

VETERINÁRNÍ UNIVERZITA BRNO

---

FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ  
FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE

KONFERENCE  
INTERNÍ GRANTOVÉ AGENTURY

konané dne 11. prosince 2024

SBORNÍK

---

BRNO 2024

# *Konference Interní grantové agentury VETUNI 2024*

Fakulta veterinárního lékařství

Fakulta veterinární hygieny a ekologie

## **SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ**

z výsledků řešení projektů IGA VETUNI 2024 financovaných z prostředků účelové podpory  
na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT na rok 2024

Editovali:

prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D.

prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.

doc. MVDr. Miša Škorič, Ph.D.

prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D., Dipl. ECZM

doc. MVDr. Josef Kameník, CSc., MBA

Za věcnou a jazykovou správnost odpovídají autoři

Vydání první

Veterinární univerzita Brno 2024

**ISBN 978-80-7305-974-3**

Vážené kolegyně a kolegové, studentky a studenti,

Veterinární univerzita Brno prostřednictvím Interní grantové agentury univerzity (IGA VETUNI) poskytuje účelovou podporu na projekty výzkumu prováděné studenty při uskutečňování akreditovaných doktorských nebo magisterských studijních programů, který je bezprostředně spojen s jejich vzděláváním. V roce 2024, kdy si připomínáme 105. výročí zahájení výuky na univerzitě, bylo na úrovni univerzity finančně podpořeno a řešeno celkem 23 studentských projektů, které uspěly v soutěži o účelovou podporu na specifický vysokoškolský výzkum na univerzitě zaměřený na aktuální problémy ve veterinárním lékařství, veterinární hygieně a ekologii, bezpečnosti a kvalitě potravin, ochraně a welfare zvířat nebo v gastronomii.

Sborník obsahuje příspěvky zpracované řešiteli projektů pro účely prezentace na konferenci a obhajoby svých projektů, a představuje tedy výsledky výzkumu studentů VETUNI financovaného z prostředků účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT na rok 2024. Zapojení studentů do vědy a výzkumu v rámci jejich vzdělávání na univerzitě je předpokladem rozvoje veterinárních poznatků a veterinárního vzdělávání i v budoucích letech.

Děkuji řešitelským týmům, členům komise IGA VETUNI, oponentům a všem dalším pracovníkům, kteří se podíleli na zajištění letošního ročníku IGA VETUNI, za odvedenou práci.

prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D.  
předsedkyně komise IGA VETUNI

## OBSAH

### **Příspěvky FVL**

Hodnocení vybraných markerů zánětu v peritoneálních efuzích u koní .....	2
Chondrogenní potenciál inhibitorů kaspázy-1.....	6
Výskyt protilátek proti RHDV a RHDV2 u králíků a lokalizace imunogenních epitopů v rámci proteinu VP60.....	10
Séroprevalence SARS-CoV-2 protilátek u psů a koček.....	13
Detekce eDNA <i>Angiostrongylus cantonensis</i> jako nástroj pro screening bezpečnosti potravin a vody .....	17
Využití síťovací techniky pro genotypizaci metastrongylidních hlístic u volně žijících vlků obecných se zaměřením na detekci.....	21
Monitoring mikrobiální kontaminace dělohy a jeho vliv na zabřeznutí v poporodním období u klisen.....	26
Rekurentní laryngeální neuropatie, porovnání terapeutických přístupů.....	30
Vliv medetomidinu s vatinoxanem na nitrooční tlak a velikost zornice u psů.....	35
Diagnostika pneumotoraxu metodou RATTUS (Rat thoracic ultrasound) u potkanů chovaných ze záliby.....	39
Využití parenterální aplikace karboxymaltózy železa v prevenci anémie z nedostatku železa u sajících selat .....	45

## Příspěvky FVHE

Vzorce chování orlů mořských v souvislosti s onemocněním Pinching Off Syndrome.....	50
Využití kávového logru při výrobě biologicky rozložitelných brček.....	54
Vplyv génov pre metabolizmus na globálny úspech ExPEC kmeňov v koncepte jedného zdravia.. ..	58
Ko-evoluce bakteriálních patogenů a plazmidů s využitím metody CRISPR-Cas9.....	62
<i>Escherichia coli</i> ST131 virotyp E: komplexní genomická analýza vysoce klonální multirezistentní linie a jejího šíření v prostředí.....	66
Mikrobiální kvalita a další vybrané charakteristiky výrobků jerky na českém trhu.....	70
Herpesviry obojživelníků v Česku a okolních zemích.....	74
Využití <i>in vivo</i> a <i>in vitro</i> testů pro posouzení účinků azolových fungicidů a antimykotik na organismy vodního prostředí.....	77
Vliv perorálního příjmu bisfenolu AF na změny vybraných biomarkerů endokrinní disrupce u diploidních a triploidních jedinců dáňáka pruhozaného ( <i>Danio rerio</i> ).....	81
Transkontinentální prenos enterobaktérií rezistentných k meropenemu prostredníctvom haje tmavej.. ..	85
Gastrointestinální trakt drůbeže jako rezervoár antibiotické rezistence - sekvenování s dlouhým čtením pro studium rezistomu a plazmidomu.....	89
Prevalence filariální infekce v krvi a ektoparazitech netopýrů.....	93

