

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

Ústav zemědělských
a potravinářských informací
Ústřední zemědělská a lesnická knihovna
Slezská 7, 120 56 Praha 2

- 8. června 1999

6

VOLUME 44
PRAHA
JUNE 1999
ISSN 0375-8427

101-62P1

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

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

Prof. MVDr. Bohumil Ševčík, DrSc., BIOPHARM – Research Institute of Biopharmacy and Veterinary Drugs, a. s.,

Jilové 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-Science, CAB Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

Periodicita: Časopis vychází měsíčně (12x ročně), ročník 44 vychází v roce 1999.

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, Česká republika. Tel.: +420 2 24 25 79 39, fax: +420 2 24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz. Podrobné pokyny pro autory jsou v redakci a na URL adrese <http://www.clark.cz/vri/Pokyny.htm>.

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 1999 je 696 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-Science, 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 44 appearing in 1999.

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, Czech Republic. Tel.: +420 2 24 25 79 39, fax: +420 2 24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz. Detailed instructions for authors are available in the editorial office and at URL address <http://www.clark.cz/vri/Pokynya.htm>.

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 1999 is 159 USD (Europe), 167 USD (overseas).

EVALUATION OF THE PATHOGENICITY OF STRAINS OF *Plesiomonas shigelloides* ISOLATED IN ANIMALS

HODNOCENÍ PATOGENITY KMENŮ *Plesiomonas shigelloides* IZOLOVANÝCH ZE ZVÍŘAT

J. Bardoň

National Veterinary Institute, Olomouc, Czech Republic

ABSTRACT: In the years 1994–1997, 4 552 samples of sectional, clinical material and environment were examined for the presence of *Plesiomonas shigelloides*. In 55 cases (1.21%) *P. shigelloides* was isolated. 60% of the strains were isolated in relation to the decease or disease of the host animal. In 7 cases the pure culture of *P. shigelloides* was isolated. The hemolytic activity of the isolated strains was furthermore tested by means of the modified Camp-test. Positive result of the test was demonstrated in 38.5% of the strains, in most cases it corresponded with the decease or disease of the host animal.

Plesiomonas shigelloides; pathogeny; factors of pathogeny; modified Camp-test

ABSTRAKT: *Plesiomonas shigelloides* patří z hlediska svého patogenního uplatnění u teplokrevných i studenokrevných živočichů ke kontraverzním mikroorganismům. Literární údaje o *P. shigelloides* ve veterinární mikrobiologii (např. Vladík a Vítovec, 1972, 1974; Bardoň, 1994), jsou méně časté. Etiologický význam *P. shigelloides* pokládá většina autorů za nejasný. V humánní medicíně existuje řada literárních údajů, vesměs kasuistik, které popisují uplatnění *P. shigelloides* u pacientů s infekcí např. gastrointestinálního traktu, včetně infekcí systémových (např. Terpeluk aj., 1992; Curti aj., 1985; Ingram aj., 1987). Závažné kasistiky reprezentující klinické uplatnění výše uvedeného mikroorganismu však nekorrespondují s experimentálními pracemi jiných autorů (např. Abbottová aj., 1991; Sayeed aj., 1992; Janda a Abbottová, 1993), kteří se věnovali vlastním faktorům virulence. Tito autoři konstatují všeobecně nízký patogenní potenciál *P. shigelloides in vitro*. Výše uvedené skutečnosti, včetně nedostatečného literárního zázemí, byly důvodem pro vznik této práce, ve které se autor pokusil zmapovat výskyt *P. shigelloides* u obratlovců na střední Moravě a zhodnotit jeho patogenní uplatnění, včetně pokusu o jednoduché stanovení faktoru patogenity u izolovaných kmenů. V letech 1994 až 1997 bylo vyšetřeno 4 552 vzorků sekčního, klinického materiálu, prostředí a v 55 případech (1,21 %) byl izolován *P. shigelloides*. Přehled vyšetřeného materiálu podle živočišných druhů a počty izolací uvádí tab. I. Větší část kmenů (60 %) byla izolována v souvislosti s úhynem nebo onemocněním hostitele. Základní patoanatomické nálezy u hostitelů s pozitivní izolací shrnuje tab. II. V sedmi případech (12,7 %) z 55 izolovaných kmenů byla z materiálu s patoanatomickým či klinickým nálezem prokázána čistá kultura *P. shigelloides*. Pro zhodnocení případného faktoru patogenity byl použit modifikovaný Camp-test, ve kterém byly na krevním agaru kolmo na sebe nanášeny testované kmene *P. shigelloides* a sbírkový kmen *Staphylococcus aureus* (CCM 3953). Jako pozitivní Camp-test bylo pokládáno zřetelné projasnění zóny hemolýzy *Staph. aureus* v místě kontaktu s narostlou kulturou *P. shigelloides*. V negativním případě byla zóna hemolýzy *Staph. aureus* nezměněna. V naprosté většině případů byly kmene, které vykazovaly pozitivní Camp-test, izolovány z hostitelů v souvislosti s jejich onemocněním nebo úhynem. U sedmi kmenů izolovaných ze zdravotně postižených hostitelů v čisté kultuře byl prokázán pozitivní modifikovaný Camp-test. Uvedené výsledky naznačují, že *P. shigelloides* je u obratlovců schopen vyvolat samostatně onemocnění i úhyn. Hemolytická aktivita prokázána v modifikovaném Camp-testu u kmenů izolovaných z hostitelů s alterovaným zdravotním stavem může být znakem patogenity kmene. Problém patogenního uplatnění *P. shigelloides* u zvířat i lidí si zaslouží další, podrobnější studium.

Plesiomonas shigelloides; patogenita; faktory patogenity; modifikovaný Camp-test

INTRODUCTION

Plesiomonas shigelloides, the only species of the genus *Plesiomonas*, which belongs to the family *Vibrionaceae*, is considerably controversial from the point of view of the pathogenic application in veterinary and human medicine. Literary expositions on the occurrence of *P. shigelloides* in veterinary microbiology are less frequent than those in human microbiology. Vladík and Vítovec (1972) inform about the incidence of *P. shigelloides* in the liver of two turkeys which died of histo-

moniasis. Considering that the cause of death was presumably histomoniasis, the authors cannot objectively report on the pathogenicity of the strains. However, it is the first isolation of that kind in poultry whatever. The same authors (Vladík and Vítovec, 1974) refer to a case of septicemia in trout, where along with *Flavobacterium* sp. and *Aeromonas hydrophilla* also *Plesiomonas shigelloides* was isolated. Bardoň (1994) describes sepsis in the half-ape lemur vari (*Varecia variegata*), which was demonstrably caused by *P. shigelloides*. Klimeš and Čížek (1996) report on the isolation

of *P. shigelloides* from the feces of clinically healthy cats and dogs and also of those suffering from diarrhea. However, they consider their meaning unclear. Briefly mentioned are the findings in apes, goats, cows, cats and dogs (Sakazaki and Ballows, 1981).

In human medicine there exists a range of cases describing *P. shigelloides* as a causer of serious diseases often with fatal progress. Terpeluk et al. (1992) describe fatal sepsis and the meningoencephalitis in the child. Curti et al. (1985) refer to a fatal infection in patient suffering from Hodgkin's disease after the implementation of splenectomy. Ingram et al. (1987) describe 11 cases of serious illnesses (gastroenteritis, sepsis, osteomyelitis) caused by *P. shigelloides*.

The issue of the respective pathogenic potential *in vitro* was studied especially by Abbott et al. (1991), who dealt with the subject of enterotoxin and plasmid. Sayeed et al. (1992) demonstrated in *P. shigelloides* the existence of a large plasmid, the size approximately of the "aggressive plasmid" in the species *Shigella* sp. Janda and Abbott (1993) tested the hemolytic activity in 36 strains of *P. shigelloides*. In 34 strains of *P. shigelloides* the hemolytic activity was proved, which corresponded to the production of beta-hemolysin. However, all the above mentioned authors stated that the results of their studies do not explain satisfactorily the respective pathogenic function of *P. shigelloides* and they do not consider the production of enterotoxin, plasmid and hemolysin to be the main factor of virulence in systemic infections. Due to some incongruity between the ambiguous test results of the factors of pathogenicity *in vitro* and serious cases in clinical practice, further, more detailed study of the factors of pathogenicity has been recommended.

Because of the above mentioned facts and the ambiguous status in clinical veterinary microbiology, in this study the author attempted to map the occurrence of *P. shigelloides* and its serovars in the animal population in the central part of Moravia, to evaluate its pathogenic function and to attempt a simple statement of the factor of pathogenicity in isolated strains.

MATERIAL AND METHOD

4 552 samples were inspected for the presence of *P. shigelloides* within the period of January 1994 to October 1997. The samples were divided into three basic categories: sectional material (2 506 samples), clinical material (1 992 samples), environmental samples (54 samples). The first category is represented by samples collected during the patho-anatomical dissection of animals. Samples of clinical material of animals belong to the second category, comprising chiefly rectal swabs of mammals, cloacal swabs of reptiles and amphibians, sporadically of birds and the feces of mammals and birds. The third category consists of environment samples, that means samples of water and skims of environment. The number of examinations and positive

samples according to particular classes and genera are presented in Tab. I.

The material, which was inspected for the presence of *P. shigelloides*, was delivered to the National Veterinary Institute in Olomouc for laboratory examination with the purpose of stating the cause of the disease and death (sectional and clinical material), or for the preventive examination (clinical material) and for the evaluation of the microbial contamination of the environment (skims of environment, water). In addition to the bacteriological examination proper, where indicated, virological, parasitological and mycological examination has been performed.

During the bacteriological examination the entire material was simultaneously examined by direct culturing on solid culture media (Columbia blood agar; Endo

I. Detection of *Plesiomonas shigelloides* in relation to the particular animal species

Animals	Number of examinations	Number of findings	%
Mammalia	2229	21	0.94
Cat	472	10	2.12
Pig	639	5	0.78
Wolf	18	2	—*
Dog	335	1	0.30
Raccoon	2	1	—
Binturong	1	1	—
Mouse	3	1	—
Other mammals	759	0	—
Birds	1272	10	0.79
Domestic fowl	618	5	0.81
Duck	215	1	0.46
Ostrich	12	1	—
Egret	5	1	—
Crane	3	1	—
Parrot	8	1	—
Other birds	411	0	—
Reptiles	240	4	1.66
Tortoise	49	2	—
Crocodile	17	2	—
Other reptiles	174	0	—
Amphibians	7	0	—
Fishes	683	18	2.63
Aquarium fishes	115	10	8.70
Catfish	59	4	—
Trout	121	3	2.47
Carp	187	1	0.53
Other fishes	201	0	—
Environment	54	2	—
Aquarium water	7	1	—
Swabs (slaughterhouse)	47	1	—
Total	4552	55	1.21

* Note:

In cases where less than 100 samples were examined, the percentage of incidence is not entered (statistically insufficiently probative)

agar; xylose-lysine deoxycholate agar) and by inoculation into liquid medium (buffered peptone water – pH 8.2; liquid medium of Monsur) and a subsequent inoculation on solid media. The identification proper of the isolated strains was performed by the test set enterotest I. and II. by Lachema Brno Co., Czech Republic.

The hemolytic activity of the isolated strains was tested on blood agar (5% of defibrinated sheep blood) with pure culture of the strain. The hemolytic activity was simultaneously examined in the modified Camp-test, using the strain *Staphylococcus aureus* (CCM 3953) and the isolated strains of *P. shigelloides*. Visible lightening of the partial zone of the hemolysis of the staphylococcus in the area of contact with the culture of the examined strain was considered a positive result of the Camp-test. In negative case, the zone of the hemolysis of the staphylococcus in the area of contact did not change.

RESULTS

Out of 4 552 examined samples *P. shigelloides* was isolated in 55 cases (1.21%). 60% of the strains (33 out of 55 isolated strains) were isolated in relation to the death or clinical disease of the host. In the remaining 22 isolated strains of *P. shigelloides* direct relation with disease of the host could not be proved. The basic clinical and pathoanatomical findings of hosts from which pathologically changed tissues *P. shigelloides* were isolated are presented by Tab. II.

The finding of *P. shigelloides* has not been connected with a positive virological finding in any of the cases, which would indicate developing virus etiology of the disease of the host. In addition to *P. shigelloides* 10 other genera of bacteria were isolated. Most frequently the genus *Escherichia* (30x) was isolated together with *P. shigelloides*, in 17 cases without any relation to the disease or death of the host. A frequent parallel bacteriological finding (especially in fish) was the genus *Aeromonas* (11x) followed by the genus *Edwardsiella* (4x), *Citrobacter* (3x), *Morganella* (3x), *Staphylococcus* (2x), *Klebsiella*, *Salmonella* and *Bacillus* (one case each).

After the parasitological examination, infusorians of the genus *Trichodina* were detected (cutaneous lesion in fish).

In 7 cases out of the 55 isolated strains (4x fish, 2x chicken, 1x binturong) – 12.7%, pure culture of *P. shigelloides* was isolated from the material with

patho-anatomical or clinical finding, without any other bacterial and mycotic microflora or parasites.

The proof of the ability to function as an aggressive etiologic agent is the substantial isolation of pure-culture *P. shigelloides* from all parenchymatous organs in Schlegel, H., G.: The Prokaryotes. A handbook on habitats, young binturong (*Arctictis binturong*), in which the sectional finding indicated all evidence of bacterial sepsis.

After 24 hour cultivation none of the 55 isolated strains of *P. shigelloides* autonomously caused, in pure culture, the hemolysis on blood agar. After the evaluation of the hemolytic activity by the modified Camp-test by means of the interaction of the examined strain *P. shigelloides* and the collected strain *Staphylococcus aureus*, positive results were proved in 38.5% of the examined strains.

Except for one strain (rectal swab in clinically healthy raccoon – preventive examination), all the other strains, which were positive in the Camp-test, were isolated from the hosts in relation to their disease or death. In all 7 strains of *P. shigelloides*, which were isolated from diseased host in pure culture, positive result of the modified Camp-test was proved.

DISCUSSION

Published data on the pathogenic application of *P. shigelloides* in veterinary medicine are rather rare. It is apparent from this study that greater part of the strains (60%) were isolated in relation to the disease or death of the host. E.g. in fish, it was the affection of the alimentary canal, hepatopancreas or bleeding into the epithelium of the ventricle. Vladík and Vítovec (1974) describe septicaemia in trout, where *P. shigelloides* was isolated together with *Flavobacterium* sp. and *Aeromonas hydrophilla*. The authors state, that no comparison with other literary data is available. The results of our study indicate, in correspondence with the above mentioned authors, that *P. shigelloides* will probably play a substantial role in the pathogenesis of the diseases in freshwater fish. The same authors (Vladík and Vítovec, 1972) inform about the incidence of *P. shigelloides* in turkey chickens affected with histomoniasis. The importance of *P. shigelloides* in the pathogenesis of this case is ambiguous, however, our results suggest that *P. shigelloides* can obviously function as a pathogen in poultry. Martinec (1981) and Baradoň (1994) describe *P. shigelloides* in apes. The results of this study (sepsis of a young binturong) and also the

II. Basic clinical and patho-anatomical findings in hosts with *Plesiomonas shigelloides*

Host	Clinical and patho-anatomical finding
Fish	frequent deaths of fish hyperemia and inflammation of the intestines (catarrhal and hemorrhagic), degeneration of hepatopancreas, bleeding in the ventricle and internals, edema of the kidney, dilatation of gall bladder, skin lesion
Reptiles	apathy, chronic enteritis and gastritis, liver dystrophy, spleen tumor
Birds	bad physical condition, apespy, enteritis, hyperemia of parenchymatous organs, degeneration of liver, spleen tumor, spleen tumor with multiple yellow foci
Mammals	catarrhal inflammation of the intestines, spleen tumor, sepsis

data about the sepsis of the half-ape lemur vari (Bardoň, 1994) indicate that *P. shigelloides* is capable, under certain circumstances, of generating fatal septic disease in mammals.

Most authors agree that the function of *P. shigelloides* in animals is not quite clear (Klimeš and Čížek, 1996). Scientists in human microbiology start to re-evaluate their opinion on the function of *P. shigelloides*, especially following its application to diseases of the alimentary canal, but also to extraenteric diseases, including systemic diseases.

The meaning of the predisposition factors and especially the immunity disorders cannot be omitted in the evaluation of the pathogenic function. Within the performed laboratory examinations and anamnesis, published in this study, the occurrence of immunodeficiency cannot be evaluated and taken into consideration while determining the level of pathogenicity of *P. shigelloides*. At the same time, the scope of simultaneous virological, parasitological and mycological findings has to be regarded, considering that the examinations have not been performed in all cases *in extenso*, and that they concentrated on microorganisms, which are in the veterinary laboratory diagnostics commonly detectable. Nevertheless, it is apparent that the pathogenic function of this bacteria in animals has to be reckoned with.

Literary data on the factors of the virulence of *P. shigelloides* are not very common in the Czech literary sources. In foreign literature it is primarily Abbott et al. (1991) and Janda and Abbott (1993), who concentrate on the issue, and who state a generally low pathogenic potential. In 36 examined strains, the hemolytic activity was documented by the above mentioned authors in 94% of the cases, which corresponded to the production of beta-hemolysin. In our study, the hemolysis of the examined strains on the blood agar could not be proved. On the other hand, during the interaction with *Staphylococcus aureus* in the modified Camp-test, 38% of the examined strains were positive. Almost in all cases they were strains evidently connected with the disease or death of the host. Janda and Abbott (1993), who state certain hemolytic activity of *P. shigelloides*, do not evaluate them in relation to the pathogenic function of the examined strains. However, a number of strains examined by the above mentioned authors come from human material, which has been concededly taken primarily in the case of a disease of the patient.

P. shigelloides is a bacteria, the importance of which in the veterinary and human microbiology is not exhaustively determined, and it deserves further attention of bacteriologists and clinicians.

REFERENCES

- Abbott S. L., Kokka R. P., Janda J. M. (1991): Laboratory investigation on the low pathogenic potential of *Plesiomonas shigelloides*. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 148–153.
- Bardoň J. (1994): Sepsis caused by *Plesiomonas shigelloides* in the lemur vari (*Varecia variegata*) (Sepse způsobená *Plesiomonas shigelloides* u lemura vari, *Varecia variegata*). *Veterinářství*, 44, 15.
- Curti A. J., Lin J. H., Szabo K. (1985): Overwhelming post-splenectomy infection with *Plesiomonas shigelloides* in a patient cured of Hodgkin's disease. A case report. *Am. J. Clin. Pathol.*, 83, 522–524.
- Ingram C. W., Morrison A. J. Jr., Levitz R. E. (1987): Gastroenteritis, sepsis and osteomyelitis caused by *Plesiomonas shigelloides* in an immunocompetent host. Case report and review of the literature. *J. Clin. Microbiol.*, 15, 1791–1793.
- Janda J. M., Abbott S. L. (1993): Expression of hemolytic activity by *Plesiomonas shigelloides*. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 1206–1208.
- Klimeš, J., Čížek A. (1996): Bacterial infection of the digestive tract (Bakteriální infekce trávicího traktu). In: Svoboda M., Pospíšil, Z. a kol.: Infectious disease of dogs and cats (Infekční nemoci psa a kočky). Brno, Česká asociace veterinárních lékařů malých zvířat. 338.
- Martinec T. (1981): Alphabetical list of bacterial genera and their brief characteristic (Abecední seznam bakteriálních rodů a jejich stručná charakteristika). In: Rozsypal S., Hoďák K., Martinec T., Kocur M: *Obecná bakteriologie*. Praha, SPN, 662–663.
- Sakazaki R., Balows A. (1981): The Genus *Plesiomonas*. In: Sarr M. P., Stolp M., Truper M., Balows A., Schlegel H. G.: *The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 1285.
- Sayeed S., Sack D., Qadri F. (1992): Occurrence of a large plasmid in a strain of *Plesiomonas shigelloides* with cross-reactivity against *Shigella sonnei*. *J. Med. Res.*, 95, 21–22.
- Terpeluk C., Goldmann A., Bartmann P., Pohlandt F. (1992): *Plesiomonas shigelloides* sepsis and meningoencephalitis in a neonate. *Eur. J. Pediatr.*, 151, 499–501.
- Vladík P., Vitovec J. (1972): The finding of the germs of the *Plesiomonas shigelloides* genus in the liver of turkey chickens suffering from histomoniasis (Nález zárodků *Plesiomonas shigelloides* v játrech krůt s histomoniazou). *Vet. Med. (Praha)*, 17, 463–467.
- Vladík P., Vitovec J. (1974): *Plesiomonas shigelloides* in rainbow trout septicemia (*Plesiomonas shigelloides* v septikemii pstruha duhového). *Vet. Med. (Praha)*, 19, 297–300.

