITIES

Both *in vivo* and *in vitro* methods have been developed to indicate the estrogenic activity of environmental contaminants and other xenobiotics (Korach

and McLachlan, 1995; Zacharewski, 1997; Gray, 1997; Ankley et al., 1998):

- *in vivo* mammalian bioassays (such as measurement of uterine wet weight changes);
- determination of secretion of specific plasmatic protein(s), such as estrogen-induced increase in vitellogenin and zona radiata protein concentrations (measured *in vivo* in males);
- determination of altered plasma steroid concentrations, altered biosynthesis of steroid hormones (suppression of CYP11A or CYP19 activities), and modulations of steroid-metabolizing CYP enzymes;
- competitive binding assays (i.e., binding of chemicals to the estrogen or androgen binding proteins and receptors);
- detection of hormone-specific gene activation (expression of reporter gene, i.e. chloramphenicol acetyltransferase or luciferase activity as an end point, or *in vitro* secretion of vitellogenin);
- estrogen-induced cell proliferation in specific tissues and cells, such as proliferation of MCF-7 breast cancer cells.

These methods allow both the identification of individual chemicals as xenoestrogens and environmental risk assessment.

In vivo tests

In vivo rather than *in vitro* tests, are currently the most defensible methods for the detection of xenoestrogenic effects in wildlife and domestic animals. A set of methods, based mostly on a combination of determination of plasmatic concentrations of steroids with functional assays of the reproductive system, such as sperm motility tests, has also been devised for food-producing animals. The current methods for the assessment of endocrine disruption in laboratory mammals include the mammalian uterine weight gain assay (Ankley et al., 1998). The uterotrophic response assay is a standardized procedure in which an estrogen-induced increase in wet weight is determined (Korach and McLachlan, 1995). Early (such as increased vascular permeability) and late responses (a host of biochemical changes leading to cell division, differentiation and uterine growth) can be distinguished in the complex pattern of the estrogenic action on the uterus. Recently, an acute *in vivo* mammalian assay, based on an increase of uterine vascular permeability, was described (Milligan et al., 1998). Other recommended *in vivo* assays are based on early-stage exposure and determination of morphological abnormalities such as the anogenital distance (Gray, 1998).

Vitellogenin (VTG) is an estrogen-inducible egg protein precursor. The VTG gene is present but not expressed, in males, but its expression can be elicited by the administration of xenoestrogens (LeGuellec et al., 1988). The production of VTG is used as a biomarker of exposure to environmental xenoestrogens in fish (Tyler et al., 1996; Harries et al.,

1997). Elevated serum VTG concentrations and depressed serum testosterone concentrations were found in male carp collected from a river polluted by sewage treatment plant effluents (Folmar et al., 1996). Zona radiata proteins (Zrp) are synthesized in teleost fish liver in response to an estrogen signal. The induction of these proteins, especially the Zrp-b form, has been found to be a more sensitive parameter than vitellogenin in male fish and hence could become an alternative biochemical marker of estrogenicity (Arukwe et al., 1997b).

On the other hand, generally accepted screening methods detecting the modulation of steroidogenesis or metabolism of steroid hormones have not yet been established. Interestingly, CYP11A, a rate-limiting enzyme of steroidogenesis, showed a significantly suppressed activity in testes of rats and bulls chronically exposed to polychlorinated biphenyls (Machala et al., 1998b). An impairment of mobilization of cholesterol to CYP11A enzyme or modulation of CYP19 could also play a significant role in the disruption of steroid synthesis (Johnsson, 1989; Kleeman et al., 1990).

Induction by environmental chemicals of hepatic microsomal cytochromes P450 as the major steroid-metabolizing enzymes was reported in mammals (Zimniak and Waxman, 1992). Increased hepatic hydroxylation of testosterone after a chronic intake of polychlorinated biphenyls in bulls may represent one of the important mechanisms of depression of steroid levels (Machala et al., 1998b). On the other hand, fish hepatic hydroxylation of progesterone and testosterone was depressed after short-term exposure to nonylphenol and p,p'-DDE, respectively (Arukwe et al., 1997b; Machala et al., 1998a). Therefore, a potential contribution of modulations of hepatic steroid-metabolizing enzymes to a modulation of steroid levels in fish is to be investigated.

A combination of the measurement of hormone receptor-mediated responses (such as a vitellogenin concentration in male blood plasma), concentrations of steroid hormones, and activities of the key steroidogenic and steroid-metabolizing enzymes (CYP11A, CYP19, CYP3A) may become a suitable set of biochemical markers of xenoestrogenic and/or androgenic effects *in vivo*. These assays are sensitive and allow the assessment of all mechanisms that can affect this endocrine pathway.

In vitro methods

Screening methods that detect potential estrogenic and antiestrogenic chemicals are a matter of great concern (Ankley et al., 1998). The currently used *in vitro* methods for the detection of xenoestrogenic activity include competitive ligand-binding, cell proliferation, and estrogen receptor transcriptional assays, as well as methods based on the measurement of hormone-induced secretion of specific proteins, such as

vitellogenin in primary hepatocyte cultures (Zacharewski, 1997).

Competitive binding assays using radioactive labelled natural ligands reveal whether the test compound is specifically recognized by a receptor protein, but do not distinguish between agonists and antagonists. Cell proliferation assays are based on the fact that estrogen can elicit the mitotic stimulation of cells and tissues of the female genital tract. Similarly, proliferation of estrogen-responsive MCF-7 breast cancer cells is a simple and sensitive marker of estrogenicity (Soto and Sonnenschein, 1985). In spite of some discrepancies (e.g., difficult standardization), the test is suitable for the assessment of estrogenic activity (Zacharewski, 1997).