## **Příspěvky**

**Fakulty veterinárního lékařství**

## **Hodnocení vybraných markerů zánětu v peritoneálních efuzích u koní**

Pavla Hamouzová<sup>1</sup>, Kateřina Voříšková<sup>1</sup>, Markéta Jeřábková<sup>2</sup>, Vít Hanzlíček<sup>1</sup>

*Ústav fyziologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno<sup>1</sup>,*

*Klinika chorob koní, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno<sup>2</sup>*

### **Úvod**

U kolikových pacientů má koncentrace matrixové metaloproteinázy 9 (MMP-9) v peritoneální tekutině významný vliv na dosaženou hodnotu ve skórovacím systému sepse (1). Významně vyšší koncentrace MMP-9 byla zjištěna v exsudátech oproti transudátům, navíc její hodnota pozitivně korelovala s běžně používanými parametry pro určení typu efuze (2). Významně vyšší koncentrace MMP-9 byla zjištěna u koní, u kterých muselo být přistoupeno k eutanázii (2). Do uvedené studie (2) však bylo zařazeno pouze 17 koní, je proto nezbytné provést navazující studii s vyšším počtem zahrnutých jedinců.

Sérový amyloid A (SAA) je u koní nejvýznamnějším pozitivním reaktantem akutní fáze. Koncentrace SAA v peritoneální tekutině vzrůstá rychleji u pacientů se strangulačními lézemi (3). Výsledky týkající se hodnoty SAA u kolikových pacientů jako ukazatele přežitelnosti jsou v různých studiích protichůdné (3, 4). U kolikových pacientů s vyšší koncentrací SAA při příjmu se častěji vyskytují zánětlivá onemocnění, jako je enteritida či kolitida (3). U člověka lze ve sporných případech koncentraci SAA v efuzi použít k odlišení transudátu od exsudátu (5).

Cílem bylo posoudit koncentraci SAA a MMP-9 v peritoneálních efuzích u koní ve vztahu k typu efuze, jednotlivým parametrům (počet buněk, koncentrace celkové bílkoviny a laktátu, aktivita laktátdehydrogenázy) a charakteru a průběhu onemocnění.

### **Materiál a metodika**

#### **Vzorky**

K analýze bylo využito zbytkové množství ze 68 efuzí stabilizovaných EDTA z rutinních diagnostických vyšetření prováděných Klinikou laboratoří pro malá zvířata FVL VETUNI za účelem diagnostiky. Věkové zastoupení bylo  $10,3 \pm 6,56$  let (průměr ± směrodatná odchylka), medián 10,5 roku. Bylo vyšetřeno 33 vzorků od klisen, 25 od valachů a 10 od hřebců. Studie zahrnovala vzorky od 37 teplokrevníků, 9 plnokrevníků, 12 ponyů, 2 chladnokrevníků, 2 amerických honáckých koní, 1 araba, 1 hispano, 1 lipicána, 1 starokladrubskeho koně, 1 friského koně a 1 appaloosy.

## Klasifikace efuzí

Analyzováno bylo 68 vzorků efuzí, které se na základě celkového počtu jaderných buněk (Hematology Analyzer Sysmex XN-1000) a koncentrace celkové bílkoviny (Architect c4000, Abbott Laboratories) klasifikovaly jako septický exsudát, aseptický exsudát či transudát. Biochemické vyšetření (stanovení laktátdehydrogenázy a laktátu) bylo provedeno analyzátozem Architect c4000 (Abbott Laboratories). Hodnocení charakteru a průběhu onemocnění bylo prováděno na Klinice chorob koní (1. koliky bez strangulačních lézí, 2. koliky se strangulačními lézemi, 3. zánětlivé procesy gastrointestinálního traktu, 4. peritonitida, 5. podezření na peritonitidu, které bylo vyloučeno, 6. neoplazie).