Received: 98–10–02

Accepted after corrections: 99–02–25

Contact Address:

MVDr. Jan Bardoň, Státní veterinární ústav, Jakoubka ze Stříbra 1, 779 00 Olomouc, Česká republika
Tel. +420 68 522 56 41, fax +420 68 522 23 94, e-mail: svuol@mbox.vol.cz

DETECTION OF PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS BY A MONOCLONAL ANTIBODY IMMUNOPEROXIDASE TEST*

DETEKCE VIRU PRASEČÍ EPIZOOTICKÉ DIARRHEY POMOCÍ IMUNOPEROXIDÁZOVÉHO TESTU S VYUŽITÍM MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

L. Rodák, L. Valíček, B. Šmíd, Z. Nevoránková

Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: Monoclonal antibodies to porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) were tested using ELISA, Western blot analysis, and immunoperoxidase test. As demonstrated by ELISA, the antibodies were free of cross reactivity with transmissible gastroenteritis virus and Group A rotaviruses. Their specificity was further confirmed by an indirect immunoperoxidase test for the demonstration of PEDV in infected cell lines and intestinal enterocytes of experimentally infected piglets. Possible use of the monoclonal antibodies in the diagnostics of PEDV infections in swine herds is discussed.

porcine epidemic diarrhea virus; coronavirus; ELISA; Western blot analysis; monoclonal antibody; indirect immunoperoxidase test

ABSTRAKT: ELISA metodou, Western blot analýzou a imunoperoxidázovým testem byly testovány monoklonální protilátky proti viru prasečí epizootické diarrhey (PEDV). ELISA metodou byla vyloučena křížová reaktivita těchto protilátek s virem virové gastroenteritidy prasat (VGP/TGE) a rotavirem skupiny A. Jejich specifita byla dále potvrzena nepřímým imunoperoxidázovým průkazem PEDV v infikovaných buněčných liniích i v enterocytech tenkého stěva experimentálně infikovaných selat. Je diskutována možnost využití monoklonálních protilátek při diagnostice PEDV infekcí v chovech prasat.

virus prasečí epizootické diarrhey; koronavirus; ELISA; Western blot analýza; monoklonální protilátky; nepřímý imunoperoxidázový test

INTRODUCTION

Porcine epidemic diarrhea (PED) virus ranks, along with transmissible gastroenteritis (TGE) virus and rotaviruses, among the most significant causative agents of viral gastroenteritis. The infection by PEDV affects swine of all age groups and is associated with a high morbidity, but a lower mortality than TGE. PEDV and TGEV are classified within the family *Coronaviridae*. Morphologically, the two viral species are identical, but they differ in their antigenic composition. Generally, the following major structural proteins are demonstrated in coronaviruses: glycoprotein S (150 to 200 kDa), membrane glycoprotein M (20 to 30 kDa), and nucleocapsid phosphoprotein N (43 to 50 kDa). Further, glycoprotein HE (60 to 65 kDa) was demonstrated on the surface of virions in a subgroup of coronaviruses including bovine coronavirus, porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus, and turkey coronavirus (Saif, 1993; Utiger et al., 1996). As a rule, a high mortality among suckling piglets is associated with the first outbreak of PED in a swine herd (Pijpers et al., 1993; Sueyoshi et

al., 1995). Losses are lower and piglets are often affected by diarrhea at weaning as soon as the infection becomes endemic or during secondary outbreaks. The virus propagates particularly in enterocytes of jejunal and ileal villi (Bernasconi et al., 1995; Sueyoshi et al., 1995). The isolation of field strains of PEDV in cell cultures is rather difficult and requires the presence of trypsin in the medium. Carvajal et al. (1995a) demonstrated antibodies to PEDV in 29.6% sows and 54.3% growing-finishing pigs. The prevalence of the infection in small herds was lower than in large herds. In the Czech Republic, PED was diagnosed in several swine herds by electron and immunoelectron microscopy and by isolation of a field strain of PEDV (Šmíd et al., 1993). Detailed studies have so far been hampered by problems associated with the isolation of field strains and by lack of rapid and specific diagnostic methods. Thus, diagnostic techniques have been limited to immunoelectron microscopic examination of fecal samples, or immunofluorescence or immunoperoxidase tests for PEDV in histological sections of small intestinal samples collected from piglets affected by diar-

* Supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Grant No. 524/97/1065).

rhea. Only recently monoclonal antibodies to major structural proteins of PEDV have been prepared. These were used in blocking ELISA demonstration of antibodies to PEDV in blood serum and milk of sows and of viral antigen in fecal samples (Carvajal et al., 1995a, b; De Arriba et al., 1995, 1998). The demonstration of PEDV by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was also described (Kweon et al., 1997; Ishikawa et al., 1997). However, this sensitive method is too expensive to be used routinely at this time. This paper describes the preparation of monoclonal antibodies to PEDV and the results of their testing by ELISA and Western blot analysis, as well as their use in indirect immunoperoxidase test for PEDV in infected cells and histological sections of intestinal samples collected from experimentally infected piglets.

MATERIAL AND METHODS

Virus

The reference strain CV-777 and a field isolate of PEDV (strain Mackovice, Collection of Animal Pathogenic Microorganisms CAPM V-352) were propagated in the cell line Vero in minimal essential medium (MEM) supplemented with 5% bovine fetal blood serum in the presence of trypsin (Hofmann and Wyler, 1988; Valíček et al., 1993). As soon as cytopathic effect (CPE) was fully developed, the cells were repeatedly frozen/thawed and cell debris was removed from the medium by centrifugation ($3\ 000 \times g$ for 15 min). The virus was purified from the medium by gradient ultracentrifugation (Beckman L8-70 ultracentrifuge, Sw 55Ti) on 20% and 45% saccharose cushions (Hofmann and Wyler, 1990). The presence of PEDV was monitored by electron microscopic examination of negatively stained samples. Purified viral antigen was bound to microtitre plate wells to be used in ELISA for detection of antibodies to PEDV in blood sera and culture media of hybridomas, as well as for immunization of mice. Uninfected Vero cells were processed in the same way to serve as controls.

Porcine immune sera to PEDV

Porcine blood sera containing antibodies to PEDV (PS 2664, 2665, 2742, 2830) were obtained by experimental infection of specific pathogen-free (SPF) piglets bled 2 to 3 weeks later. Further immune sera to PEDV were kindly provided by Dr. M.B. Pensaert (Belgium) and Dr. K. Möstl (Austria). The specificity was checked by ELISA and immunoperoxidase (IP) test for PEDV in infected cells.

Experimental infection

Ten hysterectomy-derived, colostrum-deprived SPF piglets aged 1 to 2 weeks were infected experimentally with PEDV (strain Mackovice, CAPM V-352). Diar-

rhea developed and the piglets were sacrificed 48 h after the infection. Samples of small intestine collected from the boundary between jejunum and ileum were frozen in liquid nitrogen and kept at $-80\ ^\circ\text{C}$. Cryostat sections for use in indirect immunoperoxidase test (Cryo-cut Microtome, American Optical Corporation) were fixed in acetone (15 min at $20\ ^\circ\text{C}$).

Monoclonal antibodies

BALB/c mice were repeatedly immunized by subcutaneous injection of viral antigen emulsified with complete or incomplete Freund's adjuvant. The last dose of the antigen in PBS was administered intraperitoneally 3 to 5 days before fusion. Cell fusion of myeloma (Sp 2/0) and splenic cells (lymphocytes) and their culture in the selection medium HAT were done using the conventional procedures (Galfre and Milstein, 1981). The hybridomas were checked by ELISA and those producing antibodies to PEDV were cloned. The specificity of the produced monoclonal antibodies was repeatedly checked by ELISA and Western blot analysis. The selected hybridomas were cryopreserved in liquid nitrogen.

Peroxidase conjugate

Antibodies to porcine and murine IgG, isolated from hyperimmune rabbit sera by precipitation with ammonium sulfate and affinity chromatography, were conjugated with horse radish peroxidase (POD) using the periodate method (Boorsma and Streefkerk, 1979). The concentrations of immunoglobulins in conjugates to the porcine (POD-RASwIgG) and murine (POD-RAMoIgG) IgG were adjusted to 1 mg antibody per 1 ml. Stock solutions of the conjugates were diluted 5 000 to 10 000 times for ELISA and 100 to 300 times for immunoperoxidase test and Western blotting.

SDS-PAGE and Western blotting

Purified viral antigen was treated in a reducing solution (5 min at $100\ ^\circ\text{C}$) and separated, along with a low molecular weight standard (LMW Calibration Kit, Pharmacia, Sweden), by discontinuous electrophoresis (Laemmli, 1970) in polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) using the instrument Miniprotein II Cell (BioRad). Proteins present in the gel were transferred onto a nitrocellulose (NC) membrane (pore size 0.45 Hoefer, USA) at constant current (2 h at 250 mA, Semi-Dry Electroblotter, Model HEP-I, Owl Scientific Inc.). A part of the membrane was stained with colloid gold and another part was used in Western blot analysis of the monoclonal antibodies (Mini-Protein II, Multiscreen BioRad). For Western blotting, the membrane was incubated with

culture media of the hybridomas diluted 1 : 2, or with ascitic fluids or blood sera diluted 1 : 100–1 000 with Tris buffered saline, pH 7.4, supplemented with 0.05% Tween 20 and containing 0.1% bovine serum albumin. After the second incubation with the conjugate (POD-RASwIgG or POD-RAMoIgG) and washing with PBST, the reaction was induced by incubation of the NC membrane in the substrate solution (3,3' diaminobenzidine + hydrogen peroxide).

Indirect immunoperoxidase test for PEDV

Monolayers of Vero cells grown on cover slips were infected with the PEDV strain CV-777. After solitary syncytia developed (16 to 18 h after the infection), the cells were fixed with acetone at 20 °C for 15 min. Control monolayers of non-infected cells and cryostat sections of small intestines of experimentally infected piglets were fixed in the same way. The samples were then incubated in ascitic fluid containing monoclonal antibodies (MAb) to PEDV, which was diluted 200 times with PBS containing 1% bovine serum albumin. After 1 h incubation at 20 °C and fourfold washing in PBS (each for 5 min), the samples were incubated with POD-RAMoIgG. The samples were washed again and incubated in substrate solution (3-amino 9-ethylcarbazole + hydrogen peroxide). After reaching the optimal color, as checked by light microscopy, the samples were washed with distilled water and embedded into glycerol for photographic documentation.

ELISA of antibodies to PEDV

Viral and control antigens were diluted 1 : 1 000 with 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6 and 50µl volumes were pipetted alternatively into microtitre plate wells that were then incubated in a wet chamber at 4 °C overnight. This and all the subsequent incubation steps were followed by triple washing of the wells with PBS supplemented with 0.05% Tween 20 (PBST). On the next day, the contents of pairs of wells with bound viral and control antigen were replaced by 50µl volumes of the tested porcine or murine blood sera, or monoclonal antibodies (culture media of hybridomas

and ascitic fluids) diluted with PBST supplemented with 1% lactalbumin hydrolysate. Basic dilution of the culture media was 1 : 2 and that of blood sera and ascitic fluids 1 : 100. After 1 h incubation at 37 °C, the contents of the wells were replaced by 50µl volumes of POD-RASwIgG or POD-RAMoIgG and the plates were incubated for another 1 h at 37 °C. Then 100 µl substrate solution (3,3',5,5' tetramethyl benzidine + hydrogen peroxide in 0.1 M citrate buffer, pH 5.8) was added and the developing colour reaction was stopped after 5 to 15 min by the addition of 100 µl 1 M sulfuric acid per well. Absorbance was measured spectrophotometrically at 450 nm and samples showing a difference in optical density reading of at least 0.1 between the wells with viral and control antigen, were classified as positive.

RESULTS

Tests of specificity of MABs by ELISA

Five hybridoma lines producing MABs to PEDV were prepared. The MABs reacted specifically with viral antigen and none of them showed cross-reactivity with control antigen or viral or control antigens of other significant causative agents of porcine gastroenteritis, including Group A rotaviruses and TGEV. The MABs were of the IgG1 and IgG2a isotypes. The results of cross-reactivity checks of MAb PED E8/1E9 are summarized in Tab. I.

Western blot analysis

Western blot analysis revealed the reactivity of some MAB (hybridoma E8 and its clones) with the 70 kDa antigen of PEDV. Such reactions were not demonstrable in other hybridomas (G7/B10 and others), although they reacted specifically with PEDV in ELISA and IP test (Fig. 1).

IP test for PEDV in infected cells

Propagation of PEDV in infected monolayers of Vero cells was demonstrated in characteristic syncytia at the beginning of CPE. The virus was demonstrated

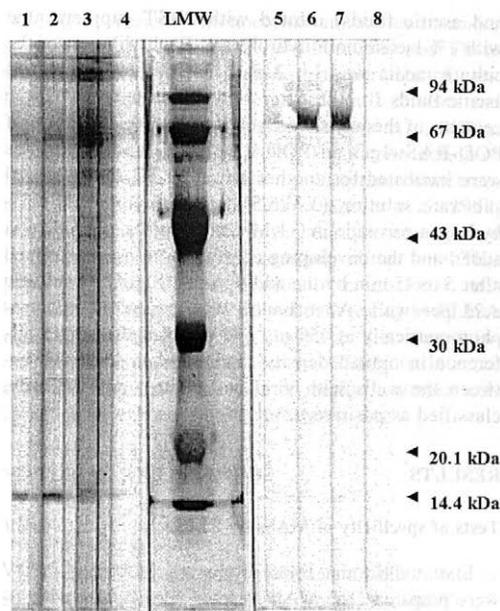
I. Check of reactivity and cross-reactivity of MABs with Group A rotavirus, TGEV and PEDV by ELISA

Monoclonal antibody ¹	Antigens					
	Rotavirus A		PEDV		TGEV	
	V - Ag	C - Ag	V - Ag	C - Ag	V - Ag	C - Ag
Rotavirus A, G6/D4, 43 kDa	1.514*	0.010	0.014	0.006	0.012	0.001
- PEDV, E8/1E9, 70 kDa	0.068	0.001	0.524	0.021	0.023	0.006
- TGEV, D7/G7, 28 kDa	0.028	0.011	0.041	0.054	1.262	0.007

Legend:

¹ virus and protein to which the monoclonal antibody is directed

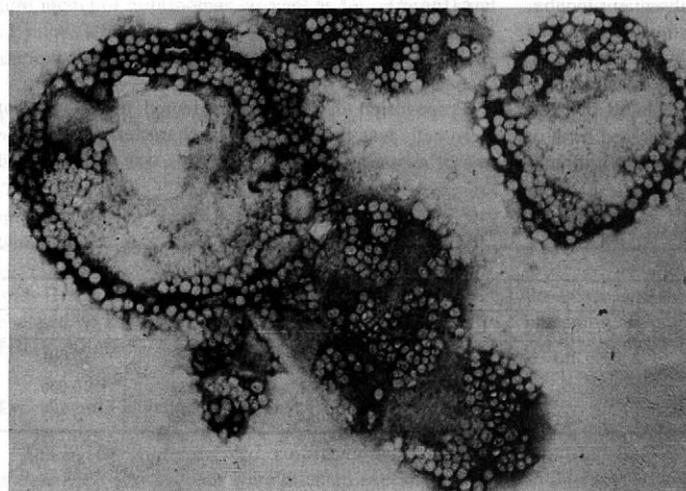
* absorbance at the 1 : 100 dilution of ascitic fluid



1. Western blot analysis of porcine blood sera and MABs with antigens of PEDV

Note:

PEDV and LMW standard separated in 12% polyacrylamid gel and transferred onto a NC membrane. A part of the membrane with LMW standard stained with colloid gold and the remaining part incubated with porcine antisera to PEDV (lane 1 – PS 2742, lane 2 – SwSAPEDV, Belgium, lane 3 – SwSAPEDV, Austria), or with MABs anti PEDV (lane 6 – E8/1E9, lane 7 – E8/B10, lane 8 – G7/B10). Lanes 4 and 5 have been reserved for samples incubated with the diluting solution alone. Second incubation with POD-RASwlgG or POD-RAMolG; colour reaction induced by incubation with 3,3'-diaminobenzidine + hydrogen peroxide



2. Indirect IP test for PEDV in Vero cell line with MAB 8/1E9 16 h after infection. Formation of typical syncytia with antigen in cytoplasm. Original magnification 30x; chromogen: 3-amino 9-ethylcarbazole

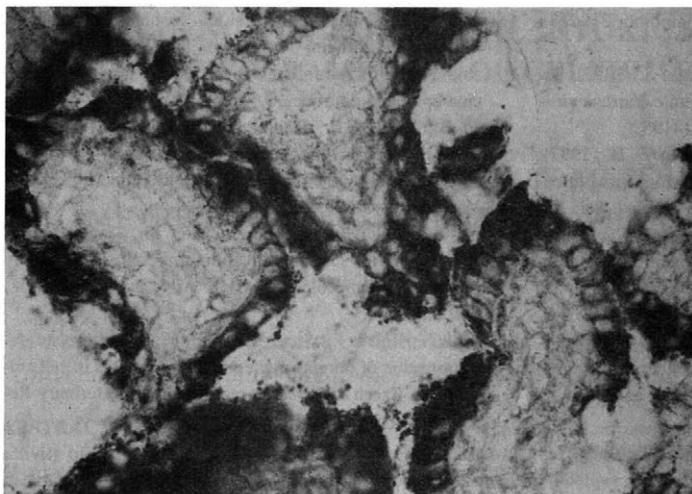
in cytoplasm, while nuclei, showing signs of karyolysis, were free of it (Fig. 2). In cryostatic sections of jejunal and ileal samples collected from infected piglets, the virus was demonstrated in the cytoplasm of enterocytes. No signs of infection were observed in cells of intestinal crypts or in other mucosal or submucosal cells (Fig. 3).

DISCUSSION

It is well known that the isolation and propagation of the causative agent of PED from field samples is very difficult. As a rule, the virus strain adapted to the trypsin-treated Vero cell line (CV-777) is used as a reference strain (Hofmann and Wyler, 1988; Valiček et al., 1993). Troublesome is also the preparation of strictly specific immune sera showing no cross-reactivity with other causative agents of porcine gastroenteritis (rotaviruses, TGEV or, as the case may be, porcine respiratory coronavirus). Prolonged immunization of piglets reared under germ-free or SPF conditions is necessary for this purpose. These are the major obstacles restricting the diagnosis of the causative agent of this significant infection in histological sections of small intestinal samples by immunofluorescence or immunoperoxidase tests (Bernasconi et al., 1995; Sueyoshi et al., 1995; Guscetti et al., 1998)

The preparation of MABs to the major structural proteins of PEDV has been described only recently. The MABs were used experimentally for the demonstration of antibodies in blood serum and milk of sows and of the viral antigen in fecal samples (Carvajal et al., 1995a, b; De Arriba et al., 1998, 1998).

The aim of our investigations was to prepare anti-PEDV MABs and use them to improve the diagnosis



3. PEDV-infected cells. Indirect IP test in a cryostat section of ileum of an experimentally infected SPF piglet necropsied 48 h after infection; MAb E8/1E9; PEDV in cytoplasm of enterocytes covering intestinal villi. Original magnification 60x; chromogen 3-amino 9-ethylcarbazole

of this diarrheic condition of piglets. Hybridomas that produce MAbs reacting specifically with viral antigen in ELISA have been prepared. These antibodies allow sensitive and specific demonstration of PEDV in infected Vero cells and in histological sections of small intestine by IP test. Western blot analysis demonstrated the reactivity of some MAbs with a protein of approx. 70 kDa protein, which is close in size to gp antigen HE (60–65 kDa). No such reactivity was demonstrable in the remaining MAbs although specific reactions with PEDV were confirmed by ELISA and virus demonstration in infected cells. We assume, therefore, that the latter MAbs reacted with epitopes that disappeared due to the treatment of the virus with the reducing solution. The objective of our ongoing studies is to prepare MAbs with a higher activity in ELISA as well as MAbs to further structural proteins and to use them for direct demonstration of PEDV in fecal samples collected from piglets affected by gastroenteritis. The implementation of methods for routine diagnosis will allow current assessment of the incidence of PED in swine herds as a basis for decisions on preventive and prophylactic measures.