Estrogen-specific induction of several proteins and enzymes in various cell types has been also used to detect estrogenicity, e.g., expression of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens in primary cultures of fish hepatocytes (Pelissero et al., 1993). The end-points of these assays can be measured in terms of enzyme activity or by means of an immunoassay. However, the expression of such proteins is restricted to specific cell lines; therefore, the results may not be relevant to effects on other tissues or species (Zacharewski, 1997).

The most frequently used *in vitro* assays are based on a reporter gene methodology. Transfected reporter gene placed under the transcriptional control of a hormone response element and a minimum promoter are introduced into cells using transient or stable transfection (Joyeux et al., 1997); reporter genes encode for proteins such as firefly luciferase (Luc), bacterial chloramphenicol acetyl transferase (CAT) that are easily identified and quantified. Various recombinant receptor/reporter gene assays, including MCF-7 and yeast cells system, have been developed in the last years (Chen et al., 1997). This procedures can be standardized and yield results with a relatively high inter-laboratory reproducibility. Although the reporter gene assays are suitable for the examination of ER ligands, they are ineffective for endocrine disruptors acting by ER-independent mechanisms. Generally, a battery of assays, rather than one universal test is required to fully characterize actions of xenoestrogens or other endocrine disruptors.

CONCLUSIONS

It can be concluded from the diversity of mechanisms of action of endocrine-disrupting chemicals and the significance of a hormone receptor-independent mechanisms that the future studies should focus on:

- xenobiotic-induced modulations of both steroidogenic and drug-metabolizing enzymes involved in steroid biosynthesis and inactivation;
- an elucidation of cross-talk between distinct endocrine pathways and other signal transduction mecha-

nisms. The latter topic should include effects of dioxin-like compounds, peroxisomal proliferators, and other nuclear receptor ligands on endocrine responses.

A limited number of biochemical and cellular methods detecting endocrine disruption mechanisms and potentials, should be included into both toxicological testing of chemicals and environmental risk assessment protocols. A combination of the measurement of hormone receptor-mediated responses (such as detection of vitellogenin(s) or zona radiata proteins in plasma of male fish and wildlife vertebrates), concentrations of steroid hormones, and activities of the key steroidogenic and steroid-metabolizing enzymes (CYP11A, CYP19, CYP3A) may become a suitable set of biochemical markers of xenoestrogenic and/or androgenic effects *in vivo*. Together with assays of *in vitro* expression of the reporter gene luciferase activity in standardized transgenic cells detecting both estrogen/androgen agonists and antagonists, they would form a battery of tests covering all the currently-known effects of xenoestrogens.

REFERENCES

- ANKLEY, G. – MIHAICH, E. – STAHL, R. – TILLITT, D. – COLBORN, T. – McMASTER, S. – MILLER, R. – BANTLE, J. – CAMPBELL, P. – DENSLOW, N. – DICKERSON, R. – FOLMAR, L. – FRY, M. – GIESY, J. – GRAY, L.E. – GUINEY, P. – HUTCHINSON, T. – KENNEDY, S. – KRAMER, V. – LEBLANC, G. – MAYES, M. – NIMROD, A. – PATINO, R. – PETERSON, R. – PURDY, R. – RINGER, R. – THOMAS, P. – TOUART, L. – VAN DER KRAAK, G. – ZACHAREWSKI, T. (1998): Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environ. Toxicol. Chem.*, **17**, 68–87.
- ARNOLD, S. F. – KLOTZ, D. M. – COLLINS, B. M. – VONIER, P. M. – GUILLETTE, L. J. – McLACHLAN, J. A. (1996): Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science*, **272**, 1489–1492.
- ARUKWE, A. – FÖRLIN, L. – GOKSOYR, A. (1997a): Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**, 2576–2583.
- ARUKWE, A. – KNUDSEN, F. R. – GOKSOYR, A. (1997b): Fish zona radiata (eggshell) protein: A sensitive biomarker for environmental estrogens. *Environ. Health Perspect.*, **105**, 418–422.
- CHEN, C. – HURD, C. – VOROJEIKINA, D. P. – ARNOLD, S. F. – NOTIDES, A. (1997): Transcriptional activation of the human estrogen receptor by DDT isomers and metabolites in yeast and MCF-7 cells. *Biochem. Pharmacol.*, **53**, 1161–1172.
- CRISP, T. M. – CLEGG, E. D. – COOPER, R. L. – WOOD, W. P. – ANDERSON, D. G. – BAETCKE, K. P. – HOFFMANN, J. L. – MORROW, M. S. – RODIER, D. J. – SCHAEFFER, J. E. – TOUART, L. W. – ZEEMAN, M. G. – PATEL, Y. M. (1998): Environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis. *Environ. Health Perspect.*, **106** (Suppl. 1), 11–56.
- DANZO, B. J. (1997): Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins. *Environ. Health Perspect.*, **105**, 294–301.
- FOLMAR, L. C. – DENSLOW, N. D. – RAO, V. – CHOW, M. – CRAIN, D. A. – ENBLUM, J. – MARCINO, J. – GUILLETTE, L. J. (1996): Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ. Health Perspect.*, **104**, 1096–1101.
- FULLER, G. B. – KNAUF, V. – MÜLLER, W. – HOBSON, W. C. (1980): PCB augments LH induced progesterone synthesis. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **25**, 65–68.
- GILLESBY, B. E. – ZACHAREWSKI, T. R. (1998): Exoestrogens: Mechanisms of action and strategies for identification and assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, **17**, 3–14.
- GRAY, L. E. (1997): Endocrine screening methods workshop report: Detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanisms. *Reprod. Toxicol.*, **11**, 719–750.
- HARRIES, J. E. – SHEAHAN, D. A. – JOBLING, S. – MATHIESSEN, P. – NEALL, P. – SUMPTER, J. P. – TYLOR, T. – ZAMAN, N. (1997): Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**, 534–542.
- HIRSCH, K. S. – WEAVER, D. E. – BLACK, L. J. – FALCONE, J. F. – MacLUSKY, N. J. (1987): Inhibition of central nervous system aromatase activity: A mechanism for fenarimol-induced infertility in the male rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **91**, 235–245.
- HONTELA, A. (1997): Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics: Role of glucocorticosteroid hormones. *Rev. Toxicol.*, **1**, 1–46.
- JOHANSSON, B. (1989): Effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) on *in vitro* biosynthesis of testosterone and cell viability in mouse Leydig cells. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **42**, 9–14.
- JOYEUX, A. – BALAGUER, P. – GERMAIN, P. – BOUS-SIOUX, A. M. – PONS, M. – NICOLAS, J. C. (1997): Engineered cell lines as a tool for monitoring biological activity of hormone analogs. *Anal. Biochem.*, **249**, 119–130.
- KAVLOCK, R. J. – DASTON, G. P. – DeROSA, C. – FENNER-CRISP, P. – GRAY, L. E. – KAATTARI, S. – LUCIER, G. – LUSTER, M. – MAC, M. J. – MACZKA, C. – MILLER, R. – MOORE, J. – ROLLAND, R. – SCOTT, G. – SHEEHAN, D. M. – SINKS, T. – TILSON, H. A. (1996): Research needs for risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.*, **104** (Suppl. 4), 715–740.
- KELCE, W. R. – STONE, C. R. – LAWS, S. C. – GRAY, E. – KEMPPAINEN, J. A. – WILSON, E. M. (1995): Per-

- sistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*, 375, 581-585.
- KELLER, H. – GIVEL, F. – PERROUD, M. – WAHLI, W. (1995): Signaling cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor and estrogen receptor through estrogen response elements. *Mol. Endocrinol.*, 9, 794-804.
- KLEEMAN, J. M. – MOORE, R. W. – PETERSON, R. E. (1990): Inhibition of testicular steroidogenesis in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-treated rats: Evidence that the key lesion occur prior to or during pregnenolone formation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 106, 112-125.
- KORACH, K. S. – McLACHLAN, J. A. (1995): Techniques for detection of estrogenicity. *Environ. Health Perspect.*, 103 (Suppl. 7), 5-8.
- KRAMER, V. J. – GIESY, J. P. (1995): Environmental estrogens: A significant risk? *Hum. Ecol. Risk Assess.*, 1, 37-42.
- LeGUELLEC, K. – LAWLESS, K. – VALOTAIRE, Y. – KRESS, M. – TENNISWOOD, M. (1988): Vitellogenin gene expression in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 71, 359-371.
- MACHALA, M. – DRÁBEK, P. – NEČA, J. – KOLÁŘOVÁ, J. – SVOBODOVÁ, Z. (1998a): Biochemical markers for differentiation of exposures to nonplanar PCBs, organochlorine pesticides or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in trout liver. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, in press.
- MACHALA, M. – NEČA, J. – DRÁBEK, P. – ULRICH, R. – ŠABATOVÁ, V. – NEZVEDA, K. – RASZYK, J. – GAJDUŠKOVÁ, V. (1998b): Effects of chronic exposure to PCBs on cytochrome P450 systems and steroidogenesis in liver and testis of bulls (*Bos taurus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, A, 120, 65-70.
- MILLIGAN, S. R. – BALASUBRAMANIAN, A. V. – KALITA, J. C. (1998): Relative potency of xenobiotic estrogens in an acute *in vivo* mammalian assay. *Environ. Health Perspect.*, 106, 23-26.
- MOORE, R. W. – JEFSCOATE, C. R. – PETERSON, R. E. (1991): 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin inhibits steroidogenesis in the rat testis by inhibiting the mobilization of cholesterol to cytochrome P450_{sc}. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 109, 85-97.
- PELISSERO, C. – FLOURIOT, G. – FOUCHER, J. L. – BENNETAU, B. – DUNOGUÉS, J. – Le GAC, F. – SUMPTER, J. P. (1993): Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes; an *in vitro* test for the estrogenic potency of chemicals. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 44, 263-272.
- SAFE, S. – ASTROFF, B. – HARRIS, M. – ZACHAREWSKI, T. – DICKERSON, R. – ROMKES, M. – BIEGEL, L. (1991): 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds as antiestrogens: Characterization and mechanism of action. *Pharmacol. Toxicol.*, 69, 400-409.
- SOTO, A. M. – SONNENSCHNEIN, C. (1985): The role of estrogens on the proliferation of human breast tumor cells (MCM-7). *J. Steroid Biochem.*, 23, 87-94.
- SPINK, D. C. – HAYES, C. L. – YOUNG, N. R. – CHRISTOU, M. – SUTTER, T. R. – JEFSCOATE, C. R. – GIERTHY, J. F. (1994): The effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in MCF-7 breast cancer cells: Evidence for induction of a novel 17 beta-estradiol 4-hydroxylase. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 51, 251-258.
- TYLER, C. R. – VAN DER EERDEN, B. – JOBLING, S. – PANTER, G. – SUMPTER, J. P. (1996): Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to oestrogenic chemicals, in a wide variety of cyprinid fish. *J. Comp. Physiol. B*, 166, 418-426.
- ZACHAREWSKI, T. (1997): *In vitro* bioassays for assessing estrogenic substances. *Environ. Sci. Technol.*, 31, 613-623.
- ZIMNIAK, P. – WAXMAN, D. J. (1992): Liver cytochrome P450 metabolism of endogenous steroid hormones, bile acids, and fatty acids. In: SCHENKMAN, J. B. – GREIM, H. (eds.): *Cytochrome P450*. Berlin, Springer-Verlag, pp. 123-144.