Acknowledgement

We would like to thank Dr. M.B. Pensaert, Faculty of Veterinary Medicine, Gent, Belgium and Dr. K. Möstl, Veterinary University, Vienna, Austria, for the kind supply of swine anti-PEDV sera. We are indebted to Mrs A. Farníková, Mrs H. Křipačová and Mrs Z. Mikulášková for their excellent technical assistance.

REFERENCES

Bernasconi C., Guscetti F., Utiger A., Van Reeth K., Ackermann M., Pospischil A. (1995): Experimental infection of gnotobiotic piglets with a cell culture adapted porcine epi-

demic diarrhoea virus: clinical, histopathological and immunohistochemical findings. In: Proc. 3rd Congress ESVV, Interlaken, Switzerland, 542–546.

Boorsma D. M., Streefkerk J. G. (1979): Periodate or glutaraldehyde for preparing peroxidase conjugates? *J. Immunol. Methods*, 30, 245–255.

Carvajal A., Lanza I., Diego R., Rubio P., Carmenes P. (1995a): Seroprevalence of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infection in breeding swine farms of Castilla Y León (Spain). In: Proc. 3rd Congress ESVV, Interlaken, Switzerland, 455–459.

Carvajal A., Lanza I., Diego R., Rubio P., Carmenes P. (1995b): Evaluation of a blocking ELISA using monoclonal antibodies for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and its antibodies. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7, 60–64.

De Arriba M. L., Carvajal A., Lanza I., Rubio P., Carmenes P. (1995): Development of an ELISA for the detection of antibody isotypes against porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) in sow's milk. In: Proc. 3rd Congress ESVV, Interlaken, Switzerland, 222–225.

De Arriba M. L., Carvajal A., Pozo J., Lanza I., Rubio P. (1998): Development of an ELISPOT for the detection of antibody secreting cells against the porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) in different tissues. In: Proc. 15th IPVS Congress, Birmingham, England, 149.

Galfre G., Milstein C. (1981): Preparation of monoclonal antibodies. Strategies and procedures. *Methods Immunol.*, 73, 3–46.

Guscetti F., Bernasconi C., Tobler K., Van Reeth K., Pospischil A., Ackermann M. (1998): Immunohistochemical detection of porcine epidemic diarrhea virus compared to other methods. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 5, 412–414.

Hofmann M., Wyler R. (1988): Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *J. Clin. Microbiol.*, 26, 2235–2239.

Hofmann M., Wyler R. (1990): Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of porcine epidemic diarrhea

- virus antibodies in swine sera, *Vet. Microbiol.*, 21, 263–273.
- Ishikawa K., Sekiguchi H., Ogino T., Suzuki S. (1997): Direct and rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus by RT-PCR. *J. Virol. Methods*, 69, 191–195.
- Kweon C. H., Lee J. G., Han M. G., Kang Z. B. (1997): Rapid diagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection by polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Sci.*, 59, 231–232.
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Pijpers A., Van Nieuwstadt A. P., Terpstra C., Verheijden J. H. M. (1993): Porcine epidemic diarrhoea virus as a cause of persistent diarrhoea in a herd of breeding and finishing pigs. *Vet. Rec.*, 132, 129–131.
- Saif L. J. (1993): Coronavirus immunogens. *Vet. Microbiol.*, 37, 285–297.
- Sueyoshi M., Tsuda T., Yamazaki K., Yoshida K., Nakazawa M., Sato K., Minami T., Iwashita K., Watanabe M., Suzuki Y. (1995): An immunochemical investigation of porcine epidemic diarrhoea. *J. Comp. Pathol.*, 113, 59–67.
- Šmíd B., Valíček L., Rodák L., Kudrna J., Musilová J. (1993): Electron microscopic demonstration of porcine epidemic diarrhea virus in the Czech Republic (in Czech). *Vet. Med. – Czech*, 38, 333–341.
- Utiger A., Tobler K., Bridgen A., Suter M., Singh M., Ackermann M. (1995): Identification of proteins specified by porcine epidemic diarrhea virus. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 380, 287–290.
- Valíček L., Rodák L., Šmíd B. (1993): Propagation and demonstration of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures (in Czech). [Research report.] Brno, Veterinary Research Institute. 12.

Received: 99–01–22

Accepted after corrections: 99–03–17

Contact Address:

MVDr. Ladislav Rodák, 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: rodak@vri.cz

THE INFLUENCE OF INDUSTRIAL INTOXICATION WITH COPPER ON SELECTED PARAMETERS OF CELLULAR IMMUNITY IN SHEEP*

VPLYV PRIEMYSELNEJ INTOXIKÁCIE MEĎOU NA VYBRANÉ PARAMETRE BUNKOVEJ IMUNITY U OVIEC

A. Elgerwi¹, J. Pistl², J. Bíreš², K. Kliková²

¹Al-Fateh University, Faculty of Veterinary Medicine, Tripoli, Libya

²University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: In the present study we investigated the dynamics of selected parameters of cellular immunity (metabolic activity of phagocytes, bactericidal activity of phagocytes and polyclonal activation of lymphocytes) in improved Vallachian sheep during natural chronic intoxication with copper emitted by a copper producing industrial plant. Sheep were reared for five years close to the industrial plant producing non-ferrous metals. Each of ten experimental sheep (groups A, B) received 2.5 g per day of the material emitted by the plant mentioned through an individual stomach tube to imitate natural intoxication after their transport to the clinic. In addition to that, sheep of the group B received in the same way 400 mg of ammonium molybdate and 800 mg of sodium sulphate until the 24th day of experiment for a therapeutic purpose. Three clinically healthy sheep of the same age represented a control group. The blood from all animals was sampled from *v. jugularis* before the experiment and on days 10, 17, 24, 31, 38 and 45. During the entire experiment, the metabolic activity of phagocytes, reflected in the values of index of metabolic activity, showed a significant decrease ($p < 0.01$) in both experimental groups in comparison with the control and an increase in the number of surviving bacteria which exceeded the physiological limit in the test of bactericidal activity of phagocytes. Similar to that, the values of migration index during polyclonal activation of lymphocytes with phytohaemagglutinine pointed to the decreased response of lymphocytes to the mitogenic stimulus in both experimental groups in comparison with the control ($p < 0.01$; $p < 0.05$, resp.). The therapeutical administration of ammonium molybdate and sodium sulphate to sheep of the group B had no effect on the parameters of cellular immunity investigated when compared with the group A. The values of selected parameters of cellular immunity in sheep which exhibited chronic cuprotoxicosis allowed us to state that the emissions from the copper producing plant caused an immunosuppressive effect in the sheep investigated, manifested by decreased values of metabolic and bactericidal activity of phagocytes as well as by the decreased response of lymphocytes to mitogenic activation.

sheep; industrial intoxication; copper toxicity; cellular immunity

ABSTRAKT: V predloženej štúdií bol sledovaný vplyv chronickej intoxikácie meďou z emisií produkovaných priemyselným závodom na výrobu meďi na vybrané parametre bunkovej imunity (metabolická aktivita fagocytov, baktericídna aktivita fagocytov a polyklonálna aktivácia lymfocytov) u oviec plemena zošľachtená valaška. Ovce boli chované päť rokov v blízkosti závodu na výrobu farebných kovov. Po ich prevoze na kliniku bol všetkým desiatim pokusným ovciam (skupiny A, B) individuálne žalúdočnou sondou podávaný materiál emisií z uvedeného závodu v dávke 2,5 g na deň ako náhrada prírodných podmienok. Ovciam skupiny B bolo tou istou cestou za terapeutickým účelom podávané navyše ešte 400 mg molybdenanu amónneho a 800 mg síranu sodného po dobu 24 dní. Tri klinicky zdravé ovce toho istého veku a plemena tvorili kontrolnú skupinu. Krv od zvierat bola odoberaná z *v. jugularis* pred začiatkom pokusu (po ich dovoze na kliniku) a potom na 10., 17., 24., 31., 38., a 45. deň. Počas celej doby sledovania bol u oboch intoxikovaných skupín oviec zaznamenaný signifikantný pokles metabolickej aktivity fagocytov, vyjadrený hodnotami indexu metabolickej aktivity ($p < 0,01$) v porovnaní s kontrolnými zvieratami, a nárast počtov prežívajúcich baktérií nad fyziologické hodnoty v teste baktericídnej aktivity fagocytov. Podobne, hodnoty migračného indexu počas polyklonálnej aktivácie lymfocytov fytohemaglutinínom poukazyvali na zníženú odpoveď lymfocytov na mitogénnu aktiváciu u oboch intoxikovaných skupín oviec v porovnaní s kontrolnými zvieratami ($p < 0,05$ až $0,01$). Terapeutické podávanie molybdenanu amónneho a síranu sodného ovciam skupiny B nemalo vplyv na sledované parametre bunkovej imunity v porovnaní so skupinou A. Hodnoty vybraných parametrov bunkovej imunity u oviec s prejavmi chronickej intoxikácie meďou poukazujú na to, že emisie zo závodu na výrobu meďi spôsobili imunosupresívny efekt u týchto zvierat, čo sa prejavilo zníženými hodnotami metabolickej a baktericídnej aktivity fagocytov ako aj zníženou odpoveďou lymfocytov na mitogénnu aktiváciu.

ovce; priemyselná intoxikácia; toxicita meďou; bunková imunita

* Supported by the Scientific Grant Agency – VEGA (Grant No. 1/4177/96)

The effect of impaired environment is manifested on the health, production, reproduction ability and the quality of produced proteins. Ecotoxic effects of pollutants are manifested on animals in dependence on chemical sources, doses, chemical forms, time effects and predisposition of animal species. Copper toxicity in relation to the conditions described is most common in sheep.

Copper intoxication in sheep caused by emissions of an ore-processing plant under both spontaneous and experimental conditions was first described by Vrzgula et al. (1986) and Bireš et al. (1993).

Copper intoxication affects hepatocytes, erythrocytes, the tubular epithelium of the kidneys, reproductive organs, the nervous and immune system and causes genetic changes (Howell and Gooneratne, 1987).

The influence of heavy metals, present in industrial emissions, on the immune system of farm animals has been little studied. Only the effect of essential minerals (Co, Cu, Fe, Zn) on the humoral and cellular constituents of immune responses was investigated (Drebcikene and Medzjavicius, 1981; Jelinek et al., 1988; Fenwick et al., 1990). The intoxication of farm animals with heavy metals from industrial emissions impairs the immune system, thus increasing the intensity of infection and severity of disease.

The immunotoxicity induced by heavy metals or any exogenous factor may take two routes, the more obvious one being the toxic action on the components of the immune system. The etiologic agent could suppress the immune system so that normal homeostasis is disrupted and pathogens may invade and cause tissue damage (Lawrence, 1985). At present, different methods and approaches are used to prevent and treat industrial copper intoxication in sheep. The administration of ammonium molybdate and sodium sulphate was considered the most effective method of treatment of copper intoxicated sheep reared close to an industrial plant (Vrzgula et al., 1987).

The aim of this work was to assess the effects of industrial emissions on the immune system of sheep with naturally induced chronic intoxication resulting from closeness to an industrial plant while observing the dependence on ammonium molybdate and sodium sulphate intake in experimental conditions.

Experimental animals

The experiment was carried out on 10 improved non-pregnant Vallachian sheep, 5 years old, brought from a farm located near a copper-producing industrial plant, and on 3 healthy sheep, 5 years old, reared at the University facilities, which were used as a control. Already at the beginning of the experiment the experimental ewes showed symptoms of chronic copper intoxication (poor nutritional state, apathy, loss of wool, anemia of mucous membranes and conjunctivities with a hint of icterus alternated inappetence) in the same extent as that described by Bireš et al. (1993) in the area close to the industrial plant mentioned.

The animals were housed under the same conditions and each one was supplied daily with 1.5 kg of meadow hay, 0.30 kg of BAK concentrate (feed mixture for sheep) and water *ad libitum* throughout the experiment. The experimental sheep were randomly allocated to two groups ($n = 5$). Before the experiment, the average body weight of animals in group A was 28.6 ± 5.639 kg and that of animals in group B 29.2 ± 2.588 kg. The sheep of groups A and B received 2.5 g of industrial emissions daily through a stomach tube after the morning feeding to imitate natural intoxication. In addition to that, the sheep of group B also received 2.5 g of industrial emissions and, 400 mg of ammonium molybdate and 800 mg of sodium sulphate daily by means of a stomach tube after the morning feeding until the 24th day when the treatment was terminated.

Analysis of emissions, food and water

The industrial emissions were obtained from the copper factory by dedusting the electrostatic precipitators placed in the factory chimney. In such a way obtained material was analysed by atomic absorption spectrophotometric method (AAS306 and Zeeman AAS 4100Z1, Perkin Elmer). The quantities of Cu, Fe, Zn, Mo, Se, As, Cd, and Pb in one dose of the industrial emissions and food are illustrated in Tab. I.

Blood sampling

Blood was sampled from *v. jugularis* before the experiment and on days 10, 17, 24, 31, 38 and 45, when the experiment ended.

I. Intake of elements contained in emissions and feed in mg per head and day

Daily intake	Cu	Zn	Fe	Mo	Se	As	Cd	Pb
Emissions (2.5 g)	429.00	124.34	976.60	0.104	0.031	0.303	0.005	0.016
Meadow hay (1.5 kg)	16.92	59.55	358.39	1.125	0.385	0.280	0.079	0.285
Feed mixture BAK (0.30 kg)	2.11	10.58	22.86	0.372	0.063	0.028	0.017	0.033
Drinking water	0	1.20	0.25	0	0	0	0	0
Total	448.03	195.67	1358.1	1.601	0.479	0.611	0.101	0.334

Immunological tests

Tests for analysis of immunological parameters were chosen in order to evaluate the functional activity of phagocytic cells (metabolic and bactericidal activity of phagocytes) and lymphocytes (polyclonal activation of lymphocytes with mitogen).

Isolation of leucocytes

Leucocytes (Le) were isolated from peripheral blood by the method according to Karlson and Kaneko (1973) based on the osmotic shock of erythrocytes.

Iodo-nitro-tetrazolium reductase test (INT)

Quantitative evaluation of tetrazolium-reductase activity of phagocytes was carried out according to the method of Lokaj and Oburková (1975) to evaluate the metabolic activity (MA) of phagocytes during the stress. The suspension of leucocytes ($1.10^7/\text{ml}$) was divided into two parts and incubated at 37°C for 45 minutes. One portion was incubated with 1% starch suspension (*Amylum oryzae*) in PBS and the other without starch. All suspensions of cells contained INT (3/4-iodophenyl-2-/4-nitrophenyl/-5-phenyl/-tetrazolium chloride), Lachema Brno. After the incubation and lysis of cells by acetone, the content of formazane was determined by a spectrophotometer at 485 nm. The results were described in the form of index of metabolic activity (IMA) based on the ratio of mean optical density (OD 485) of leucocyte suspension with starch ($n = 3$) and leucocyte suspension without starch ($n = 3$).

Test of bactericidal activity of phagocytes (BCAP)

The devitalization capability of phagocytes obtained from sheep was evaluated by means of a modified test according to Barta et al. (1984). Broth culture of *Staphylococcus aureus* at the concentration of $5.10^7/\text{ml}$ bacteria was used for the purpose of phagocytosis. The tubes contained 0.5 ml leucocyte suspension ($5.10^6/\text{ml}$) in Basal Eagle medium (BEM), 0.4 ml of 20% serum for opsonization of bacteria in BEM and 0.1 ml bacterial suspension. Tubes were incubated at 37°C for 60 minutes. During the incubation, the test tubes were closed with parafilm (Serva) and gently mixed in 10 min intervals. Samples were withdrawn from the test tubes at the beginning (time 0) and after 60 min incubation, diluted with distilled water (lysis of leucocytes) at the ratio 1 : 500 and from this suspension 1 : 10 and 1 : 100 dilutions were prepared. 0.1 ml aliquots of both solutions were inoculated onto solid culture media (blood agar). Inoculated agar plates were incubated at 37°C for 24 hours. Colonies grown on the agar media were counted and the number of bacteria in 1 ml were expressed in logarithm units (\log^{10}).

Leucocyte migration-inhibition assay (LMIA)

LMIA was used for the purpose of analysing the reaction capacity of lymphocytes to mitogenic activation and was carried out according to Bendixen et al. (1976). The leucocytes were tested in the concentration of $2.10^8/\text{ml}$ in five parallel holes under agarose with $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ mitogen (phytohaemagglutinin, PHA, Sigma) and without mitogen. The plastic dishes contained 5 ml of 1% agarose (Serva) consisting of culture medium (RPMI 1640, ÚSOL Praha), 10% fetal calf serum (FCS), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of streptomycin and 100 IU/ml penicilline. The suspensions of leucocytes were incubated with and without mitogen at 37°C for 1 h and 5% CO_2 . After incubation the cell suspensions were transferred (10 μl) to the holes in the agarose medium and incubated at the same conditions for period 20 h. The migration index (MI) was determined as a ratio of the mean of migration areas of leucocytes with mitogen (M_{PHA}) and without mitogen (M_0): $\text{MI} = M_{\text{PHA}}/M_0$.

Statistical evaluation

Results were statistically evaluated by the variance analysis test (Poláček, 1996).

RESULTS

Evaluation of metabolic activity of phagocytes showed significant differences in IMA ($P > 0.01$) between chronically intoxicated sheep (group A, B) and the control group of animals during the experiment. No significant difference was found between the sheep of groups A and B (untreated and treated, resp.) as illustrated in Fig. 1.

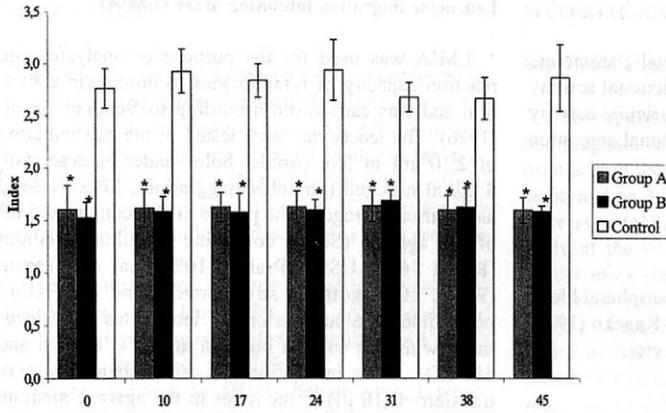
By examining the bactericidal activity of phagocytes an increased number of surviving bacteria exceeding the physiological limit was found in intoxicated sheep in comparison with the control (Fig. 2). At the end of the experiment, the numbers of devitalized bacteria in the group of treated animals increased, however, this could be affected by the death of two of the five sheep observed.

The mitogen activity of lymphocytes was in the physiological range during the experiment ($\text{MI} < 0.9$) in all 3 groups of sheep. However, the reaction capacity of lymphocytes (polyclonal activity) to PHA was significantly higher in the control group of animals in comparison with those subjected to intoxication ($p < 0.01$, $p < 0.05$, resp.) as shown in Fig. 3. No differences were observed between the groups of intoxicated sheep.

DISCUSSION

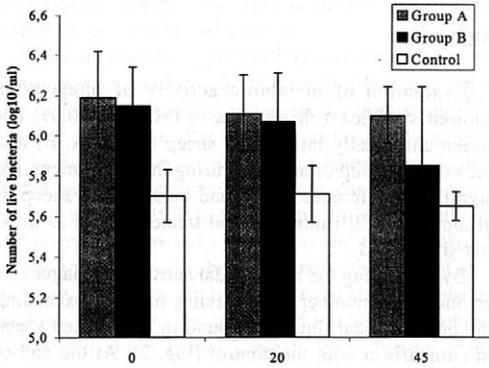
The immune system is one of the most sensitive indices of environmental quality in view of investiga-

1. Index of metabolic activity of phagocytes (IMA) in sheep after chronic exposure to heavy metals



Animals	Day						
	0	10	17	24	31	38	45
Group A	1.60 ± 0.23	1.61 ± 0.18	1.62 ± 0.14	1.62 ± 0.15	1.63 ± 0.15	1.59 ± 0.14	1.59 ± 0.12
Group B	1.52 ± 0.15	1.58 ± 0.14	1.57 ± 0.18	1.59 ± 0.10	1.68 ± 0.10	1.62 ± 0.18	1.58 ± 0.05
Control	2.76 ± 0.19	2.92 ± 0.21	2.83 ± 0.16	2.93 ± 0.29	2.67 ± 0.14	2.66 ± 0.20	2.86 ± 0.32

* $p > 0.01$ – significant differences between experimental groups and control sheep



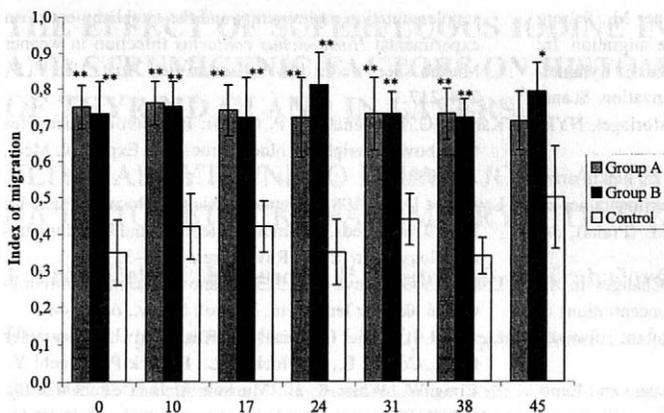
Animals	Day		
	0	20	45
Group A	6.19 ± 0.23	6.11 ± 0.19	6.10 ± 0.14
Group B	6.15 ± 0.19	6.07 ± 0.24	5.85 ± 0.39
Control	5.70 ± 0.13	5.71 ± 0.14	5.65 ± 0.07

2. Bactericidal activity of phagocytes (BCAP) in sheep after chronic exposure to heavy metals

tion of animal responses to external conditions. Within the scope of regulation systems in an organism, immune mechanisms are directly related to the total organism homeostasis and each of the endogenous and exogenous influences affects their activity (Ohsawa, 1993; Borošková et al., 1995; Pistl et al., 1995). In order to evaluate the immunotoxicological effect of risk

xenobiotics one must start from the knowledge of the chemical nature of the pollutant, mechanism of its effect, dose and length of its action and the health state of an animal (Lawrence, 1985; Bireš et al., 1990; Mikula et al., 1992). The selection of immunological methods and their application in the experiment was based on the proportion of toxic elements present in the emitted material tested, their mutual ratio and possible effect on an organism. In this way the tests reflected the functional state of both phagocytes and lymphocytes in the intoxicated animals in comparison with the control sheep. The observation of activation capacity of phagocytes (INT test), their bactericidal activity (BCAP) and mitogenic activation of lymphocytes (LMIA), used as parameters of cellular immunity during the experiments in sheep with naturally induced chronic intoxication resulting from closeness to a copper-producing plant indicated functional changes in immune cells developed as a consequence of the long-term intoxication with emissions. The immunological tests used characterise the functional properties of cells with good biological reproducibility and conclusiveness and because of that they are used in immunological studies (Luster et al., 1993; Vandebriel et al., 1995; Diert et al., 1996). With respect to the lowest concentration of Cd and Pb in the emissions, in comparison with other elements, one can assume that their effect in the experimental sheep was only secondary.

The development of cuprotoxicosis in experimental sheep can be affected positively by the interrelationships with additional elements present in the emissions, most of all by Zn, Fe, Mo, Se and As (Chowdhury et



3. Migration index of leucocytes (MI) after polyclonal activation with phytohaemagglutinin in sheep after chronic exposure to heavy metals

Animals	Day						
	0	10	17	24	31	38	45
Group A	0.75 ± 0.06	0.76 ± 0.06	0.74 ± 0.07	0.72 ± 0.11	0.73 ± 0.10	0.73 ± 0.07	1.71 ± 0.08
Group B	0.73 ± 0.09	0.75 ± 0.07	0.72 ± 0.11	0.81 ± 0.09	0.73 ± 0.06	0.72 ± 0.05	0.79 ± 0.08
Control	0.35 ± 0.09	0.42 ± 0.09	0.42 ± 0.07	0.35 ± 0.09	0.44 ± 0.07	0.34 ± 0.05	0.50 ± 0.14

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ – significant differences between experimental groups and control sheep

al., 1987; Bireš, 1989). Similar influence on the course of intoxication and also on cells of the immune system was assumed in sheep of the experimental group B, based on metabolic interactions of Cu with Mo and S, after the administration of ammonium molybdate and sodium sulphate (Golfman and Boila, 1990; Vrzgula et al., 1987). The values of metabolic and bactericidal activity of phagocytes and polyclonal activation of lymphocytes during chronic copper intoxication indicated that the effect of feeding ammonium molybdate and sodium sulphate to sheep up to 24th day of the experiment was minimal in the treated animals because none of the parameters investigated, determined in the groups A and B, differed significantly. During the experiment, at the beginning and at the end, sheep in both experimental groups showed no significant differences in the values of cellular immunity parameters investigated. The low therapeutic effect of ammonium molybdate and sodium sulphate administered to sheep of the group B could be explained by progressive changes induced in the sheep tested by intoxication with copper and other risk elements already during their rearing in the affected area. Bireš et al. (1990) and Nađ et al. (1995) described some intactness and adaptability of the immune system in sheep under experimental conditions after adding into the feed the material emitted by the plant mentioned.

The immunosuppressive effect of Cu and other risk elements present in the industrial substrate during cuprotoxicosis was manifested by significant differences in the values of immune parameters between both experimental groups and the control. During the experi-

ment, the control sheep of the same age which had not been exposed during their life time to the influence of the emitted material showed no marked changes in the immune parameters examined in contrast with the intoxicated sheep. The intoxication caused by the emitted material was manifested also clinically by decreased growth ability, by total cachexia, loss of hair and by other biochemical and patho-anatomical findings. The changes mentioned, induced by industrial copper intoxication, point to hepatotoxicity, nephrotoxicity and neuro-endocrine toxicity resulting in the synthesis of changed hepatoproteins and other toxic metabolites and their assumed effect on the immune system (Dietert et al., 1996). The changes in the values of IMA, BCAP and MI, determined in sheep copper-intoxicated by the material from an industrial source, agree with the observations of Bireš et al. (1990), who observed some weakening of the protective mechanisms and increased susceptibility to diseases in sheep reared in the area of industrial plant depositions, which points to the immunosuppressive effect of Cu in interaction with additional substances present in the emitted material. No protective effect of ammonium molybdate and sodium sulphate in chronic cuprotoxicosis of sheep was recorded.

REFERENCES

- Barta O. (1984): Laboratory techniques of veterinary clinical immunology. Springfield, Illinois, USA, C. C. Thomas Publish. 53–58.

- Bendixen G., Bentzen K., Clausen J. E., Kjaer M., Saborg M. (1976): Inhibition of human leucocyte migration. In: Natvig J. B., Perlmann P., Wigzell H. (eds.): Lymphocytes. Isolation, fractionation and characterization. Scand. J. Immunol. (Suppl. 5). Oslo, Universitetsforlaget, NYE-GAARD. 244–267.
- Bíreš J. (1989): Interakčné vzťahy medzi železa, zinku, arzenu, kadmia a olova v pečeni oviec po experimentálnej intoxikácii oxidom meďnatým. *Veter. Med. (Praha)*, 34, 665–674.
- Bíreš J., Vrzgula L., Hojzerová A. (1990): Changes in the phagocytic activity of blood leucocytes concentrations of plasma Ig and albumin in sheep fed pollutant substrate. *Živoč. Výr.*, 35, 763–771.
- Bíreš J., Vrzgula L., Konrád V. (1993): Spontane und Experimentelle Kupfer-Intoxikation bei Schafen: Klinik und Pathologie. *Tierärztl. Umsch.*, 48, 661–669.
- Borošková Z., Šoltýs J., Krupicer I., Šiška F. (1995): Effect of glucan immunomodulator on the immune response and mean helminth infection intensity in lambs on pastures contaminated with heavy metal emissions. *Helminthologia*, 32, 187–192.
- Chowdhury B. A., Chandra R. K. (1987): Biological and health implications of toxic heavy metal and essential trace element interactions. *Progr. Food Nutr. Sci.*, 11, 33–113.
- Dietert R. R., Goleboski K. A., Kwak H., Miller T. L., Davison T. F. (1996): Environment–immunity interactions. In: Davison T. F., Morris T. R., Payne L. N. (eds.): *Poultry Immunology*. Abingdon, UK, Carfax Publish. Co. pp. 343–356.
- Drebickene G., Medzjavičius S. A. (1981): Effects of microelements of iron and copper on the phagocytic indices of neutrophilic leucocytes in trichocephalid-infected pigs. *Acta Parasitol. Lithuan.*, 19, 46–55.
- Fenwick P. K., Agger P. J., MacDonald D., Huber C., Wakelin D. (1990): Zinc deficiency and zinc repletion: Effect of the response of rats to infection with *Trichinella spiralis*. *Am. J. Clin. Nutr.*, 52, 166–172.
- Golfman L. S., Boila R. J. (1990): Effects of molybdenum and sulfur on minerals on the digestive tract of steers. *Can. J. Anim. Sci.*, 70, 905–920.
- Howell J. McC., Gooneratne S. R. (1987): The pathology of copper toxicity in animals. In: Howell J. McC., Gawthorne J. M. (eds.): *Copper in Animals and Man*. Vol. II. Boca Raton, Florida, CRC Press. pp. 53–78.
- Jelinek P. D., Ellis T., Wroth R. H., Sutherlands S. S., Masters H. G., Petterson D. S. (1988): The effect of selenium supplementation on immunity and the establishment of an experimental *Haemonchus contortus* infection in weaner Merino sheep fed a low selenium diet. *Aust. Vet. J.*, 7, 214–217.
- Karlson G. P., Kaneko J. P. (1973): Isolation of leucocytes from bovine peripheral blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 142, 853–856.
- Lawrence D. A. (1985): Immunotoxicity of heavy metals. In: Dean J. et al. (eds.): *Immunotoxicology and Immunopharmacology*. New York, Raven Press. 341–353.
- Lokaj V., Oburková P. (1975): Stanovení tetrazolim-reduktačové aktivity leukocytů. *Imunol. Zprav.*, 6, 42–44.
- Luster M. I., Portier C., Pait D. G., Rosenthal G. J., Germolec D. R., Corsini E., Blaylock B. L., Pollock P., Kouchi Y., Craig W., White K. L., Munson A. E., Comment C. E. (1993): Risk assessment in immunotoxicology. II. Relationships between immune and host resistance tests. *Fund. Appl. Toxicol.*, 27, 71–82.
- Mikula I., Pistl J., Kačmár P. (1992): The immune response of sheep to subclinical chronic exposure to the herbicide Bentazon TP. *Vet. Hum. Toxicol.*, 34, 507–509.
- Nad P., Bírešová M., Legáth J. (1995): The effects of feeding emissions from a metal-producing plant upon the immune system of sheep. *Vet. Med. – Czech*, 40, 101–104.
- Ohsawa M. (1993): Nutritional and toxicological implication of trace elements in the immune response. Essential and toxic trace elements in human health and disease: An update. In: Prasad A. S. Prasad (ed.): *Progress in Clinical and Biological research*. 380, 283–298.
- Pistl J., Mikula I., Krupicer I., Šnirc J. (1995): The influence of heavy metal emissions and *Fasciola hepatica* infestation on the immunogenicity of a *Listeria vaccine*. *Vet. Hum. Toxicol.*, 37, 110–112.
- Poláček M. (1996): *Biomatematika pre veterinárnych lekárov*. Košice, Univerzita veterinárskeho lekárstva. 256 s.
- Vandebriel R. J., Garsen J., Van Loveren H. (1995): Methods in Immunotoxicology. *Method Neurosci.*, 24, 151–169.
- Vrzgula L., Bíreš J., Konrád V. (1986): Prvý výskyt intoxikácie meďou pri ovciach – klinika, patológia. *Živoč. Výr.*, 31, 463–468.
- Vrzgula L., Bíreš J., Jenčík F. (1987): Sírnan sodný a molybdenan amónny v liečbe intoxikácie meďou. *Živoč. Výr.*, 32, 415–421.

Received: 98–06–18

Accepted after corrections: 99–04–08

Contact Address:

Prof. MVDr. Jozef Bíreš, DrSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika
Tel. +421 95 633 21 11–15, fax +421 95 632 36 66, e-mail: bires@vsvnov.uvm.sk

THE EFFECT OF SUPERFLUOUS IODINE INTAKE AND STRUMIGENIC FACTORS ON HISTOMETRIC PARAMETERS OF THYROID GLAND IN LAYERS*

VLIV NADBYTEČNÉHO PŘÍJMU JODU A STRUMIGENNÍCH FAKTORŮ NA HISTOMETRICKÉ PARAMETRY ŠTÍTNÉ ŽLÁZY NOSNIC

J. Trávníček, V. Kroupová, P. Kratochvíl, I. Krabačová

University of South Bohemia, Faculty of Agriculture, České Budějovice, Czech Republic

ABSTRACT: The effect of a 74-day increased iodine intake in form of KI on weight and histometric parameters of thyroid gland was studied in four groups of layers ($n = 11$) of the laying hybrid Brown Hixex at the beginning of the first laying cycle. Control group (A) received ad libitum complete feed mix N_1 containing 0.3 mg I/kg. Experimental groups received feed mix N_1 enriched with iodine as follows: 3.5 mg I/kg feed in group B, 1.3–10 mg in group C and 7–15 mg in group D. Differentiated iodine supplements had statistically significant effects ($P < 0.01$) on the height of follicular cells-thyreoocytes that decreased with the increasing iodine load of layers (A: thyreoocyte height 4.11 μm , B: 3.96, D: 2.67); the effects on follicle increase were insignificant. The thyroid weight was not influenced by higher iodine intake (Tab. II). The state similar to colloid struma was described in some cases in experimental groups: follicles fully filled with easily stainable colloid and bordered with flat thyreoocytes. This parenchyma structure shows a tendency to hypothyreosis and colloid struma. The superfluous intake of iodine is accompanied by an increased T_3 plasma concentration (4.48 ± 1.27 nmol/l at the intake of 10 mg I/kg feed; control group 2.69 \pm 1.45 nmol/l only) and by more frequent lymphocytic infiltrations of the thyroid corresponding to findings at spontaneous autoimmune thyreoiditis. The effect of differentiated additive intake of iodine on the iodine supply to the layer organism is documented by its average content in egg yolk in $\mu\text{g/kg}$ of yolk fresh matter (group A: 2 303, B: 4 762, C: 10 614, D: 29 592). The effect of 30-day intake of strumigenic factors (nitrates and rapeseed meal with glucosinolate content of 18.254 mmol/kg) was studied in three groups of layers with five birds in each. The strumigenic effect of 80 mg nitrates/kg feed water was not compensated by supplementation of 0.5 mg I/kg feed and was statistically significantly ($P < 0.01$) reflected in an increase of thyreoocyte counts by 9.6–25.8% (Tab. IV). The supplement of 126 g rapeseed meal (2.3 mmol of glucosinolates) per 1 kg feed N_1 did not significantly influence the thyroid weight and parenchyma (Tab. VI). The histometric characteristic of the thyroid corresponded to a euthyroid state. No strumigenic effects of the glucosinolate content in the supplement of rapeseed meal were observed in layers after 30-day feeding when the parallel iodine intake was 0.3–0.8 mg I per kg of feed N_1 . No clinical signs of disease were recorded during experiments. The level of iodine supply to the layer organism was evaluated on the basis of its content in egg yolk. Iodine content in yolk was determined after alkaline digestion by a modified method of Sandell and Kolthoff (Bednář, 1964). Histological sections of the thyroid were stained with hematoxylin-eosine, histometric parameters were determined in an image analyzer Lucia.

iodine surplus; thyroid; nitrates; rapeseed meal; egg yolk

ABSTRAKT: U čtyř skupin nosnic – jedné kontrolní (A) a tří pokusných (B, C, D) ($n = 11$) byl sledován vliv 74denního příjmu zvýšených dávek jodu (KI) na hmotnost a histometrické parametry štítné žlázy. Přídavek jodu ke kompletní krmné směsi N_1 byl v množství: 3,5; 1,3 až 10 a 7 až 15 mg I/kg směsi. Odstupňovaný přídavek jodu se statisticky významně ($P < 0,01$) projevil na snížení folikulárních buněk – tyreoocytů (skupina A: 4,11, B: 3,69, C: 2,98, D: 2,67 μm) a nevýznamně na zvětšení folikulů. Hmotnost štítné žlázy zvýšený příjem jodu neovlivnil (tab. II). V několika případech byl u pokusných skupin popsán histologický stav podobný koloidní strumě – folikuly zcela vyplněné koloidem s výraznou barvitostí a ohraničené plochými tyreoocyty. Uvedená stavba parenchymu naznačuje tendenci k hypotyreóze a koloidní strumě. Aditivní příjem jodu byl doprovázen zvýšenou hladinou T_3 v plazmě ($4,48 \pm 1,27$ nmol/l při příjmu 10 mg I/kg směsi, kontrolní skupina pouze 2,69 \pm 1,45 nmol/l) a častějšími lymfocytárními infiltracemi štítné žlázy. Účinek 30denního příjmu strumigenů (dusičnanů a extrahovaného řepkového šrotu) byl sledován vždy u tří pětičlenných skupin. Strumigenní účinek 80 mg dusičnanů na kg napájecí vody, který nebyl kompenzován ani přídavkem 0,5 mg I/kg směsi, se projevil zvýšením tyreoocytů o 9,6 až 25,8 % (tab. IV). Přídavek 126 g extrahovaného řepkového šrotu na 1 kg směsi N_1 (2,3 mmol glukosinolátů) neovlivnil významně hmotnost ani parenchym štítné žlázy (tab. VI). V průběhu experimentů nebyly zaznamenány klinické projevy onemocnění. Stav zásobení organismu nosnic jodem byl posuzován podle jeho obsahu ve vaječném žloutku.

nadbytek jodu; štítná žláza; dusičnany; extrahovaný řepkový šrot; vaječný žloutek

* Supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Grant No. 524/96/0853).

Závislost činnosti štítné žlázy na nutričních faktorech vytváří předpoklady, že jejich působení v určitém prostředí zasáhne populaci zvířat i lidí. V současné době se odhaduje, že riziku onemocnění štítné žlázy vyvolané nedostatečným příjmem jodu je vystaveno více než 1,5 mld lidí, z toho nejméně 650 mil. dětí.

Profylaxe jodového deficitu je celosvětově zaměřena zejména na aditivní příjem jodu, nejčastěji formou jodidované soli nebo suplementací potravin jodem v průběhu jejich výroby. Obohacení krmných dávek hospodářských zvířat jodem umožňuje zvýšení jeho obsahu přirozenou cestou i v potravinách živočišného původu, například v mléku (Kroupová aj., 1986), masu (Rambeck

Vliv nadbytečného příjmu jodu u nosnic

Vliv nadbytečného příjmu jodu byl sledován na čtyřech skupinách nosnic (jedna kontrolní a tři pokusné; $n = 11$) nosného typu hisex hnědý na začátku prvního snáškového cyklu. Nosnice byly ustájeny na hluboké podestýlce, průměrná denní i noční teplota byla 20 °C a osvětlení 24 hodiny. Všem skupinám byla *ad libitum* podávána kompletní krmná směs N_1 s obsahem jodu 0,3 mg/kg. Pokusným skupinám byla směs obohacena o premix jodidu draselného. V tab. I je uveden rozpis přídatku jodidu a průměrný příjem jodu ve skupině na jednu nosnici.