Received: 98-06-25

Accepted: 98-07-10

Contact Address:

RNDr. Miroslav Machala, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika
Tel. +420 5 41 32 12 41, fax +420 5 41 21 12 29, e-mail: kahr@vuvet.anet.cz

VETERINARY CHEMOTHERAPY**B. F. Kania**

Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa, 1997. 339 pp., 45 Tabs., 47 Figs. ISBN 83-86980-82-7.

Fourteen years after publishing a comprehensive veterinary pharmacology manual (T. Garbulinski P-WRiL) Polish readers and other interested foreign parties are provided with a truly multidisciplinary compendium of veterinary chemotherapy, written by a well-known European pharmacologist. I must say however that he also spent several years out of Europe as a pharmacological expert.

This book is composed of 19 well documented chapters, containing systematically arranged, updated, and in-depth information about chemotherapy and chemotherapeutics used in the treatment of organic diseases and various bacterial, fungal, parasitic and tumorous illnesses.

In the introductory chapter the author describes his own definition of chemotherapy, the clinical usage (guidance) and the factors related to the effectiveness of chemotherapy, as well as the mechanisms of drug action, linked to its efficiency. He also deals with problems related to the types of resistance to chemotherapeutics of microorganisms. The author applies his own knowledge and practical experience.

Consequently while tackling different chapters, the author relies on a personal and original lay-out of material: drug classification, general properties, action mechanisms, microorganism resistance, pharmacokinetic properties, clinical uses, adverse and side effects, toxicity, interactions, influence upon selected laboratory tests, drug withdrawal and milk discard times, dos-

ages, approved Polish pharmaceuticals, E.U.-specificities and references.

The language used to describe such complicated matters is plain and simple and thus easy to understand for readers. The autor's own reflection is in accordance with experimental results accepted by pharmacologists. It all makes this publication a modern, attractive manual for various readers interested in this subject. Moreover it also provides us with an insight into a complex subject, which is necessary for a rational and guided understanding of the use of chemotherapeutics, as well as the danger for people, animals, and the environment.

This chemotherapeutical publication also includes the antidotes required for suppressing toxic symptoms and saving life in cases of drug intoxications. It also contains some alternative inactivation methods for destroying organophosphates and other dangerous, or poisonous drugs. The value of the basic knowledge and practical discoveries in this chemotherapeutical book make it a useful publication principally for both veterinary students and large veterinary practices.

However, I must also express my impression that many important data in this book may also be useful for students and practitioners in other scientific disciplines. I am thinking especially of the food-agriculture-ecology complex, and pharmacy, natural-science and medicine. It can also be used either directly by some specialists of Slavic countries, or after translation by specialists of other countries.

Assoc. Prof. V. Šutiak, D.V.M., Ph.D.

ANIMAL BEHAVIOUR AND CZECH VETERINARY CURRICULUM
IN THE 1920S AND 1930SCHOVÁNÍ ZVÍŘAT A ČESKÉ ZVĚROLÉKAŘSKÉ STUDIJNÍ PLÁNY
VE DVACÁTÝCH A TŘICÁTÝCH LETECH

A. Holub, E. Baranyiová

*University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic;
Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic*

Interest in animal behaviour has deep professional roots in Czech veterinary medicine. Professor Antonín Brůza, a talented and unrelenting organizer, was one of the first persons systematically engaged in animal husbandry and the protection of animals (Vacek, 1934; Nejezchleba, 1971).

However, the true and resolute protagonist in this sphere was the physiologist, professor MUDr. et MVDr. h.c. Edward Babák, having an integrated perception of life and the world. In his studies of reception and regulatory mechanisms he went to the very limits of (even beyond) phenomena of life (Babák, 1905ab, 1924ab; Rostohar, 1926ab, 1927; Hykeš, 1954; Křeček, 1955, 1971, 1973; Holub, 1973, 1997; Bravený a Franc, 1997; Holub a Baranyiová, 1997; Linhart a Šindlář, 1997; Ošťádal, 1997; Směkal, 1997).

Babák aroused the interest in animal behaviour in his students, at the School of Veterinary Medicine. The first was Oldřich Vilém Hykeš (Hykeš, 1922, 1924, 1926), who devoted his studies to the classical themes of the beginnings of Czech ethology (Janko, 1982), the taxis of lower animals. Soon Tomáš Vacek followed with his studies of conditioned reflexes (Vacek, 1926, 1937abc). In 1926 Vacek stressed the significance of studying animal behaviour and animal psychology in veterinary medicine. As early as in 1927, elective lectures in animal psychology and experimental psychology were included in the veterinary curriculum.

Vacek based his lectures methodologically and philosophically on the behaviourism of those days. Vacek was also interested in the mechanisms of behaviour, and Pavlov's studies of higher nervous activity became not only a regular part of his lectures but its interpretation was incorporated in his textbook of comparative physiology (Vacek, 1937c). He described and explained events that were considered unsuitable

for scientific study by conservative authorities at that time. Vacek combined comparative psychology and ethology in a very modern way.

However, Vacek's cultivation of this area of veterinary sciences had a further dimension. He respected the fact that humans had lived closely with animals for thousands of years, observing and evaluating behaviour of animals, but not being able to interpret it objectively, still well-aware of signs of animal pain, fear and other attributes of animal psyche. Otherwise, they would not be able to lead, direct, and control them. Vacek did not exclude these human impressions and observations from science, especially because they did not come from accredited scientists from laboratories with exactly defined conditions, often unsuitable or unnatural for animals.