I. Přídatvek jodu v mg/kg směsi N_1 a denní příjem jodu v mg na nosnici – Iodine supplement (mg/kg of feed N_1) and daily iodine intake (mg) per layer

Skupina ¹	Aditivní přídatvek jodu na mg/kg směsi N_1 ²		Denní příjem jodu v mg na nosnici ³	
	1 až 34 dny pokusu ⁴	35 až 74 dny pokusu ⁵	1 až 34 dny pokusu	35 až 74 dny pokusu
A	0	0	0,031	0,035
B	3,5	3,5	0,480	0,553
C	1,3	10	0,195	1,468
D	7	15	0,970	2,138

Vysvětlivky pro tab. I – VII – Explanatory notes for Tabs. I-VII:

A = kontrolní – control

B, C, D = pokusná – experimental

¹group, ²additive supplement of iodine in mg/kg of feed N_1 , ³daily iodine intake in mg per layer, ⁴days 1–34 of the experiment, ⁵days 35–74 of the experiment

aj., 1997; Herzig a Kurša, 1997) nebo vejcích (Garber aj., 1992; Kroupová aj., 1998a). Při zvýšeném příjmu jodu nelze opomenout ani rizika jeho neúměrně vysokých dávek. U nosnic dochází při koncentraci 40 mg I/ kg směsi k retardaci ovulace a zánětům vejcovodu (Richter, 1995). Christensen a Ort (1990) zaznamenali toxický účinek u krůt již při dávce 35 mg I/kg. Vysoký příjem jodu má i strumigenní efekt vyvolaný vysokou koncentrací organicky vázaného jodu ve folikulech, který převyšuje uvolňování tyreohormonů do krve (Cao, 1990).

Na omezení vlivu přirozených a antropogenních strumigenů. Mezi nejzávažnější patří rozkladné produkty glukosinolátů, například řepkového progoitrinu, které vyvolávají fyziologické i histomorfologické změny štítné žlázy (Busato, 1991) nebo dlouhodobé zátěže nitráty (Schöne, 1987). Strumigenní efekt glukosinolátů a dusičnanů lze do jisté míry kompenzovat zvýšenými dávkami jodu (Kroupová aj., 1998b).

Předložená práce je zaměřena na posouzení histometrických parametrů štítné žlázy a její hmotnosti u nosnic s nadbytečným příjmem jodu při produkci jodem obohacených vajec a v souvislosti s příjmem dusičnanů a strumigenních faktorů řepkového šrotu.

Stav jodu v organismu nosnic byl posuzován na základě jeho obsahu ve vaječných žloutcích. Jod byl stanoven po alkalické digesti modifikovanou metodou Sandella a Kolthoffa (Bednář aj., 1964).

Na závěr pokusu byla provedena patologickoanatomická pitva pěti nosnic z každé skupiny včetně stanovení hmotnosti štítné žlázy. Vzorky štítné žlázy pro histologické vyšetření byly fixovány v 8% formaldehydu, zpracovány běžnou parafinovou metodou a obarveny hematoxilín-eozinem. Histometrické parametry (velikost folikulů, výška folikulárních buněk – tyreocytů) byly stanoveny na obrazovém analyzátoru Lucia. Výsledky byly statisticky zpracovány *t*-testem v programu Statplus.

Vliv strumigenních faktorů u nosnic

Účinek strumigenů (dusičnanů a extrahovaného řepkového šrotu s obsahem 18,254 mmol glukosinolátů na kg) byl sledován ve stejných chovatelských podmínkách rovněž u nosného hybridu hisex hnědý. Nosnice byly zatíženy strumigeny po dobu 30. dnů.

Do pokusu s dusičnany byly zařazeny tři skupiny nosnic (jedna kontrolní a dvě pokusné; $n = 5$), které přijímaly jako základní dietu směs N_1 . Nosnicím pokusných skupin (B, C) byly podávány dusičnany v napájecí vodě v množství 80 mg/kg vody v podobě KNO_3 .

Pokusné skupině B byla směs N₁ pro kompenzaci strumigenního účinku dusičnanů obohacena o 0,5 mg jodu/kg.

V pokusu s extrahovaným řepkovým šrotem (jedna kontrolní a dvě pokusné skupiny; n = 5) byla dieta nosnic kontrolní skupiny (A) složena ze směsi N₁, u pokusných skupin (B, C) byla krmná směs N₁ doplněna o 126 g extrahovaného řepkového šrotu na kg směsi, který obsahoval 2,5 mmol glukosinolátů. Jedné pokusné skupině (C) byl opět zvýšen příjem jodu o 0,5 mg/kg krmiva.

VÝSLEDKY

Vliv nadbytečného příjmu jodu u nosnic

Zvýšený příjem jodu krmnou směsí N₁ po dobu 74 dnů od počátku snášky se neprojevil statisticky významně na změnách hmotnosti štítné žlázy. U pokusné skupiny B a D došlo k jejímu zvýšení o 2,2 až 3,7 %, u pokusné skupiny C naopak k poklesu o 3,4 %. Obdobně nevýznamné změny byly i v relativní hmotnosti štítné žlázy (procentní podíl její hmotnosti z celkové hmotnosti nosnic) – tab. II.

Z histometrických parametrů byly mezi kontrolní skupinou a skupinami nosnic s aditivním příjmem jodu nejvýznamnější rozdíly ve výšce tyreocytů, která se snižo-

vala se zvyšující se zátěží nosnic jodem (tab. II). Výška tyreocytů štítných žláz nosnic s doplňkovým příjmem 10 mg I/kg krmné směsi byla o 27,5 % nižší a při příjmu 15 mg I/kg směsi o 35 % nižší než u nosnic kontrolní skupiny (A). Uvedené rozdíly jsou statisticky vysoce významné (P < 0,01). Korelační koeficient r = 0,1363 (n = 20) mezi hmotností štítné žlázy a výškou tyreocytů je však velmi nízký a statisticky nevýznamný.

Štítné žlázy slepic všech skupin měly typické folikulární uspořádání parenchymu. Koloid měl dobrou barvitelnost, zvláště u žláz slepic s největším přídavkem jodu. Velikost folikulů (délka a šířka) se s růstem přídavku jodu zvětšovala. Průměrná délka folikulů například u pokusné skupiny D byla o 13,8 % větší a šířka o 12,7 % větší než u skupiny kontrolní.

Mimo sledované histometrické parametry byly u slepic pokusných skupin častěji pozorovány lymfocytární infiltrace, které se vyskytovaly zejména v blízkosti dilatovaných cév.

V průběhu pokusu nebyly u nosnic, ani při maximální jodové zátěži pozorovány klinické projevy onemocnění, nedošlo ke zhoršení kondice a ani k úhynům. Při běžném anatomicko-patologickém vyšetření jsme nezaznamenali změny ve stavbě orgánů. Ve skupině s přídavkem 10 mg jodu na kg směsi (pokusná skupina C) byla v jednom případě zjištěna cysta na vaječniku a v jednom případě cysta na mesovariu.

II. Hmotnost a histometrické parametry štítné žlázy nosnic při zátěži jodem – Weight and histometric parameters of the thyroid in layers with iodine load

Skupina ¹	Aditivní příjem jodu v mg/kg N ₁ ²	Parametr ³	Jednotka ⁴	\bar{x}	s_x
A n = 5	0	délka folikulů ⁵	μm	82,8	7
		šířka folikulů ⁶	μm	60,1	1
		výška tyreocytů ⁷	μm	4,11	0,58
		hmotnost štítné žlázy ⁸	g	0,178	0,03
		relativní hmotnost štítné žlázy ⁹	%	1,01.10 ⁻²	
B n = 5	3,5	délka folikulů	μm	89,3	17,1
		šířka folikulů	μm	65,9	14,2
		výška tyreocytů	μm	3,69	0,4
		hmotnost štítné žlázy	g	0,184	0,03
		relativní hmotnost štítné žlázy	%	0,968.10 ⁻²	
C n = 5	1,3–10,0	délka folikulů	μm	92,8	14,6
		šířka folikulů	μm	67,1	12,4
		výška tyreocytů	μm	2,98	0,3
		hmotnost štítné žlázy	g	0,172	0,04
		relativní hmotnost štítné žlázy	%	1,02.10 ⁻²	
D n = 5	7,0–15,0	délka folikulu	μm	96	16,1
		šířka folikulu	μm	68,7	10,6
		výška tyreocytů	μm	2,67	0,19
		hmotnost štítné žlázy	g	0,182	0,04
		relativní hmotnost štítné žlázy	%	0,989.10 ⁻²	

Výška tyreocytů – Thyrocyte height: A : C, A : D (P < 0,01); B : D (P < 0,05)

¹group, ²additive intake of iodine in mg/kg N₁, ³parameter, ⁴unit, ⁵follicle length, ⁶follicle width, ⁷thyrocyte height, ⁸thyroid weight, ⁹relative thyroid weight

Vliv strumigenních faktorů u nosnic

Zatížení nosnic dusičnanů v množství 80 mg/kg napájecí vody po dobu 30 dní nevyvolalo klinicky zřetelné zdravotní odchylky a patologicaoanatomické změny. Průměrná hmotnost štítné žlázy u skupin s příjmem dusičnanů byla statisticky nevýznamně nižší (tab. III). Tyreocyty byly naopak u pokusných skupin vyšší o 9,6 až 25,8 %, u skupiny C bylo zvýšení statisticky významné ($P < 0,01$). U nosnic pokusných skupin byly také větší rozměry folikulů štítných žláz.

Desetiprocentní podíl řepkového šrotu v krmné směsi pokusných skupin neovlivnil po 30denním zkrmování výrazně hmotnost štítné žlázy nosnic. V porovnání s kontrolní skupinou byla u nosnic pokusných skupin nevýznamně nižší průměrná výška tyreocytů a větší velikost folikulů štítné žlázy. Přídavek 0,5 mg I/kg směsi neovlivnil významně hmotnost a ani histometrické parametry štítné žlázy (tab. IV).

DISKUSE

Vliv odstupňovaných dávek jodu se neprojevil statisticky významně ve změně hmotnosti štítné žlázy. Nedošlo proti očekávání k jejímu zvětšení, které například Groppe aj. (1991) vyvolali u výkrmových kuřat při doplňkovém příjmu 10 mg I/kg krmiva. Porovnáním s údaji autorů Mehner a Hartfield (1983) byla námi zjištěná průměrná i relativní hmotnost štítných žláz nosnic kontrolní i pokusných skupin vyšší než udávají u zdravých, ale těžších slepic zmínění autoři.

Objektivněji než hmotnost dokresluje funkční exponovanost štítné žlázy výška epitelových buněk – tyre-

ocytů a velikost folikulů. S růstem aktivity štítné žlázy se podle autorů Döcke (1994) a Klika (1986) výška tyreocytů zvyšuje a rozměry folikulů (Döcke, 1994) se spíše nepatrně zmenšují, při přebytku jodu může dojít i k jejich zvětšování. Statisticky významné snížení výšky tyreocytů, ke kterému došlo po dlouhodobé zátěži nosnic jodem (10 až 15 mg jodu/kg směsi) – tab. II, bylo provázáno statisticky nevýznamným zvětšováním folikulů. V několika případech byl popsán histologický stav podobný koloidní strumě – folikuly zcela vyplněné koloidem s výraznou tincí a ohraničeny plochými tyreocyty. Uvedená stavba parenchymu naznačuje tendenci k hypotyreóze vyvolané dlouhodobou zátěží vysokými dávkami jodu po předchozím významně nižším příjmu (Bednář aj., 1984). Vyšší úroveň T_3 u nosnic se zvýšeným příjmem jodu (T_3 v krevní plazmě: $4,48 \pm 1,27$ nmol/l při příjmu 10 mg I/kg směsi kontrolní skupina pouze $2,69 \pm 1,45$ nmol/l) nemohla vyvolat útlum hypotalamo-hypofyzární osy, jejímž důsledkem by bylo strumózní zvětšení štítné žlázy (Groppe aj., 1991). Podobné výsledky – pokles procentního zastoupení plochy folikulárních buněk s nevýznamnými změnami v hmotnosti štítné žlázy popisují například Zaichik a Iljina (1997) u dospělých krys po desetinásobném zvýšení denní potřeby jodu. O efektu aditivního příjmu jodu na zásobení organismu nosnic jodem svědčí jeho koncentrace ve vaječném žloutku (tab. V).

Častější výskyt lymfocytárních infiltrací ve štítných žlázách nosnic s nadbytečným příjmem jodu odpovídá stavům, které popisují Wick aj. (1989) u disponovaných jedinců jako spontánní autoimunní tyreoidity.

Nosnice přijímající dusičnanů v napájecí vodě v množství 80 mg/kg vody (tab. III, skupina B a C) měly po 30denní zátěži nevýznamně nižší hmotnost

III. Hmotnost a histometrické parametry štítné žlázy nosnic po 30denní zátěži dusičnanů – Weight and histometric parameters of the thyroid of layers after 30-day nitrate load

Skupina ¹	Příjem jodu a NO ₃ ²	Parametr ³	Jednotka ⁴	\bar{x}	s_x
A $n = 5$	0,3 mg I/kg N ₁	délka folikulů ⁵	μm	77,18	19,56
		šířka folikulů ⁶	μm	51,42	9
		výška tyreocytů ⁷	μm	2,05	0,17
		hmotnost štítné žlázy ⁸	g	0,175	0,025
		relativní hmotnost štítné žlázy ⁹	%	$0,922 \cdot 10^{-2}$	
B $n = 5$	0,3 mg I/kg N ₁ 80 mg NO ₃ /kg napájecí vody	délka folikulů	μm	97,18	15,48
		šířka folikulů	μm	62,63	13,43
		výška tyreocytů	μm	2,24	0,13
		hmotnost štítné žlázy	g	0,164	0,34
		relativní hmotnost štítné žlázy	%	$0,88 \cdot 10^{-2}$	
C $n = 5$	0,8 mg I/kg N ₁ 80 mg NO ₃ /kg napájecí vody	délka folikulů	μm	87,79	4,18
		šířka folikulů	μm	60,69	2,73
		výška tyreocytů	μm	2,76	0,22
		hmotnost štítné žlázy	g	0,15	0,021
		relativní hmotnost štítné žlázy	%	$0,826 \cdot 10^{-2}$	

Výška tyreocytů – Thyreocyte height: A : C ($P < 0,01$)

¹group, ²iodine and NO₃ intake; for 3–9 see Tab. II

IV. Hmotnost a histometrické parametry štítné žlázy nosnic po 30denním příjmu řepkového šrotu (ŘEŠ) – Weight and histometric parameters of the thyroid of layers after 30-day intake of rapeseed meal (RSM)

Skupina ¹	Příjem jodu a ŘEŠ ²	Parametr ³	Jednotka ⁴	\bar{x}	s_x
A $n = 5$	0,3 mg I/kg N ₁	délka folikulů ⁵	μm	86,7	1,52
		šířka folikulů ⁶	μm	61,26	1,01
		výška tyreocytů ⁷	μm	3,35	0,07
		hmotnost štítné žlázy ⁸	g	0,19	0,02
		relativní hmotnost štítné žlázy ⁹	%	1,065.10 ⁻²	
B $n = 5$	0,3 mg I/kg N ₁ *ŘEŠ 126 g/kg N ₁	délka folikulů	μm	88,69	6,65
		šířka folikulů	μm	64,59	6,86
		výška tyreocytů	μm	3,16	0,48
		hmotnost štítné žlázy	g	0,19	0,02
		relativní hmotnost štítné žlázy	%	1,024.10 ⁻²	
C $n = 5$	0,8 mg I/kg N ₁ *ŘEŠ 126 g/kg N ₁	délka folikulů	μm	90,97	9,76
		šířka folikulů	μm	66,29	3,99
		výška tyreocytů	μm	3,14	0,28
		hmotnost štítné žlázy	g	0,21	0,07
		relativní hmotnost štítné žlázy	%	1,118.10 ⁻²	

* obsah glukosinolatů ve 126 g extrahovaného řepkového šrotu celkem 2,3 mmol – glucosinolate content in 126 g of rapeseed meal is 2.3 mmol in total

¹group, ²iodine and rapeseed meal intake; for 3–9 see Tab. II

V. Průměrný obsah jodu ve vaječném žloutku u nosnic zatížených aditivním příjmem jodu – Average iodine content in egg yolk of layers loaded with additive iodine intake

Skupina ¹		A	B	C	D
Průměrný obsah jodu v μg/kg čerstvé hmoty žloutku ²	\bar{x}	2 303	4 762	10 614	29 592
	s_x	691	799	5 359	9 436
	n	55	15	17	30

¹group, ²average iodine content in μg/kg of yolk fresh matter

VI. Průměrný obsah jodu ve vaječném žloutku nosnic po 30denní zátěži dusičnanů – Average iodine content in egg yolk of layers after 30-day nitrate load

Přídavek dusičnanů v mg/kg směsi N ₁ ¹		A	B	C
Průměrný obsah jodu v μg/kg čerstvé hmoty žloutku ²	\bar{x}	1 028,8	1 142,5	1 398,5
	s_x	157,7	174,5	191,8
	n	23	23	23

¹nitrate supplement in mg/kg of feed N₁, ²average iodine content in μg/kg of yolk fresh matter

VII. Průměrný obsah jodu ve vaječném žloutku po 30denním příjmu řepkového šrotu – Average iodine content in egg yolk after 30-day intake of rapeseed meal

Skupina ¹		A	B	C
Průměrný obsah jodu v μg/kg čerstvé hmoty žloutku ²	\bar{x}	625,4	515,8	777,3
	s_x	123,8	108,7	175,1
	n	20	20	22

¹group, ²average iodine content in μg/kg of yolk fresh matter

štítné žlázy, ale v porovnání s kontrolní skupinou vyšší tyreocyty. Zvýšení tyreocytů může být odezvou na sekundární nedostatek jodu (Döcke, 1994) na úrovni štítné žlázy vyvolaný strumigenním účinkem podávaných

dusičnanů, který nebyl kompenzován ani přídavkem 0,5 mg jodu/kg směsi (skupina C). Ke zmenšení folikulů štítné žlázy, které bývá podle Döckeho (1994) častou tendencí efektu strumigenních faktorů, nedošlo.

Přesto, že lze předpokládat, že mechanismus přestupu jodidu do štítné žlázy se uplatňuje obdobně i u ovarií (Kreze a Langer, 1993), nezpůsobil příjem dusičnanů pokles obsahu jodu ve vaječném žloutku. Naopak, při obohacení krmné směsi o 0,5 mg jodu/kg (tab. III, skupina C) se i za současného příjmu dusičnanů zvýšil obsah jodu ve žloutku o 22 % (tab. VI).

Přídavek 126 g řepkového šrotu (2,3 mmol glukosinolátů) na kg krmné směsi sice převyšoval o polovinu doporučovanou dávku pro nosnice (Egyedová a Mihálik, 1997; Richter aj., 1996), ale neovlivnil po 30denním zkrmování zřetelně hmotnost a ani parenchym štítné žlázy (tab. IV). Předpokládaný strumigenní účinek glukosinolátů v uvedeném množství řepkového šrotu nevedl tedy ke zvýšení folikulárních buněk, ani ke změně velikosti folikulů a kvality koloidu. Histometrická charakteristika odpovídá eutyroidnímu stavu štítné žlázy. Podle Zrunka (1989) se uplatňují strumigenně glukosinoláty řepkového šrotu až při nedostačné saturaci krmné dávky jodem, ke které vzhledem ke krátké zátěži nosnic za současného příjmu kompletní směsi N₁ nedošlo. Přesto snížený průměrný obsah jodu ve vaječném žloutku nosnic u všech třech skupin je odrazem jejich nižší saturace jodem (tab. VII).