Phenomena of behaviour and health care of animals are connected in an inseparable way. They have developed in mutual interactions for decades. Therefore, veterinarians should be specialists who instruct others in the art of treating animals. They serve as a go-between of the species. They provide interspecies communication. They should also be able to educate their clients to communicate efficiently with their animals, to anticipate and control their behaviour. The beginnings of Czech veterinary education luckily anticipated this desirable development mainly due to the efforts of Tomáš Vacek. The science of animal behaviour, the development of which is a history of successful changes, doubts and challenges to the status quo of the science, was a part of the Czech veterinary curriculum in the 1920s and 1930s. Fourteen years later, in 1939, it was silenced and destroyed by the Nazis. Nevertheless, it has been possible to resume the science of animal behaviour, especially since modern veterinary medicine and the health care of animals is continually more intertwined with ethology.

Představa, že by etologická problematika nebyla zastoupena ve studijním zvěrolékařském kurikulu, je nemyšlitelná. Poznatky o chování zvířat v něm od prv-

ních začátků institucionalizace vysokých veterinárních učení zahrnuty bývají, ale nesystematicky. Skrývají se pod různými názvy ve více oborech, které tvoří jak

teoretické, tak aplikované základy profese. Jako ucelený soubor vědeckého poznání, tvořících samostatný vědní obor, počínají být obecně tradovány teprve v době nejnovější.

Možnosti získávat informace o zdravotním stavu jedince používané v medicíně humánní jsou totiž u pacientů jiných živočišných druhů značně omezené. Anamnestické informace majitelů či ošetřovatelů o chování jim svěřených tvorů jsou až příliš často zlomkovité, neúplné, nepřesné a antropomorfní. A tak je klíčovým momentem poznávacího procesu, zvláště v klinické veterinární medicíně, přímá interakce živočichů a zvěrolékařů, kteří postupují na základě specifických, desítky a desítky let propracovaných postupů, sledují, pozorují polohy, postoje a pohyby pacientů. Na etologických znalostech, na komunikacích mezidruhových, na přesnosti a spolehlivosti nálezů, na náležitosti jejich interpretací závisí úroveň péče o zdraví zvířat. Zvěrolékaři jsou na nich existenčně závislí.

U nás má zájem o chování zvířat hluboké profesionální kořeny. Jako jeden z prvních jej cíleně projevovat profesor Antonín Hřůza, talentovaný a neúnavný organizátor chovu a ochrany zvířat. Ve své době příznačně psal o duševnu zvířat, zvláště psů (Vacek, 1934; Nejezchleba, 1971).

Mezi protagonisty této oblasti českého zvěrolékařství nelze opomíjet profesora MUDr. et MVDr. h.c. Edwarda Babáka, který měl k problematice psychologických jevů hluboký vztah. Bylo mu vlastní celostní pojetí organismů. Byl nadán integrativním a integrujícím viděním života i světa. Ke studiu recepčních a regulačních mechanismů, v němž zacházel až na samý okraj (neváhal jej i překračovat) jevů, jimiž se zabývají vědy o životě, měl blízko. Opakovaně se k nim vracel (Babák, 1905ab, 1924ab; Rostohar, 1926ab, 1927; Hykeš, 1954; Křeček, 1955, 1971, 1973; Holub, 1973, 1997; Bravený a Franc, 1997; Holub a Baranyiová, 1997; Linhart a Šindlář, 1997; Ošťádal, 1997; Směkal, 1997). Do biologie a fyziologie svébytně vnášel nejen prostor a čas, prvky ekologické i historické (evoluční, fylogenetické i ontogenetické), ale jevil i hluboký zájem o mechanismy, které tyto proměnné integrují. Bylo v něm hluboce zakotveno vědomí souvislostí.

Po dlouhé hodiny vydržel pozorovat a zaznamenávat životní projevy tvorů, jimiž se s láskou obklopoval (Bravený a Franc, 1997). Jeho počínání a myšlení bylo prostoupeno prvky, které bychom dnes označili za etologické. Byl přesvědčen, že dokonalé pozorování na celém neoperovaném zvířeti může dát platnější a skutečnosti více odpovídající výsledky než nákladný pokus se složitou aparaturou (Holub, 1973). Během svého brněnského působení realizoval toto zaměření, a to nejen organizačně, především na lékařské a filozofické fakultě univerzity (Babák, 1924ab; Holub, 1994; Bravený a Franc, 1997).

Plně je však projevil na brněnské vysoké škole zvěrolékařské. K zájmu o chování zvířat tam přivedl i své žáky. Prvním byl Oldřich Vilém Hykeš (Hykeš,

1922, 1924, 1926) věnující se klasické problematice začátků české etologie (Janěk, 1982), taxím nižších živočichů. Brzy následoval Tomáš Vacek zabývající se podmíněnými reflexy (Vacek, 1926, 1937abc). Ten již ve své habilitační přednášce zdůraznil význam studia chování a psychologie zvířat pro veterinární medicínu. Brzy na to, v roce 1926, požádal komisi školy pro reformu zvěrolékařského studia, aby byly přednášky o psychologii zvířat a experimentální psychologii zařazeny do brněnského kurikula, a to pro posluchače pátého či některého z vyšších semestrů. Byl vyslyšen. Od letního semestru roku 1927 se v seznamu přednášek brněnského vysokého učení zvěrolékařského pravidelně objevovaly i Vackovy nepovinné přednášky „Základy psychologie zvířat“. Přednášval hodinu, v úterý odpoledne, od 15 do 16 hodin. Výuka byla již po roce rozšířena na semestry dva, zimní i letní. Její skutečný rozsah v jednotlivých letech však dosti kolísal, od pouhých 4, 6 a 7 hodin (v roce 1931–32, 1936–37 a 1937–38) až do 21 a 18 hodin (v roce 1933–34 a 1934–35). V roce 1931 přednášku doplnil, jak si zapsal na zkoušku, dvouhodinovým cvičením.

Postupoval tak, že po úvodu a stručném výkladu historie psychologie zvířat jako vědy, byla věnována pozornost vědomí, podvědomí a reflexům, a to i podmíněným. Převážná část kurzu pak připadala výkladu o instinktech, čidlech a smyslech, který býval doprovázen obrazy a demonstracemi, např. chování akvarijních rybek, axolotlů, myši, ale také ukázkami činnosti čidel a jejich korelátů v centrálním nervovém systému.

Dnes je velmi nesnadné analyzovat Vackovu filozofii psychologie zvířat. Nepochybně je, že se zaměřoval především na jejich vnější projevy, na pozorovatelné chování, méně na jevy vnitřní. Pohyboval se tedy převážně v poli tehdejšího behaviorismu a nebehaviorismu, který se na začátku dvacátého století vynořil v USA, jako mechanistická reakce na introspektivní psychologii. Nasvědčuje tomu i skutečnost, že hojně čerpal z děl představitelů a příznivců behaviorismu, včetně časopisů, které tento směr studia zvířat reprezentovaly „The Journal of Animal Behavior“ a „Behavior“. Zajímal se však i o mechanismy chování zvířat, o podmíněné reflexy (Vacek, 1926, 1937ab), Pavlovo učení o vyšší nervové činnosti se stalo nejen stálou součástí jeho přednášek psychologických a fyziologických, ale jeho výklad začlenil i do své učebnice srovnávací fyziologie (Vacek, 1937c).

Jeho pojetí přednášek o psychologii zvířat bylo tedy metodologicky i filozoficky do značné míry behavioristické. Popisovalo a vysvětlovalo jevy, které konzervativní autority té doby pokládaly za vědeckému zkoumání nepřístupné (Burgardt, 1997). Spojovalo na svou dobu velmi moderně srovnávací psychologii s etologií. Bylo vzdáleno i některým vizím jeho učitele Babáka. Nemělo tedy daleko ke kořenům, z nichž dnešní nauka o chování zvířat vyrůstá.

Vackovo rozvíjení této oblasti zvěrolékařských věd však mělo i další rozměr. Respektoval, že lidé spolu žijí, soutěží a spolupracují se zvířaty efektivně po tisí-

ciletí. Pozorují a hodnotí jejich chování, ale nebývají s to o něm referovat objektivně. Neumějí je vysvětlovat. Počínají si antropomorfně a jejich představy mnohdy mají až anekdotický charakter. Jsou však dobře znali živočišných projevů bolesti, strachu a dalších atributů jejich psychiky. Jinak by byli zranitelní. Nebyli by s to je vést, řídit a kontrolovat. V době Vackova působení, ve dvacátých a třicátých letech, někteří vědci experimentující v laboratorních podmínkách tyto poznatky a zkušenosti ignorovali. Přístupovali k psychologii zvířat agnosticky. Postřehy, údaje a snad i interpretace odborně neeurodovaných pomíjeli a vylučovali z vědy jen proto, že nebyly získány akreditovanými vědci v laboratořích, mnohdy v podmínkách sice definovatelných, ale pro zvířata nevhodných až nepřírodných. Ne tak Vacek. Těto zpozdilosti byl vzdálen. I my bychom měli být při hodnocení interpretací a teorií graduovaných učenců skeptičtí a striktní, ale měli bychom být demokratičtí v akceptování laických pozorování, dat a údajů (Rollin, 1997).

Fenomeny chování a péče o zdraví zvířat jsou spolu neoddělitelně spojeny. Po desetiletí se vyvíjely ve vzájemných interakcích. Veterináři by proto měli být odborníky, kteří jiné v umění zacházet se zvířaty instruují. Jsou prostředníky mezi druhy. Měli by být s to vychovávat i své klienty tak, aby mohli efektivně se svými svěřenci komunikovat, jejich chování předvídat a řídit (Caporalet a Heyes, 1997).

Začátky českého zvěrolékařského vzdělávání tento žádoucí vývoj především zásluhou Antonína Hruzy, Edwarda Babáka, Oldřicha Viléma Hykeše, ale hlavně Tomáše Vacka, šťastně anticipovaly. Nauka o chování zvířat, jejíž vývoj je historií úspěšných změn, pochybností a výzev danému status quo vědy, byla již ve dvacátých a třicátých letech součástí brněnského zvěrolékařského studijního kurikula. V roce 1939, po čtrnácti letech, byla česká nauka o chování zvířat nacisty ulčena a zhubena. Naděje do ní vkládané byly zmarněny. Třebaže byl její rozvoj brutálně přerván, je možné na ni navazovat. Je toho třeba o to víc, že se moderní veterinární medicína s etologií stále víc prorůstá. Péče o zdraví zvířat se etologizuje (Holub a Baranyiová, 1997).

Poděkování

Za účinnou pomoc při studiu archívních materiálů děkujeme PhDr. Jiřímu Šindlářovi z Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně.

PRAMENY

Archív Ústavu humanitních disciplin a jazyků Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně.
Archív Antonína Holuba.