LITERATURA

- Bednář J., Röhling S., Vohnout S. (1964): Příspěvek ke stanovení proteinového jodu v krevním séru. *Českoslov. Farm.*, 13, 203–209.
- Bednář B. (1984): *Patologie III.* 2. vyd. Praha, Avicenum. 1856 s.
- Busato A. (1991): Effects of feeding rapeseed-meal on liver and thyroid gland function and histomorphology in growing pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 66, 12–27.
- Cao S. W. (1990): Study of the pathogenesis of high iodine-induced goiter. *Chung-hua Ping Li Hsueh Tsai Chin.*, 19, 294–296.
- Christensen V. L., Ort J. F. (1990): Iodine toxicity in White Turkey Breeder Hens. *Poult. Sci.*, 70, 2402–2410.
- Döcke F. (1994): *Veterinärmedizinische Endokrinologie.* 3. vyd. Jena, VEB Gustav Fisher Verlag. 863 s.
- Egyedová A., Mihálik V. (1997): Dietetické účinky krmných zmesí s řepkovými pokrutinami na znášku a produkci vajec. In: II. Kábrtovy dietetické dny, 10. 9. 1997, Brno.
- Garber D. W., Henkin Y., Osterlund L. C., Darnell B. E., Segrest J. P. (1992): Plasma lipoproteins in hyperlipidemic subjects eating iodine-enriched eggs. *J. Am. Coll. Nutr.*, 11, 294–303.
- Groppe B., Rambeck W. A., Groppe J. (1991): Iodanreicherung in Orangen und Geweben von Mastküken nach Iod-supplementation des Futters. In: *Sammelschrift Mengen- und Spurenelemente.* 11. Arbeitstagung. Jena Verlag MTV Hammerschmidt, 300–308.
- Herzig I., Kursa J. (1997): Současný stav zásobení hospodářských zvířat jodem. *Krmivářství*, 4, 31–32.
- Hoffmann G., Völker H. (1966): *Anatomic und Physiologie des Nutzgeflügels.* Leipzig, S. Hirzee Verlag. 166 s.
- Klika E. (1986): *Histologie.* 1. vyd. Praha, Avicenum. 612 s.
- Kreze A., Langer P. (1993): *Praktická endokrinologie.* 1. vyd. Bratislava Slovak Academic Press. 594 s.
- Kroupová V., Brožová V., Kursa J. (1986): Referenzwerte des Jodstatus der Kuh milch. In: *Sammelschrift 5. Spurenelementensymposium – Jod.* Jena Wiss. Publ. F. Schiller University. 117–120.
- Kroupová V., Kratochvíl P., Kaufmann S., Kursa J., Trávníček J. (1998a): Metabolická odezva aditivního příjmu jodu u nosnic. *Vet. Med. – Czech*, 43, 207–212.
- Kroupová V., Kursa J., Kratochvíl P., Trávníček J., Šachová E. (1998b): Vliv příjmu jodu a strumigenů na krevní parametry. In: *Sbor. Aktuální problémy chovu zdraví a produkce drůbeže.* České Budějovice, Scientific Pedagogical Publishing, 141–142.
- Mehner A., Hartfield X. (1983): *Handbuch der Geflügelphysiologie I. II.* Jena, VEB Gustav Fischer Verlag. 1156 s.
- Rambeck W. A., Kaufmann S., Feng J., Hollwich W., Arnold R. (1997): Verbesserung der Jodversorgung des Menschen durch Jodierung von Schweinefutter. *Tierärztl. Prax.*, 25, 312–315.
- Richter G. (1995): Einfluss der Jodversorgung der Legenhennen auf den Jodgehalt im Ei. In: *Sammelschrift Mengen- und Spurenelemente.* 15. Arbeitstagung. Leipzig, Verlag Harald Schubert. 457–464.
- Richter G., Lemser A., Bargholz J. (1996): Rapeseed and rapeseed meal as components in diets of laying hens. *Arch. Tierernähr.*, 49, 229–41.
- Schöne F. (1987): Vitamin A status of pigs given feed with differing contents of iodone and thyroid antagonists. In: *Symp. Vitamine and Ergotropika. Podiums diskussion zur Verzehrsregulation.* Reinhardbrunn 28–30. September 1987.
- Wick G., Brezinschek H. P., Hála K., Dietrich H., Wolf H., Krömer G. (1989): The Obese Strain (OS) of chickens: an animal model with spontaneous autoimmune thyroiditis. *Adv. Immunol.*, 47, 433–500.
- Zaichik V., Iljina T. (1997): Excessive iodine intake and thyroid tumors. In: *Sammelschrift Mengen- und Spurenelemente.* 17. Arbeitstagung. Jena, F. Schiller University. 481–487.
- Zrunek A. (1989): Rostlinné strumigeny ve vztahu ke zdraví hospodářských zvířat. *Veterinářství*, 39, 483–485.

Received: 99-01-13

Accepted after corrections: 99-03-24

Kontakní adresa:

Ing. Jan Trávníček, CSc., Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, Studentská 13, 370 05 Č. Budějovice, Česká republika
Tel. +420 38 777 26 11, fax +420 38 777 26 21, e-mail: travnic@zf.jcu.cz

REVIEW ARTICLE PŘEHLED

PORCINE NEONATAL COCCIDIOSIS

KOKCIDIÓZA SAJÍCÍCH SELAT

B. Koudela

Parasitological Institute of the Czech Academy of Sciences, České Budějovice, Czech Republic

ABSTRACT: Coccidiosis in pigs is a disease of nursing piglets, and *Isospora suis* is the cause of neonatal porcine coccidiosis. A review is given of *I. suis* infection in piglets, in which recent data are presented.

Isospora suis; porcine neonatal coccidiosis; diarrhoea in piglets

ABSTRAKT: Kokcidie *Isospora suis* je původcem průjmového onemocnění sajících selat. Obsahem tohoto sdělení se přehled současných poznatků o tomto onemocnění a jeho původci.

Isospora suis; isosporóza; průjmové onemocnění selat

CONTENTS

1. Introduction
2. Epidemiology of *Isospora suis* infections
 - 2.1. Occurrence and prevalence
 - 2.2. Type of herds
 - 2.3. Age of piglets with isosporosis
 - 2.4. Seasonal variation
 - 2.5. Source of infection
3. Developmental cycle and biology of *I. suis*
 - 3.1. Sporogony
 - 3.2. Excystation
 - 3.3. Endogenous development
 - 3.4. Extraintestinal stages
 - 3.5. Development in cultured cells and avian embryos
4. Clinical symptoms
5. Pathological changes and pathogenicity
6. Interactions with other enteropathogens
7. Immunity
8. Diagnosis
 - 8.1. Coprological examination
 - 8.2. Demonstration of developmental stages in smears of intestinal mucosa
 - 8.3. Differential diagnosis
9. Treatment and control
10. Conclusions
11. References

OBSAH

1. Úvod
2. Epizootologie kokcidiózy sajících selat
 - 2.1. Výskyt a rozšíření
 - 2.2. Vliv technologie chovů na výskyt kokcidiózy sajících selat
 - 2.3. Věk selat s klinickou kokcidiózou
 - 2.4. Sezonní dynamika
 - 2.5. Zdroj infekce
3. Vývojový cyklus a biologie *I. suis*
 - 3.1. Sporulace
 - 3.2. Excystace
 - 3.3. Endogenní vývoj
 - 3.4. Extraintestinální stadia
 - 3.5. Kultivace v tkáňových kulturách a v kuřecích embryích
4. Klinické příznaky
5. Patologie a patogenita
6. Interakce s jinými enteropatogeny
7. Imunita
8. Diagnostika
 - 8.1. Vyšetření trusu
 - 8.2. Průkaz vývojových stadií kokcií *I. suis* ve střevní sliznici
 - 8.3. Diferenciální diagnostika
9. Terapie a profylaktická opatření
10. Závěr
11. Literatura

1. ÚVOD

Kokcidie jsou protozoární vnitrobuněční parazité, kteří způsobují klinická onemocnění zvířat užitkových i zvířat chovaných ze záliby. Většina kokciidií jsou jednhostitelské druhy, které parazitují v buňkách střední sliznice a způsobují průjemová onemocnění. Obdobně jako ostatní užitková zvířata je prasce hostitelem mnoha druhů středních kokciidií. U prasete domácího (*Sus scrofa domestica*) je popsáno celkem osm druhů středních kokciidií rodu *Eimeria* a jeden druh rodu *Isospora* (Stuart a Lindsay, 1986). Zatímco zástupci rodu *Eimeria* způsobují většinou asymptomatické infekce prasat, kokcidie *Isospora suis* je původcem klinického onemocnění, které je v literatuře označováno jako kokcidióza sajících selat nebo isosporóza (porcine neonatal coccidiosis, piglet coccidiosis, coccidiosis in piglets before weaning, isosporosis). Obsahem tohoto příspěvku je přehled informací o kokcidióze sajících selat a jejím původci kokcidiu *Isospora suis*, který vychází z informací v odborné literatuře a ze zkušeností autora a jeho spolupracovníků.

2. EPIZOOTOLOGIE KOKCIDIÓZY SAJÍCÍCH SELAT

2.1. Výskyt a rozšíření

Ačkoliv první popis oocyst kokcidie *I. suis* a popis klinických příznaků po experimentální infekci prasat pocházejí již z roku 1934 (Biester a Murray, 1934), první práce věnované klinické kokcidióze sajících selat jsou až z roku 1976 (O'Neill a Parfitt, 1976; Sangster aj., 1976). Do dnešních dnů byla kokcidióza sajících selat prokázána v řadě zemí všech světadílů a představuje závažný zdravotní problém v chovech prasat. Ve Spojených státech a Kanadě je kokcidie *I. suis* diagnostikována jako primární etiologické agens u 10 až 15 % selat s průměrným onemocněním a ekonomické ztráty způsobené kokcidiózou sajících selat v chovech prasat v USA jsou odhadovány na 10 miliónů USD ročně (Lindsay a Blagburn, 1994). V Evropě byla kokcidie *I. suis* popsána v chovech prasat v Dánsku (Greve, 1985), Švédsku (Nilsson aj., 1984), Švýcarsku (Guscetti aj., 1994), Holandsku (Eysker aj., 1994), Německu (Otten aj., 1996; Meyer a Dauschies, 1998) a v Chorvatsku (Rajković-Janje aj., 1998). V rámci komplexního projektu v severských evropských zemích zaměřeného na parazitózy prasat byla kokcidie *I. suis* diagnostikována v chovech prasat ve Švédsku, Dánsku, Norsku, Finsku a Grónsku (Roepstorff aj., 1998). Kokcidióza sajících selat byla také popsána v Austrálii (O'Callaghan a Langston, 1990; Driesen aj., 1993), Koreji (Chae aj., 1998), Brazílii (Sayd a Kawazoe, 1996; Baccaro aj., 1998) a Venezuele (Boulanger aj., 1994). V našich podmínkách klinickou isosporózu popsali v druhé polovině 80. let Koudela aj. (1986). V poslední době se parazitárním onemocněním prasat věnovali kolegové z Veterinární

a farmaceutické univerzity v Brně a uvádějí výskyt oocyst *I. suis* ve 3,3 až 40 % vzorků trusu prasat odebraných celkem ve 20 chovech prasat v různých regionech na Moravě (Lukešová aj., 1997).

2.2. Vliv technologie a velikosti chovů na výskyt kokcidiózy sajících selat

Robinson aj. (1983) pozorovali isosporózu především v chovech s kontinuální a bezstielivou technologií. Sanford (1983) uvádí výskyt klinické isosporózy v chovech různé velikosti a různé technologie, ale současně zdůrazňuje nejčastější výskyt ve větších chovech s kontinuální a bezstielivou technologií. Sami jsme zjišťovali klinickou isosporózu častěji v chovech s bezstielivou technologií (Koudela aj., 1986). Larsen (1996) uvádí výsledky koprologických vyšetření selat v chovech prasat ve skandinávských zemích, kde byla prokázána korelace mezi velikostí chovu a výskytem *I. suis*. V chovech s počtem prasníc pod 50 kusů byla *I. suis* prokázána u 6,9 % selat, v chovech s 50 až 99 prasnícemi byly oocysty *I. suis* zjištěny u 21,5 % selat a v chovech s více než 100 prasnícemi byly oocysty *I. suis* potvrzeny u 34,3 % vyšetřovaných selat. Naproti tomu výsledky rozsáhlých studií zaměřených na výskyt *I. suis* v chovech různé velikosti a technologie v Německu nepotvrdily závislost výskytu *I. suis* na velikosti chovu a typu technologie (Otten aj., 1996; Meyer a Dauschies, 1998). Otten aj. (1996) sledovali celkem 10 chovů různé technologie s počtem prasníc od 30 do 100 kusů a nezjistili žádnou souvislost mezi typem, velikostí chovu a výskytem isosporózy. V návaznosti na tuto práci byly v roce 1998 prezentovány výsledky studie zaměřené na výskyt *I. suis* v pěti velkých chovech, kde se počet chovných prasníc pohyboval od 150 do 230 kusů. Ve stejné studii byl také srovnáván výskyt *I. suis* v chovu, kde se odstavují selata ve věku čtyř až pěti týdnů s chovem, kde jsou selata odstavována již ve věku tří týdnů. Výsledky této studie potvrdily značné rozšíření *I. suis* v chovech prasat v Německu a prokázaly korelaci mezi průměrnými onemocněními selat v chovech a výskytem *I. suis*. Ve všech sledovaných chovech byla zjištěna isosporóza selat bez statisticky významných souvislostí mezi typem, velikostí chovu a výskytem isosporózy (Meyer a Dauschies, 1998).

2.3. Věk selat s klinickou kokcidiózou

Isosporóza selat se klinicky manifestuje jako průjemové onemocnění sajících selat ve věku 5 až 15 dní. V literatuře se rozcházejí informace o výskytu isosporózy ve vztahu k věku selat. Tyto rozdíly jsou způsobené použitou metodou k diagnostice isosporózy. Na základě komplexní diagnostiky založené na klinickém, patologickém a parazitologickém vyšetření zjistili Robinson aj. (1983) nejčastější výskyt isosporózy u selat ve věku 7 až 10 dní. Také Sanford (1983) uvádí celkem

63, 8 % případů prokázané kokcidiózy u selat ve věku 7 až 10 dní. Klinické příznaky průjmu se objevují u infikovaných selat zpravidla dva až tři dny před vylučováním prvních oocyst *I. suis* v trusu, které je možné diagnostikovat koprologickým vyšetřením. Oocysty *I. suis* jsme nejdříve diagnostikovali u selat ve věku sedmi dní. Při koprologickém vyšetření jsme isosporózu nejčastěji zjistili u selat ve věku 11 až 15 dní (Koudela aj., 1986). Chae aj. (1998) diagnostikovali isosporózu u selat ve věku 7 až 20 dní. Na základě průkazu oocyst v trusu selat uvádějí Otten aj. (1996) a Meyer a Daugschies (1998) nejvíce případů infekcí kokcidií *I. suis* u selat ve věku třetího týdnu věku.

2.4. Sezonní dynamika

Dlouhodobé sledování chovů s výskytem klinické isosporózy ve Spojených státech, Kanadě a Koreji prokázalo sezonní dynamiku výskytu (Bergeland, 1981; Robinson aj., 1983; Sanford, 1983; Stuart a Lindsay, 1986; Chae aj., 1998). Nejvyšší prevalence byla pozorována v letních měsících. V tomto období se teplota v porodních kotelích pohybuje nad 30 °C, která výrazně urychluje sporulaci oocyst *I. suis* a umožňuje rychlejší šíření v chovu (Stuart a Lindsay, 1986). Sami jsme také pozorovali nejvyšší výskyt isosporózy v letních měsících (Koudela aj., 1986). Sezonní dynamiku výskytu naopak nepotvrdily výsledky jiných autorů (Driesen aj., 1993; Larsen, 1996; Otten aj., 1996; Meyer a Daugschies, 1998).

2.5. Zdroj infekce

Problém zdroje a šíření infekčního agens, tj. oocyst *I. suis*, byl v odborné literatuře dlouho diskutován. Původně se předpokládalo, že zdrojem infekce selat jsou prasnice, u kterých dochází v období porodu a v prvních dnech laktace k vylučování oocyst *I. suis* trusem (Roberts a Walker, 1982). Tento výsledek však nepotvrdila další detailní sledování prasnic v chovech s isosporózou selat (Lindsay aj., 1984; Koudela aj., 1986). Dnes převažuje názor, že hlavním zdrojem infekce selat je vnější prostředí kontaminované oocystami *I. suis* (Lindsay a Blagburn, 1994). Tento předpoklad je nepřímo potvrzen pozitivním vlivem asanace vnějšího prostředí a terapie zaměřené na selata, a tím na snížení výskytu isosporózy v chovech (Lindsay a Blagburn, 1994).

3. VÝVOJOVÝ CYKLUS A BIOLOGIE *I. SUIS*

Kokcidie *I. suis* je jednohostitelský vnitrobuněčný protozární parazit, který je taxonomicky řazen společně s ostatními kokcidiemi do kmene *Apicomplexa*. Jedním ze základních určujících znaků kokcidií na úrovni druhu je velikost, tvar, barva a charakter obsahu oocyst. Pro zástupce rodu *Isospora* jsou charakteristické oocys-

ty s dvěma sporocystami, z nichž každá obsahuje čtyři sporozoity.

3.4. Sporulace

Vývojový cyklus jednohostitelských kokcidií sestává z části, která probíhá v hostiteli (endogenní vývoj) a z vývoje ve vnějším prostředí (exogenní vývoj). Z hostitele se uvolňují nezralé oocysty. Průběh zrání oocyst (sporulace) je ovlivněn vlhkostí, teplotou a přítomností kyslíku. Doba sporulace oocyst *I. suis* je ve srovnání s jinými druhy kokcidií savců velmi krátká. Při teplotě 20 °C jsou oocysty infekční za 56 hodin a při teplotě 25 °C již za 40 hodin. Zatímco u druhů kokcidií rodu *Eimeria* dochází při teplotě nad 30 °C k výraznému zpomalení sporulace, v případě *I. suis* je sporulace oocyst nejrychlejší při teplotě 37 °C. Při této teplotě jsou oocysty plně infekční již za 12 hodin (Lindsay aj., 1984; Ernst aj., 1986). Tato vlastnost oocyst *I. suis* má významný vliv pro rychlé šíření isosporózy v chovech prasat.

3.2. Excystace

Excystace je proces uvolňování sporozoitů ze sporocyst a oocyst. K excystaci dochází v počátečních úsecích trávicího traktu za účasti žaludeční šťávy, trypsinu a žlučových kyselin. Proces excystace v podmínkách *in vitro* popsali Lindsay aj. (1983a).

3.3. Endogenní vývoj

Endogenní vývoj *I. suis* a vývojová stadia byly popsány při experimentálních infekcích jedno- až třídenních selat (Lindsay aj., 1980; Harleman a Meyer, 1984; Vítovec a Koudela, 1990). Vývojový cyklus *I. suis* probíhá v cytoplazmě enterocytů tenkého střeva. Nejvíce vývojových stadií se nachází v zadním jejunu a ileu, méně často byla vývojová stadia prokázána v céku a kolonu (Vítovec a Koudela, 1990). V průběhu vývojového cyklu je možné rozlišit dva typy merontů (schizontů) a stadia gametogonie. Meronty prvního typu mají dvě jádra a dělí se endodygonií (Matuschka, 1982; Lindsay aj., 1980), procesem, kdy uvnitř mateřské buňky – merontu vznikají dva merozoity. Druhý typ merontů je vícejaderný a vzniká z něho až 16 merozoitů. První oocysty v trusu selat se objevují za čtyři až pět dní po infekci. Tato doba se označuje jako prepatentní perioda. Patentní periodou se rozumí doba, po kterou jsou vylučovány oocysty kokcidií trusem. Patentní perioda *I. suis* trvá 8 až 16 dní a má cyklický charakter s dvěma až třemi vrcholy vylučování v intervalu pěti dní (Vítovec a Koudela, 1990; Christensen a Henriksen, 1994). Cyklický charakter vylučování oocyst naznačuje možnost existence extraintestinálních stadií *I. suis*.