LITERATURA

- BABÁK, E. (1905a): O přibuzenském vztahu člověka k živočichům. Přehled 4, 8–10.
- BABÁK, E. (1905b): Psychologická učebnice Dra F. Krejčího po stránce biologické. Čas. Lék. Českoslov., 44, 987–988, 1011–1013, 1036–1038, 1060–1062, 1086–1088.
- BABÁK, E. (1924a): Pokusná psychologie. Příroda, 17, 169–175.
- BABÁK, E. (1924b): Filosofické důsledky novodobé biologie. Inaugurační rektorská přednáška. Brno, 15 s.
- BRAVENÝ, P. – FRANCO, Z. (1997): Život a dílo. In: Edward Babák. Brno, s. 9–70.
- BURGHARDT, G. M. (1997): Amending Tinbergen: A fifth aim for ethology. In: Anthropomorphism, Anecdotes, and Animals. Albany, s. 254–276.
- CAPORALET, L. R. – HEYES, C. M. (1997): Why anthropomorphise? Folk psychology and other stories. In: Anthropomorphism, Anecdotes, and Animals. Albany, s. 59–73.
- HOLUB, A. (1973): Babákovy dílo a současná fyziologie. Čs. Fysiol., 22, 501–504.
- HOLUB, A. (1994): Prof. MUDr. Edward Babák a PhDr. h.c. Leoš Janáček. Vlastivěd. Věst. Mor., 46, 51–53.
- HOLUB, A. (1997): Prof. MUDr. et MVDr. h.c. Edward Babák. Vet. Med. – Czech, 42, 149–153.
- HOLUB, A. – BARANYIOVÁ, E. (1997): Výuka etologie v české veterinární medicíně. In: 24. etologická konference. Program a abstrakty. Mikulov, s. 31.
- HYKEŠ, O. V. (1922): Příspěvek ke stereotaxi bahenních červů. Biol. Listy, 8, 216–222.
- HYKEŠ, O. V. (1924): Mechanismus společných tahů housenek bource toulavého, *Thanmatopoea (Conethocampus) processionis*. Biol. Listy, 10, 281–284.
- HYKEŠ, O. V. (1926): Profesor Babák a zvířata. Příroda, 19, 19–20.
- HYKEŠ, O. V. (1954): Edward Babák. Čs. Fysiol., 3, 4–8.
- JANKO, J. (1982): Vznik experimentální biologie v Čechách (1882–1918). Studie ČSAV 8. Praha, 132 s.
- KŘEČEK, J. (1955): Babákovy práce o fyziologii vyvíjejícího se organismu. Čs. Fysiol., 4, 253–259.
- KŘEČEK, J. (1971): The theory of critical development periods and postnatal development of endocrine functions. In: The biopsychology of development. New York, s. 233–248.
- KŘEČEK, J. (1973): O kritických vývojových periodách. Čs. Fysiol., 22, 505–520.
- LINHART, K. – ŠINDLÁŘ, J. (1997): K filozofickým názorům Edwarda Babáka. In: Edward Babák. Brno, s. 106–114.
- NEJEZCHLEBA, J. (1971): Profesor Antonín Hruza – budoval Vysoké školy veterinární v Brně. Acta Vet. Brno, 40, 369–373.
- OŠTÁDAL, B. (1997): Babák a vývojová medicína. In: Edward Babák. Brno, s. 115–117.
- ROLLIN, B. E. (1997): Anecdote, anthropomorphism, and animal behavior. In: Anthropomorphism, Anecdotes, and Animals. Albany, s. 125–133.
- ROSTOHAR, S. (1926a): Vzpomínky na profesora Babáka. Čas. Lék. Českoslov., 65, 977–978.
- ROSTOHAR, S. (1926b): Babákovy filosofické a psychologické názory. Biol. Listy, 12, 203–205.

ROSTOCHAR, S. (1927): Babák psycholog. In: Sborník památce Edwarda Babáka. Brno, s. 25–54.
SMĚKAL, V. (1997): Babákův přínos psychologii. In: Edward Babák. Brno, s. 100–105.
VACEK, T. (1926): O podmíněných reflexech u morčete. Biol. Listy, 12, 438–443.
VACEK, T. (1934): Prof. Ant. Hruža sedmdesátníkem. Zvěrolék. Obzor, 27, 461–465.

VACEK, T. (1937a): Podmíněné reflexy. Věda a život, 3, 298–305.

VACEK, T. (1937b): Tři mládenci v peci ohnivé. Věda a život, 3, 451–457.

VACEK, T. (1937c): Srovnávací fyziologie domácích zvířat a ostatních obratlovců. Brno, 686 s.

Received: 98–05–07

Accepted: 98–05–11

Kontakní adresa:

Antonín Holub, Koliště 9, 602 00 Brno, Česká republika

Oznamujeme čtenářům a autorům našeho časopisu,

že v návaznosti na časopis *Scientia agriculturae bohemoslovaca*, který až do roku 1992 vycházel v Ústavu vědeckotechnických informací Praha, vydává od roku 1994

Česká zemědělská univerzita v Praze

časopis

SCIENTIA AGRICULTURAE BOHEMICA

Časopis si zachovává původní koncepci reprezentace naší vědy (zemědělství, lesnictví, potravinářství) v zahraničí a jeho obsahem jsou původní vědecké práce uveřejňované v angličtině s rozšířenými souhrny v češtině.

Časopis je otevřen nejširší vědecké veřejnosti a redakční rada nabízí možnost publikace pracovníkům vysokých škol, výzkumných ústavů a dalších institucí vědecké základny.

Příspěvky do časopisu (v angličtině, popř. v češtině či slovenštině) posílejte na adresu:

Česká zemědělská univerzita v Praze
Redakce časopisu *Scientia agriculturae bohemica*
165 21 Praha 6-Suchdol

SELECTED PROBLEMS OF VETERINARY PHARMACOLOGY

B. F. Kania

Fundacja Rozwój SGGW Warszawa, 1996. 294 pp., 22 Tabs., 36 Figs. ISBN 83-86980-30-3.

The dynamic development of biological sciences has also had a positive influence on the current knowledge of the activating mechanisms, especially in the case of human and animal organisms. This is not only the case at the level of particular systems or parts of the body, but also at the cellular or subcellular level. The cellular mechanisms for activating ligands and specific drugs, as well as some other data have been presented in 22 chapters of this book (e.g. neuromuscular blocking agents and immobilizing drugs, local anaesthetics, adrenergic agonists and antagonists, cholinergic agonists and antagonists, tranquillizers, anxiolytic drugs, analgesics, sedatives, hypnotics, general anaesthetics, analeptics, autacoids, antiinflammatory drugs, respiratory drugs, digestives, diuretics, cardiovascular drugs, antianaemics, haemostatics and haemathopoetic drugs, anaphylactoidal drugs, hormones, and somatotropic drug, etc.).

The book also includes the latest knowledge about drugs, such as their origin, chemical structure, their functional receptors, guidance on usage, dosage for different species, interactions, adverse effects, contraindications as far as the veterinary practice is concerned.

This information makes the book very useful for veterinary students and veterinary practitioners, as well as pharmacologists and physicians involved in experimental pharmacology or in the veterinary pharmaceutical sector. In this field the important educational aspects of this publication are emphasized as well as its usefulness in the teaching process and rational therapy. The difficult aspects regarding the action and role of the nervous system and related drugs are presented by the author in a logical comprehensive, and clear way. He therefore introduces highly specialized fields (the role of receptors, messengers, kinins, endogenous opioid peptides, and neurotransmitters in biopharmaco-biochemical processes) even for those who are not very well acquainted with these matters. The book can thus be very useful again also for students and practitioners in the food – agriculture – ecology complex, furthermore for students and practitioners of pharmacy, natural science, and medicine.

Finally I must say that I am sure that also this book will be well used by some specialists in Slavic countries and after translation into world languages by other students and experts.

Assoc. Prof. V. Šutiak, D.V.M., Ph.D.

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

Current Contents

na disketách

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

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

Přístup k informacím Current Contents je umožněn dvojím způsobem:

- 1) Zakázkový přístup** – po vyplnění příslušného zakázkového listu (objednávky) je vhodný především pro mimopražské zájemce.
Finanční podmínky: – použití PC – 15 Kč za každou započatou půlhodinu
– odborná obsluha – 10 Kč za 10 minut práce
– vytištění rešerše – 1 Kč za 1 stranu A4
– žádanky o separát – 1 Kč za 1 kus
– poštovné + režijní poplatek 15 %
- 2) „Self-service“** – samoobslužná práce na osobním počítači v ÚZLK.
Finanční podmínky jsou obdobné. Vzhledem k tomu, že si uživatel zpracovává rešerši sám, je to maximálně úsporné. (Do kalkulace cen nezapočítáváme cenu programu a databáze Current Contents.)

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

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna

Dr. Bartošová

Slezská 7

120 56 Praha 2

Tel.: 02/24 25 79 39, l. 520, fax: 02/24 25 39 38

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

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 kurzivy, glosy, dopisu redakci, diskusního příspěvku, kritiky zásadního článku apod., ale i zkušenosti z cest do zahraničí, z porad a konferencí.

Auťori 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 zřetel k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu a kvalitě práce. Redakce přijímá práce impromované vedoucím pracoviště nebo práce s prohlášením vědeckého autora, 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.

Rukopis má být napsán na papíře formátu 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 citovaná v textu práce se uvádí jménem autora a rokem vydání. Do seznamu se zařadí jen publikace citované v textu. Citace se řadí abecedně podle jména prvních autorů.

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 PŠC, číslo telefonu a faxu, popř. e-mail.

Podrobné pokyny pro autory lze vyžádat v redakci.

Applications for detailed instructions for authors should be sent to the editorial office.

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 should be typed on standard paper (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.

References in the manuscript are given in form of citations of the author's name and year of publication. A list of references should contain publications cited in the manuscript only. References are listed alphabetically by the first author's name.

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 43, No. 10, October 1998

CONTENTS

Borošková Z., Dvorožňáková E., Dubinský P., Velebný S., Tomašovičová O., Machnicka B.: Effect of free and liposomized albendazole on the immune responses in healthy and <i>Toxocara canis</i> -infected mice (in English).....	293
Pavlík I., Černík J., Bárta J., Kundera J., Pecka Z.: Occurrence of coccidia (<i>Caryospora neofalconis</i> and <i>Caryospora kutzeri</i>) in birds of prey in falcon breeding facility in Milotice in the Czech Republic (in English).....	301
REVIEW ARTICLE	
Pospíšil L.: Chlamydiosis in the fish.....	307
Machala M., Vondráček J.: Estrogenic activity of xenobiotics (in English).....	311
Holub A., Baranyiová E.: Animal behaviour and Czech veterinary curriculum in the 1920s and 1930s	319
BOOK REVIEW	
Šutiak V.: B. F. Kania: Veterinary Chemotherapy (in English).....	318
Šutiak V.: B. F. Kania: Selected Problems of Veterinary Pharmacology (in English).....	323

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 43, č. 10, Říjen 1998

OBSAH

Borošková Z., Dvorožňáková E., Dubinský P., Velebný S., Tomašovičová O., Machnicka B.: Vplyv voľného a lipozómovaného albendazolu na imunitné prejavy zdravých a <i>Toxocara canis</i> infikovaných myší.....	293
Pavlík I., Černík J., Bárta J., Kundera J., Pecka Z.: Výskyt kokciidií (<i>Caryospora neofalconis</i> a <i>Caryospora kutzeri</i>) u dravých ptákov v odchovně sokolovitých dravců v Milotičích v České republice.....	301
PŘEHLED	
Pospíšil L.: Chlamydióza ryb (epitheliocystis).....	307
Machala M., Vondráček J.: Estrogenní aktivita cizorodých látek.....	311
Holub A., Baranyiová E.: Chování zvířat a české zvěrolékařské studijní plány ve dvacátých a třicátých letech.....	319
RECENZE	
Šutiak V.: B. F. Kania: Veterinary Chemotherapy.....	318
Šutiak V.: B. F. Kania: Selected Problems of Veterinary Pharmacology.....	323

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 1998

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