3.4. Extraintestinální stadia

Extraintestinální stadia *I. suis* nebyla mikroskopicky prokázána v tkáních spontánně nebo experimentálně infikovaných selat (Lindsay aj., 1980; Harleman a Meyer, 1984; Vítovec a Koudela, 1987, 1990) nebo experimentálně infikovaných myši oocystami *I. suis* (Stuart aj., 1982a; Pickeney aj., 1993). Harleman a Meyer (1984) však prokázali existenci extraintestinálních stadií *I. suis* nepřímo, když se jim podařilo vyvolat infekci selat intraperitoneální inokulací mezenterálních mízních uzlin a slezin selat, která byla předtím experimentálně infikována velkým počtem oocyst *I. suis*.

3.5. Kultivace v tkáňových kulturách a kuřecích embryích

Kultivace kokcií v tkáňových kulturách nebo v kuřecích embryích představuje výrazné usnadnění studia kokcií. Umožňuje jednak studovat daný druh kokcií v podmínkách *in vitro* a také získávat stadia kokcií pro další studium bez použití experimentálních zvířat. Jednotlivé druhy kokcií však vyžadují specifické podmínky kultivace a většinu druhů kokcií, které způsobují onemocnění zvířat, se nedaří kultivovat. První informace o kultivaci *I. suis* pocházejí z roku 1984, kdy Fayer aj. (1984) publikovali výsledky svého snažení převést *I. suis* do podmínek *in vitro*. Podobně jako později Lindsay a Blagburn (1987) pozorovali v tkáňových kulturách různých linií savčích buněk pouze počáteční nepohlavní část vývoje *I. suis* – endodyogonii. Teprve výběr vhodné linie buněk tkáňové kultury umožnil kompletní vývoj *I. suis* včetně tvorby oocyst (Lindsay aj., 1998). Již dříve popsali Lindsay a Current (1984) kompletní vývoj *I. suis* v chorioalantoidní membráně kuřecích embryí. Produkce oocyst *I. suis* v podmínkách *in vitro* je však malá a oocysty nesporulují (Lindsay a Current, 1984; Lindsay aj., 1998), a proto je nelze dále použít pro další studium a případné experimentální infekce.

4. KLINICKÉ PŘÍZNAKY

Isosporóza se projevuje jako akutní průjemové onemocnění, které postihuje selata ve věku 5 až 15 dní. Ojedinele se klinické onemocnění spojené s infekcí *I. suis* vyskytuje u selat v období odstavu (Nilsson, 1988). Trus postižených selat je nejprve pastovitý, v průběhu jednoho až dvou dnů přechází trus ve žlutý vodnatý průjem, který přetrvává tři až pět dnů, kdy je konzistence trusu opět pastovitá. Selata jsou potřísněna na zadní části těla trusem a v kotci se šíří zápach zkaženého mléka. V následném období je trus kašovitě konzistence a může obsahovat zvýšené množství hlenu a zbytky pablán. Po tomto období průjmu dochází u některých selat k obstipaci a trus má charakter žlutých pelet. V některých případech můžeme u selat pozorovat cyklický

průběh onemocnění, kdy se průjem vyskytuje opakovaně dvakrát až třikrát v intervalu pěti až sedmi dnů. Pro kokcidiózu sajících selat je charakteristický průběh onemocnění ve vrhu. Současně je průjem postiženo pouze 30 až 75 % selat ve vrhu. Také v rámci chovu či sekce zpravidla prodělává průjemové onemocnění pouze část selat. Postižená selata zaostávají v růstu a při odstavu jsou selata ve vrzích nevyrovnaná. Souhrnná morbidita selat je do odstavu vysoká a dosahuje 75 až 100 %, naproti tomu mortalita je nízká (Coussement aj., 1981; Robinson aj., 1983; Sanford, 1983; Stuart a Lindsay, 1986; Koudela aj., 1986; Vítovec a Koudela, 1987).

5. PATOLOGIE A PATOGENITA

Nejzávažnější makroskopické změny vyvolané spontánní kokcidiózou jsou u selat ve věku 10 až 12 dnů. V závislosti na stupni infekce jsou v oblasti zadního a středního jejunu katarálně zánětlivé změny, hemorhagie, ale také ložiskovitě pablánové zánětlivé změny. Při histopatologickém vyšetření je možno zjistit atrofií, srůsty střevních klků spojené s erozemi na hrotech atrofovaných klků, ložiskovitě i nekrotický pablánový zánět a hyperplazii střevních krypt (Stuart aj., 1980; Bergeland, 1981; Eustis a Nelson, 1981; Sanford, 1983; Vítovec a Koudela, 1987; Baccaro aj. 1998).

Experimentální infekce selat prokázaly, že charakter klinických příznaků a patologických změn je úměrný počtu podaných oocyst *I. suis* (Stuart aj., 1980, 1982b; Robinson aj., 1983; Harleman a Meyer, 1985; Vítovec a Koudela, 1990). Po experimentální infekci jedno- až třídních selat dávkou 50 000 oocyst dochází ke krátkodobému průjemovému onemocnění bez úhynů selat. Dávka 200 000 oocyst způsobuje profúzní průjemové onemocnění spojené s dehydratací a ojedinelé úhyny selat (Vítovec a Koudela, 1990) a dávka 300 000 až 400 000 oocyst způsobuje úhyny většiny infikovaných selat (Stuart aj., 1980, 1982b; Jarvinen aj., 1988). Histochemické vyšetření střeva selat při experimentální infekci selat prokázalo funkční poškození střeva v řadě sledovaných ukazatelů. Výsledky histochemického vyšetření byly publikovány v rozsáhlé sérii prací (Kudweis aj, 1989a, b, c, d; 1990a, b, c, d, e).

Experimentální infekce gnotobiotických selat potvrdily, že kokcie *I. suis* je primárním enteropatogenem, který způsobuje klinickou kokcidiózu sajících selat (Harleman a Meyer, 1985; Vítovec a Koudela, 1990). V těchto experimentech jsme potvrdili opakované poškození střevní sliznice, které korespondovalo s opakováním období akutního průjmu a opakovaným vylučováním oocyst *I. suis*, které byly pozorovány u spontánně infikovaných selat (Vítovec a Koudela, 1990).

Nepříznivé působení *I. suis* na selata se projevuje snížením přírůstků hmotnosti. Lindsay aj. (1985) uvádějí průměrnou hmotnost třítydenních selat po prodělané experimentální kokcidióze 3,9 kg a průměrnou hmotnost stejně starých kontrolních selat 5,6 kg. K po-

dobným závěrům dospěli Del Castillo aj. (1996b) při zhodnocení vlivu isosporózy na přírůstky hmotnosti selat v chovech v Kanadě.

6. INTERAKCE S JINÝMI ENTEROPATOGENY

Kokcidie *I. suis* se uplatňuje jako původce průjmového onemocnění selat samostatně nebo společně s jinými etiologickými agens. Na tuto skutečnost upozorňuje řada autorů a zdůrazňují komplexní přístup k diagnostice původců (Bergeland, 1981; Roberst a Walker, 1980; Sanford, 1983; Larson a Schwartz, 1987; Guscetti aj., 1994). Obecně se předpokládá, že při současném působení více enteropatogenů se jejich působení na organismus vzájemně sčítá nebo potencuje. Tento předpoklad však nepotvrdili Baba a Gaffar (1985), když zjistili nižší počty bakterií *Salmonella typhimurium* ve střevě selat experimentálně souběžně infikovaných *I. suis*, než u selat infikovaných pouze salmonelami. Sami jsme zjistili synergistické působení rotavirů a *I. suis* při experimentálních infekcích konvenčních a gnotobiotických selat (Vítovec aj., 1991).

7. IMUNITA

Kokcidie jsou výrazně imunogenní parazité a po prodělané infekci se vytváří silná imunita. Stuart aj. (1982c) zjistili, že selata po reinfekci oocystami *I. suis* vylučují pouze malé počty oocyst bez klinických příznaků isosporózy. Stejní autoři prokázali přirozenou věkovou rezistenci k infekci kokcií *I. suis* (Stuart aj., 1982b). U selat infikovaných ve věku dvou až čtyř týdnů nedochází ke klinickým projevům isosporózy a počet vyloučených oocyst je signifikantně menší než u selat infikovaných druhý až třetí den věku. Jarvinen aj. (1988) srovnávali hodnoty jednotlivých sérových imunoglobulinů selat infikovaných *I. suis* a selat kontrolních a nezjistili žádné signifikantní rozdíly. Sami jsme srovnávali úlohu získané imunity a přirozenou věkovou rezistenci selat při experimentální isosporóze na základě klinického průběhu, počtu vylučovaných oocyst a hmotnostních přírůstků selat. Zjistili jsme, že větší roli má přirozená věková rezistence než získaná imunita (Koudela a Kučerová, 1999). Isosporóza selat se jako klinické onemocnění projevuje v období, kdy odeznívá kolostrální imunita a není doposud plně zralý vlastní imunitní systém selat. Domníváme se, že z těchto důvodů skončily neúspěchem pokusy o imunizaci selat prostřednictvím kolostra (Baekbo aj., 1994) nebo snahy o vytvoření rekombinantní vakcíny (Welter aj., 1996).

8. DIAGNOSTIKA

Diagnostika kokcidiózy sajících selat v chovu je možná na základě klinického průběhu onemocnění, vyšetřením trusu selat, na základě patologického nálezu

a průkazem vývojových stadií kokcií *I. suis* ve střešní sliznici. V předcházejícím textu jsme již podrobně popsal klinický průběh onemocnění a patologický nález při spontánní isosporóze selat. Následuje metodický návod, který popisuje parazitologické metody vyšetřením trusu selat a průkaz vývojových stadií kokcií *I. suis* ve střešní sliznici selat.

8.1. Vyšetření trusu

Diagnostika kokcidiózy sajících selat na základě průkazu oocyst *I. suis* v trusu selat je ovlivněna několika skutečnostmi. První oocysty *I. suis* se objevují v trusu selat za dva až tři dny po začátku průjmu. V tomto období má trus selat různou konzistenci a charakter, které ovlivňují vlastní průběh koprologického vyšetření. Vylučování oocyst selaty je nepravidelné a individuální (Henriksen a Christensen, 1992; Del Castillo aj., 1996a) a oocysty *I. suis* je možné prokázat také v trusu selat bez klinických příznaků. Pro koprologické vyšetření kokcidiózy sajících selat v chovu doporučujeme následující postup (Koudela a Vítovec, 1998):

- odebrat vzorky trusu od selat ve věku 10 až 14 dní
- odebrat trus především od selat s příznaky průjmu
- vzorky trusu je třeba odebrat od čtyř až pěti vrhů selat v sekci (chovu)
- při individuálním odběru (rektálními tyčinkami) je třeba odebrat trus minimálně od pěti selat ve vrhu
- individuální odběr lze nahradit směsným vzorkem od pěti selat, popřípadě směsným vzorkem trusu z podlahy kotece
- vlastní koprologické vyšetření provádět flotací v Sheatherově cukerném roztoku (500 g cukru, 6,5 g fenolu, 320 ml vody), méně vhodný je tradiční Brezův flotační roztok
- pro kvantitativní vyšetření pomocí McMasterovy počítací komůrky použít nasycený roztok chloridu sodného v kombinaci s cukerným roztokem (při kvantitativním vyšetření považovat hodnoty OPG (oocysts per gram) 10^4 až 10^5 za průkazné pro stanovení kokcidie *I. suis* jako původce akutního průjmového onemocnění selat v chovu.

Oocysty *I. suis* sférického až subférického tvaru a měří 19 až 25 x 17 až 21 μm . Stěna oocysty je hladká a má lehce nažloutlou barvu. Vysporulované oocysty obsahují dvě sporocysty se čtyřmi sporozoity.

8.2. Průkaz vývojových stadií kokcií *I. suis* ve střešní sliznici

Rychlou diagnostickou metodou je vyšetření roztěrů seškrabů střešní sliznice obarvených podle Giemsy (Lindsay aj., 1983b; Koudela a Vítovec, 1998). Roztěr střešní sliznice je třeba provádět z oblasti zadního a středního jejuny, kde probíhá v enterocytech vývojový cyklus *I. suis*. V obarvených roztěrech se nacházejí shluky nebo jednotlivé merozoity banánovitěho tvaru.

Po obarvení podle Giemsky jsou modré s purpurovým zbarveným jádrem a měří 8 až 12 µm. Dále je možné prokázat kulovité makrogamonty nebo mikrogamonty s drobnými mikrogametami na periferii. Ve stadiu rozvinuté infekce jsou v roztzerech také málo barvitelné subsférické oocysty.

Při histologickém vyšetření střevní sliznice čerstvé uhybnulého nebo utraceného selete je rozhodující pro potvrzení diagnózy nález vývojových stadií *I. suis* v enterocytech zadního a středního jejunu. Pro histologické vyšetření vyhovuje základní barvení hematoxylin-eosinem, z jiných barvicích metod se osvědčila Wolbachova modifikace Giemsova barvení.

8.3. Diferenciální diagnostika

Popsané postupy umožňují diagnostikovat infekce selat kokcií *I. suis*. Tato kokcie je prokázáným primárním enteropatogenem, který se uplatňuje jako původce průjmového onemocnění selat samostatně, často však společně s ostatními enteropatogeny z řad virů a bakterií: TGE virus, ED virus, rotaviry a enterotoxigenní kmeny *Escherichia coli* (ETEC) a *Clostridium perfringens* typ C (Larson a Schwartz, 1987; Guscetti aj., 1994). Použití výše popsaných postupů pro diagnostiku isosporózy ve spojení s ostatními metodami (virologické a bakteriologické vyšetření) vede ke správnému určení původce průjmového onemocnění selat a umožňuje zvolit vhodný postup při potlačení infekčních průjmových onemocnění selat.

9. TERAPIE A PROFYLAKTICKÁ OPATŘENÍ

V minulosti, kdy převládala názor, že zdrojem oocyst *I. suis* pro selata jsou prasnice, doporučovali někteří autoři podávání antikokcidik prasnicím před porodem a v období laktace (Roberts a Walker, 1982; Cunningham, 1984). Při tlumení isosporózy byla ověřována celá řada léčiv: ze sulfonamidů sulfaquinoxalin (Coussement aj., 1981) a sulfaetopyridazin (Cunningham, 1984); z antikokcidik halofuginon a lasalocid (Männer aj., 1981; Matuschka a Männer, 1981), decoquinat (Stuart a Lindsay, 1986), amprolium (Roberts a Walker, 1982; Ernst aj., 1985; Koudela aj., 1986; Girard a Morin, 1987), monensin (Roberts a Walker, 1982; Doré a Morin, 1987) a declazuril (Mandsen aj., 1990). Výsledky použití těchto léčiv jsou nepřesvědčivé a rozdílné u různých autorů.

Nejlepší výsledky jsou v současnosti dosahovány při použití antikokcidika toltrazuril, které bylo vyvinuto proti kokcióze drůbeže (Baycox®, Bayer, Germany). V podmínkách chovu prasat s klinickou isosporózou selat jsme prokázali terapeutický a preventivní účinek toltrazurilu (Koudela aj., 1991). Další podobné studie potvrdily naše výsledky (Boulangier aj., 1994; Martineau aj., 1994; Driesen aj., 1995; Youn, 1996). Jednorázová perorální aplikace toltrazurilu selatům

v dávce 20 mg/kg ž. hm. v období tří až pěti dní jejich věku eliminuje vylučování oocyst a výrazně snižuje výskyt průjmového onemocnění v chovu. Důležitá je včasná aplikace toltrazurilu selatům ještě před poškozením střevní sliznice, tj. tři až pět dní po narození.

Další účinnou metodou, která snižuje výskyt isosporózy selat v chovech, je důkladná asanace (Ernst aj., 1985; Stuart a Lindsay, 1986). Oocysty *I. suis*, obdobně jako oocysty jiných druhů kokcií, odolávají běžným asanačním postupům a dezinfekčním prostředkům. Účinnost různých dezinfekčních prostředků na oocysty *I. suis* podle jejich vlivu na sporulaci oocyst testovali Stuart aj. (1981). Tito autoři prokázali zastavení sporulace oocyst *I. suis* po aplikaci komerčního roztoku čpavku (household ammonia) v 50% a vyšší koncentraci. Výchozí koncentraci čpavku (čpavkové vody) však neuvádějí. Tuto informaci později převzali Tubbs (1987) a Larsen (1996) s tím, že referují o dobrém účinku 50% čpavku. Novější informace o účinku komerčních dezinfekčních prostředků na oocysty *I. suis* nebyly v odborné literatuře publikovány. Dá se však předpokládat, že použití dezinfekčních prostředků na bázi čpavku, u kterých je uváděna účinnost na oocysty kokcií rodu *Eimeria* u drůbeže, budou také působit na oocysty *I. suis*. Z fyzikálních faktorů se na devitalizaci oocyst *I. suis* doporučuje horká pára (>70 °C) (Tubbs, 1987; Larsen, 1996).

10. ZÁVĚR

Infekční průjmová onemocnění selat patří mezi ekonomicky závažná onemocnění, která postihují chovy prasat všech typů technologií. Mezi relativně méně známé původce průjmových onemocnění selat patří kokcie *I. suis*. Použití současných poznatků o kokcióze sajících selat (isosporóze) a jejím původci kokcií *I. suis* umožňuje chránit zdraví selat v chovech a současně zabránit výrazným ekonomickým ztrátám.

11. LITERATURA

- Baba E., Gaffar S. M. (1985): Interfering effect of *Isospora suis* infection on *Salmonella typhimurium* infection in swine. *Vet. Parasitol.*, 17, 271-278.
- Baccaro M. R., Moreno A. M., Calderaro F. F., Pena H. F. J. (1998): Morphological characterisation of intestinal lesions in diarrhoea caused by *Isospora suis* in suckling pigs. In: Proc. 15th IPSV Congr., Birmingham, England, 250.
- Baekbo P., Christensen J., Henriksen S. A., Nielsen K. (1994): Attempts to induce colostral immunity against *Isospora suis* infections in piglets. In: Proc. 13th IPSV Congr., Bangkok, Thailand, 244.
- Bergeland M. E. (1981): *Isospora suis* enteritis in piglets: Diagnosis and epizootology. *Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.*, 24, 427-436.

- Biester H. E., Murray C. (1934): Studies in infectious enteritis of swine. VIII. *Isoospora suis* n. sp. in swine. J. Am. Vet. Med. Assoc., 85, 207-218.
- Boulanger A., De Jesus A., De Araujo A., Sogbe E., Utrera V., Herrera D., Pappaterra G. (1994): Efficacy of toltrazuril (Baycox®) in prevention of coccidial diarrhea in piglets in Venezuela. In: Proc. 13th IPSV Congr., Bangkok, Thailand, 258.
- Chae C., Kwon D., Kim O., Min K., Cheon D. S., Choi C., Kim B., Suh J. (1998): Diarrhoea in nursing piglets associated with coccidiosis: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. Vet. Rec., 143, 417-420.
- Christensen J. P. B., Henriksen S. A. (1994): Shedding of oocysts in piglets experimentally infected with *Isoospora suis*. Acta Vet. Scand., 35, 165-172.
- Coussemont W., Ducatelle R., Geeraets S., Berghen P. (1981): Baby pig diarrhea caused by coccidiosis. Vet. Quart., 3, 57-60.
- Cunningham J. M. (1984): The field diagnosis and cost-effective treatment of swine coccidiosis. Agric. Pract., 5, 24-30.
- Del Castillo J., Dumas G., Villeneuve A., Martineau G. P. (1996a): Individual *Isoospora suis* oocyst excretion: diagnostic applications. In: Proc. 14th IPSV Congr., Bologna, Italy, 357.
- Del Castillo J., Germai M. C., Ménard J., Villeneuve A., Martineau G. P. (1996b): The effect of coccidiosis on preweaning and postweaning growth of early-weaned piglets. In: Proc. 14th IPSV Congr., Bologna, Italy, 365.
- Doré M., Morin M. (1987): Porcine neonatal coccidiosis: Evaluation of monensin as a preventive therapy. Can. Vet. J., 28, 663-666.
- Driesen S. J., Carland P. G., Fahy V. A. (1993): Studies on preweaning piglet diarrhoea. Aust. Vet. J., 70, 259-262.
- Driesen S. J., Fahy V. A., Carland P. G. (1995): The use of toltrazuril for the prevention of coccidiosis in piglets before weaning. Aust. Vet. J., 72, 139-141.
- Ernst J. V., Lindsay D. S., Current W. L. (1985): Control of *Isoospora suis*-induced coccidiosis on a swine farm. Am. J. Vet. Res., 46, 643-645.
- Ernst J. V., Lindsay D. S., Jarvinen J. A., Todd K. S., Bane D. P. (1986): The sporulation time of *Isoospora suis* oocysts from different sources. Vet. Parasitol., 22, 1-8.
- Eustis S. L., Nelson D. T. (1981): Lesions associated with coccidiosis in nursing piglets. Vet. Pathol., 18, 21-28.
- Eysker M., Boerman G. A., Hollanders W., Verheijden J. H. M. (1994): The prevalence of *Isoospora suis* and *Strongyloides ransomi* in suckling piglets in the Netherlands. Vet. Quart., 16, 203-205.
- Fayer R., Gamble H. R., Ernst J. V. (1984): *Isoospora suis*: Development in cultured cells with some cytological observation. Proc. Helminth. Soc. (Washington), 51, 154-159.
- Girard C., Morin M. (1987): Amprolium and furazolidone as preventive treatment for intestinal coccidiosis of piglets. Can. Vet. J., 28, 667-669.
- Greve E. (1985): *Isoospora suis* species in a Danish SPF-herd. Nord. Vet. Med., 37, 140-144.
- Guscetti F., Hoop R. K., Steiger R., Burgi E., Bertschinger H. U., Pospischil A. (1994): Durchfallerkrankungen bei 1 bis 4 Wochen alten Saugferkeln aus Problembetrieben: Erregerspektrum, Histologie, Enzymhistochemie. Schweiz Arch. Tierh., 136, 366-376.
- Harleman J. H., Meyer R. C. (1984): Life cycle of *Isoospora suis* in gnotobiotic and conventionalized piglets. Vet. Parasitol., 17, 27-39.
- Harleman J. H., Meyer R. C. (1985): Pathogenicity of *Isoospora suis* in gnotobiotic and conventionalised piglets. Vet. Rec., 116, 561-565.
- Henriksen S. A., Christensen J. P. B. (1992): Demonstration of *Isoospora suis* oocysts in faecal samples. Vet. Rec., 131, 443-444.
- Jarvinen J. A., Zimmerman G. L., Schons D. J., Guenther C. (1988): Serum proteins of neonatal pigs orally inoculated with *Isoospora suis* oocysts. Am. J. Vet. Res., 49, 380-385.
- Koudela B., Kučerová Š. (1999): Role of acquired immunity and natural age resistance in the course of *Isoospora suis* coccidiosis in nursing piglets. Vet. Parasitol., 82, 93-99.
- Koudela B., Vitovec J. (1998): Diagnosis of neonatal porcine coccidiosis (in Czech). Veterinářství, 48, 470-471.
- Koudela B., Vitovec J., Šonková J., Vobrová D. (1986): Coccidiosis in suckling piglets raised on large farms (in Czech). Vet. Med. (Praha), 31, 725-732.
- Koudela B., Vodstrčilová M., Klimeš B., Vladík P., Vitovec J. (1991): Use of the anticoccidial agent, toltrazuril (Baycox, Bayer) in coccidiosis in suckling pigs (in Czech). Vet. Med. (Praha), 36, 657-663.
- Kudweis M., Lojda Z., Vitovec J., Koudela B., Štěrba J. (1989a): The ratio of enterocytes and goblet cells in the mucosa of the small intestine in experimental infection of piglets with the coccidium *Isoospora suis* (in Czech). Vet. Med. (Praha), 34, 33-38.
- Kudweis M., Lojda Z., Vitovec J., Koudela B., Štěrba J. (1989b): Alkaline phosphatase activity levels during infection with the coccidia *Isoospora suis* in piglets (in Czech). Vet. Med. (Praha), 34, 157-162.
- Kudweis M., Lojda Z., Vitovec J., Koudela B. (1989c): Activity of selected dehydrogenases and monoamine oxidases in the small intestine of gnotobiotic piglets infected with the coccidium *Isoospora suis* (in Czech). Vet. Med. (Praha), 34, 287-296.
- Kudweis M., Lojda Z., Vitovec J., Koudela B. (1989d): Mucus synthesis in the goblet cells of the small intestine in experimental infection with the coccidium *Isoospora suis* in piglets (in Czech). Vet. Med. (Praha), 34, 417-425.
- Kudweis M., Lojda Z., Vitovec J., Koudela B. (1990a): Activity of mucosubstances and the goblet cell count in the large intestine of piglets infected with the coccidium *Isoospora suis* (in Czech). Vet. Med. (Praha), 35, 21-29.
- Kudweis M., Juliš I., Lojda Z., Vitovec J., Koudela B. (1990b): Morphometric analysis of the activity of alkaline phosphatase in the small intestine of piglets infected with the coccidium *Isoospora suis* (in Czech). Vet. Med. (Praha), 35, 217-229.
- Kudweis M., Lojda Z., Juliš I., Vitovec J., Koudela B. (1990c): Alkaline phosphatase activity in goblet cells in the small intestine of piglets experimentally infected with the coccidium *Isoospora suis* (in Czech). Vet. Med. (Praha), 35, 275-284.

- Kudweis M., Juliš I., Lojda Z., Vítovec J., Koudela B. (1990d): Density of selected enzymes in the goblet cells of the small intestine in piglets experimentally infected with the coccidium *Isoospora suis* (in Czech). *Vet. Med. (Praha)*, **35**, 337–348.
- Kudweis M., Juliš I., Lojda Z., Vítovec J., Koudela B. (1990e): Densitometric analysis of aminopeptidase M activity in small intestine mucosa in piglets experimentally infected with *Isoospora suis* (in Czech). *Vet. Med. (Praha)*, **35**, 679–694.
- Larsen K. (1996): *Isoospora suis*. Porcine neonatal coccidiosis. *Dan. Vet. J.*, **79**, 387–392.
- Larson L. A., Schwartz K. J. (1987): Differential diagnosis of baby pig diarrhea. Iowa State University Veterinarian, **49**, 84–91.
- Lindsay D. S., Blagburn B. L. (1987): Development of *Isoospora suis* from pigs in primary porcine nad bovine cell cultures. *Vet. Parasitol.*, **24**, 301–304.
- Lindsay D. S., Blagburn B. L. (1994): Biology of mammalian *Isoospora*. *Parasitol. Today*, **10**, 214–220.
- Lindsay D. S., Current W. L. (1984): Complete development of *Isoospora suis* of swine in chicken embryos. *J. Protozool.*, **31**, 152–155.
- Lindsay D. S., Stuart B. P., Wheat B. E., Ernst J. V. (1980): Endogenous development of the swine coccidium, *Isoospora suis* Biester 1934. *J. Parasitol.*, **66**, 771–779.
- Lindsay D. S., Current W. L., Ernst J. V. (1982): Sporogony of *Isoospora suis* Biester, 1934 of swine. *J. Parasitol.*, **68**, 861–865.
- Lindsay D. S., Current W. L., Ernst J. V. (1983a): Excystation of *Isoospora suis* Biester, 1934 of swine. *Z. Parasitenkde.*, **69**, 27–34.
- Lindsay D. S., Current W. L., Ernst J. V., Stuart B. P. (1983b): Diagnosis of neonatal porcine coccidiosis caused by *Isoospora suis*. *Vet. Med/Small Anim. Pract.*, **78**, 89–95.
- Lindsay D. S., Ernst J. V., Current W. L., Stuart B. P., Steward T. B. (1984): Prevalence of oocysts of *Isoospora suis* and *Eimeria* spp. from sows on farms with and without a history of neonatal coccidiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **185**, 419–421.
- Lindsay D. S., Current W. L., Taylor J. R. (1985): Effects of experimentally induced *Isoospora suis* infection on morbidity, mortality, and weight gains in nursing pigs. *Am. J. Vet. Res.*, **46**, 1511–1512.
- Lindsay D. S., Quick D. P., Steger A. M., Toivio-Kinnucan M. A., Blagburn B. L. (1998): Complete development of the porcine coccidium *Isoospora suis* Biester, 1934 in cell cultures. *J. Parasitol.*, **84**, 635–637.
- Lukešová D., Žižlavský M., Drábek J. (1997): Parasitoses in pigs – economic importance and possibilities of treatment (in Czech). *Náš chov*, **57**, 48–52.
- Mandsen P., Henriksen S. A., Rønn N. E. (1990): Efficacy of Deccox on *Isoospora suis* coccidiosis in piglets. A pilot study. In: Proc. 11th IPSV Congr., Lausanne, Switzerland, 327.
- Männer K., Matuschka F. R., Seehawer J. (1981): Einfluss einer Monoinfektion mit *Isoospora suis* und ihre Behandlung mit Halofuginon und Lasalocid auf die Aufzuchtleistungen, Verdauungskoeffizienten und die stoffliche Zusammensetzung der Ganztierkörper frühabsetzter Ferkel. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, **94**, 25–33.
- Martineau G. P., MÉRARD J., Carabin H., Villeneuve A., Dumas G. (1994): Strategic control of porcine coccidiosis with toltrazuril. In: Proc. 13th IPSV Congr., Bangkok, Thailand, 243.
- Matuschka F. R. (1982): Ultrastructural evidence of endodyogeny in *Isoospora suis* from pigs. *Z. Parasitenkde.*, **67**, 27–30.
- Matuschka F. R., Männer K. (1981): The development of weaned piglets experimentally infected with *Isoospora suis* as a model for the effect of lasalocid and halofuginone on coccidia. *Zbl. Bakt., R. A.* **248**, 565–574.
- Meyer C., Daugschies A. (1998): Untersuchungen zum Vorkommen von *Isoospora suis* in grösseren Ferkelerzeugerbetriebe und spezialisierten Ferkelaufzuchtbetriebe. In: 18. Parasitologische Tagung DPG, 24., 28. März 1998, Dresden, 83.
- Nilsson O. (1988): *Isoospora suis* in pigs with post weaning diarrhoea. *Vet. Rec.*, **122**, 310–311.
- Nilsson O., Martinsson K., Persson E. (1984): Epidemiology of porcine neonatal steatorrhoea in Sweden. I. Prevalence and clinical significance of coccidial and rotaviral infections. *Nord. Vet. Med.*, **36**, 103–110.
- O'Callaghan M. G., Langston P. G. (1990): Internal parasites from pigs in South Australia. *Aust. Vet. J.*, **67**, 416.
- O'Neill P. A., Parfitt I. W. (1976): Observations on *Isoospora suis* infection in a minimal disease pig herd. *Vet. Rec.*, **9**, 321–323.
- Otten A., Takla M., Daugschies A., Rommel M. (1996): The epizootology and pathogenic significance of infections with *Isoospora suis* in ten piglet production operations in Nordrhein-Westfalen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, **109**, 220–223.
- Pickney R. D., Lindsay D. S., Toivio-Kinnucan M. A., Blagburn B. L. (1993): Ultrastructure of *Isoospora suis* during excystation and attempts to demonstrate extraintestinal stages in mice. *Vet. Parasitol.*, **47**, 255–233.
- Rajković-Janje R., Bosnae S., Stepiae S., Nemet A. (1998): *Isoospora suis* and *Cryptosporidium* spp. in piglets. In: Proc. 15th IPSV Congr., Birmingham, England, 251.
- Roberts L., Walker E. J. (1982): Field study of coccidial and rotaviral diarrhoea in unweaned piglets. *Vet. Rec.*, **110**, 11–13.
- Robinson Y., Morin M., Higgins R. (1983): Experimental transmission of intestinal coccidiosis to piglets: clinical, parasitological and pathological findings. *Can. J. Comp. Med.*, **47**, 401–407.
- Roepstorff A., Nilsson O., Oksanen A., Gjerde B., Richter S. H., Örtenberg E., Christensson D., Martinsson K. B., Bartlett P. C., Nansen P., Eriksen L., Helle O., Nikander S., Larsen K. (1998): Intestinal parasites in swine in the Nordic countries: prevalence and geographical distribution. *Vet. Parasitol.*, **76**, 305–319.
- Sanford S. E. (1983): Porcine neonatal coccidiosis: clinical, pathological, epidemiological, and diagnostic features. *Calif. Veter.*, **37**, 26–30.
- Sangster L. T., Seibod H. R., Mitchell F. E. (1976): Coccidial infection in suckling pigs. *Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.*, **19**, 51–55.
- Sayd S. M., Kawazoe U. (1996): Prevalence of porcine neonatal isosporosis in Brazil. *Vet. Parasitol.*, **67**, 169–174.

- Stuart B. P., Lindsay D. S. (1986): Coccidiosis in swine. In: Herd R., Gibbs H. C., Murrell K. D. (eds.): *The Veterinary Clinics of the North America Food Animal Practice*. Philadelphia, PA, W. B. Saunders. Vol. 2. 455–468.
- Stuart B. P., Lindsay D. S., Ernst J. V., Gosser H. S. (1980): *Isoospora suis* enteritis in piglets. *Vet. Pathol.*, 17, 84–93.
- Stuart B. F., Beddell D. M., Lindsay D. S. (1981): Coccidiosis in swine: effect of disinfectants on *in vitro* sporulation of *Isoospora suis* oocysts. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, 76, 1185–1186.
- Stuart B. P., Beddell D. M., Lindsay D. S. (1982a): Coccidiosis in swine: a search for extraintestinal stages of *Isoospora suis*. *Vet. Rec.*, 110, 82–83.
- Stuart B. P., Gosser H. S., Allen C. B., Beddell D. M. (1982b): Coccidiosis in swine: dose and age response to *Isoospora suis*. *Can. J. Comp. Med.*, 46, 317–320.
- Stuart B. P., Sisk D. B., Bedell D. M., Gosser H. S. (1982c): Demonstration of immunity against *Isoospora suis* in swine. *Vet. Parasitol.*, 9, 185–191.
- Tubbs R. C. (1987): Controlling coccidiosis in neonatal pigs. *Vet. Med/Food. Anim. Pract.*, 6, 646–650.
- Vítovec J., Koudela B. (1987): Pathology of natural isosporosis in nursing piglets. *Folia Parasitol.*, 34, 199–204.
- Vítovec J., Koudela B. (1990): Double alteration of the small intestine in conventional and gnotobiotic piglets experimentally infected with the coccidium *Isoospora suis* (Apicomplexa: Eimeriidae). *Folia Parasitol.*, 37, 21–33.
- Vítovec J., Koudela B., Kudweis M., Štěpánek J., Šmíd B., Dvořák R. (1991): Pathogenesis of experimental combined infections with *Isoospora suis* and rotavirus in conventional and gnotobiotic piglets. *Zbl. Vet.–Med., Ř. B.*, 38, 215–226.
- Welter M. V., Quick D. P., Steger A. M., Welter L. M. (1996): Vaccine potential of a plasmid encoding for the sporozoite attachment protein of *Isoospora suis*. In: *Proc. 14th IPSV Congr., Bologna, Italy*, 349.
- Youn H. J., Hong K. O., Noh J. W., Kim B. G., Yeh J. G., Han B. W. (1996): Efficacy of Baycoxin on *Isoospora suis* in piglets in Korea. In: *Proc. 14th IPSV Congr., Bologna, Italy*, 366.

Received: 98–11–24

Accepted after corrections: 99–02–15

Kontakní adresa:

MVDr. Břetislav Koudela, CSc., Parazitologický ústav AV ČR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Česká republika
Tel. +420 38 777 54 08, fax +420 38 477 43, e-mail: koudela@paru.cas.cz

ÚSTŘEDNÍ ZEMĚDĚLSKÁ A LESNICKÁ KNIHOVNA, PRAHA 2, SLEZSKÁ 7

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

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

V oblasti mezinárodní výměny publikací knihovna spolupracuje s 800 partnery ze 45 zemí světa. Knihovna je členem IAALD – mezinárodní asociace zemědělských knihovníků. Od září 1991 je členem mezinárodní sítě zemědělských knihoven AGLINET a od 1. 1. 1994 je depozitní knihovnou materiálů FAO pro Českou republiku.

Knihovna poskytuje svým uživatelům následující služby:

Výpůjční služby

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

Reprografické služby

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

Služby z automatizovaného systému firemní literatury

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

Referenční služby

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

Půjčování videokazet

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

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

Adresa knihovny:

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna
Slezská 7
120 56 Praha 2

Výpůjční doba:

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

Telefonické informace:

vedoucí:	24 25 50 74, e-mail: IHOCH@uzpi.agrec.cz
referenční služby:	24 25 79 39/linka 520
časopisy:	24 25 66 10
výpůjční služby:	24 25 79 39/linka 415
meziknihovní výpůjční služby:	24 25 79 39/linka 304
fax:	24 25 39 38
e-mail:	ÚZLK@uzpi.agrec.cz

POKYNY PRO AUTORY

Časopis uveřejňuje původní vědecké práce, krátká sdělení a výběrově i přehledné referáty, tzn. práce, jejichž podkladem je studium literatury a které shrnují nejnovější poznatky v dané oblasti. Práce jsou uveřejňovány v češtině, slovenštině nebo angličtině. Rukopisy musí být doplněny krátkým a rozšířeným souhrnem. Časopis zveřejňuje i názory, postřehy a připomínky čtenářů ve formě kurzívy, glosy, dopisu redakci, diskusního příspěvku, kritiky zásadního článku apod., ale i zkušenosti z cest do zahraničí, z porad a konferencí.

Autoři jsou plně odpovědní za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. K práci musí být přiloženo prohlášení o tom, že práce nebyla publikována jinde.

O uveřejnění práce rozhoduje redakční rada časopisu, a to se zřetelem k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu a kvalitě práce. Redakce přijímá práce imprimované vedoucím pracoviště nebo práce s prohlášením všech autorů, že se zveřejněním souhlasí.

Rozsah původních prací nemá přesáhnout 10 stran psaných na stroji včetně tabulek, obrázků a grafů. V práci je nutné používat jednotky odpovídající soustavě měrových jednotek SI.

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 potřebnou 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 informace, proč byla práce provedena.

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

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

Diskuse obsahuje zhodnocení práce, diskutuje se o možných 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 PŠČ, číslo telefonu a faxu, popř. e-mail.

Úplné znění pokynů pro autory s dodatky najdete na URL adrese <http://www.clark.cz/vri/Pokyny.htm>

For full text of instruction for authors see <http://www.clark.cz/vri/Pokyny.htm>

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 44, No. 6, June 1999

CONTENTS

Bardoň J.: Evaluation of the pathogenicity of strains of <i>Plesiomonas shigelloides</i> isolated in animals (in English)	161
Rodák L., Valíček L., Šmíd B., Nevoránková Z.: Detection of porcine epidemic diarrhea virus by a monoclonal antibody immunoperoxidase test (in English).....	165
Elgerwi A., Pisl J., Bíreš J., Kliková K.: The influence of industrial intoxication with copper on selected parameters of cellular immunity in sheep (in English).....	171
Trávníček J., Kroupová V., Kratochvíl P., Krabačová I.: The effect of superfluous iodine intake and strumigenic factors on histometric parameters of thyroid gland in layers.....	177
REVIEW ARTICLE	
Koudela B.: Porcine neonatal coccidiosis	183

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 44, č. 6, Červen 1999

OBSAH

Bardoň J.: Hodnocení patogenity kmenů <i>Plesiomonas shigelloides</i> izolovaných ze zvířat	161
Rodák L., Valíček L., Šmíd B., Nevoránková Z.: Detekce viru prasečí epizootické diarrhey pomocí imunoperoxidázového testu s využitím monoklonální protilátky	165
Elgerwi A., Pisl J., Bíreš J., Kliková K.: Vplyv priemyselnej intoxikácie meďou na vybrané parametre bunkovej imunity u oviec	171
Trávníček J., Kroupová V., Kratochvíl P., Krabačová I.: Vliv nadbytečného příjmu jodu a strumigenních faktorů na histometrické parametry štítné žlázy nosnic	177
PŘEHLED	
Koudela B.: Kokcidióza sajících selat	183

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, e-mail: edit@uzpi.cz ● Sazba: Studio DOMINO – ing. Jakub Černý, Plzeňská 145, 266 01 Beroun, tel.: 0311/229 59 ● Tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1999

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