## ELISA

Ve vzorcích byly metodou ELISA stanoveny koncentrace SAA (Livestock SAA ELISA Kit, Tridelta Development Ltd.; BioTek EL808 Microplate Reader; Gen5™ software, BioTek) a koncentrace MMP-9 (Equine MMP-9 ELISA Kit, RayBiotech; BioTek EL808 Microplate Reader; Gen5™ 3.15 software, BioTek). Bylo postupováno podle návodů dodaných výrobcem ELISA kitů.

## Statistika

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny v programu MedCalc statistical software. Byly porovnány výsledky v rámci jednotlivých typů efuze a dále ve skupinách podle charakteru a průběhu onemocnění.

## Výsledky

Koncentrace MMP-9 i SAA v exsudátech byla významně vyšší než v transudátech ( $P < 0,01$ ). Korelace mezi koncentracemi SAA a MMP-9 nebyla zjištěna ani v exsudátech ( $r = -0,0112$ ,  $P > 0,05$ ), ani v transudátech ( $r = -0,0446$ ,  $P > 0,05$ ).

Velmi silná pozitivní korelace byla zjištěna mezi koncentrací MMP-9 a celkovým počtem jaderných buněk ( $r = 0,8040$ ,  $P < 0,01$ ), silná pozitivní korelace mezi koncentrací MMP-9 a laktátu ( $r = 0,6709$ ,  $P < 0,01$ ) a mezi koncentrací MMP-9 a aktivitou LDH ( $r = 0,6306$ ,  $P < 0,01$ ), střední pozitivní korelace mezi koncentrací SAA a celkovým počtem jaderných buněk ( $r = 0,5643$ ,  $P < 0,01$ ) a mezi koncentrací MMP-9 a celkové bílkoviny ( $r = 0,5292$ ,  $P < 0,01$ ) a slabá pozitivní korelace mezi koncentrací SAA a aktivitou LDH ( $r = 0,3903$ ,  $P < 0,01$ ) a mezi koncentrací SAA a celkové bílkoviny ( $r = 0,3161$ ,  $P < 0,05$ ). Koncentrace MMP-9 i SAA tedy korelovaly s běžně hodnocenými parametry.

Významně vyšší koncentrace MMP-9 byla zjištěna u peritonitid než u kolik s nestrangulačními lézemi ( $P < 0,01$ ), u kolik se strangulačními lézemi než u kolik s nestrangulačními lézemi ( $P < 0,01$ ), u peritonitid než u zánětlivých procesů GIT ( $P < 0,01$ ), u peritonitid než u podezření



na peritonitidu, které bylo vyloučeno ( $P<0,01$ ), u peritonitid než u kolik se strangulačními lézemi ( $P<0,01$ ) a u peritonitid než u neoplastických efuzí ( $P<0,01$ ).

Významně vyšší koncentrace SAA byla zjištěna u zánětlivých procesů GIT než u kolik s nestrangulačními lézemi ( $P<0,01$ ), u peritonitid než u kolik s nestrangulačními lézemi ( $P<0,01$ ), u zánětlivých procesů GIT než u kolik se strangulačními lézemi ( $P<0,01$ ), u peritonitid než u podezření na peritonitidu, které bylo vyloučeno ( $P<0,01$ ), u peritonitid než u kolik se strangulačními lézemi ( $P<0,01$ ) a u peritonitid než u neoplastických efuzí ( $P<0,05$ ).

Signifikantně vyšší koncentrace MMP-9 i SAA byla zjištěna u koní, u nichž muselo být přistoupeno k eutanázii, než u koní přeživších ( $P<0,05$ ).

## **Závěr**

Výsledky projektu přispívají k charakteristice využitelnosti MMP-9 a SAA v závislosti na typu efuze a charakteru onemocnění. MMP-9 i SAA se jeví jako slibné markery jak pro rozlišení exsudátu od transudátu ve sporných případech, tak pro vyloučení či potvrzení peritonitidy. Hodnocení koncentrace MMP-9, ale nikoli SAA, by mohlo napomoci k rozlišení strangulačních kolik od nestrangulačních. Cenným poznatkem je srovnatelný, či dokonce více signifikantní rozdíl v koncentracích běžně dostupných biochemických parametrů než v koncentraci MMP-9 či SAA mezi jednotlivými skupinami onemocnění. MMP-9 a SAA v některých nejednoznačných případech mohou sloužit jako další pomocné ukazatele.

## **Seznam literatury:**

- 1) BARTON, A.K., RICHTER, I.G., AHRENS, T, MERLE, R., ALALWANI, A., LILGE, S., PURSCHKE, K., BARNEWITZ, D., GEHLEN, H.: MMP-9 Concentration in peritoneal fluid is a valuable biomarker associated with endotoxemia in equine colic. *Mediators of Inflammation*. 2021, 9501478.
- 2) HAMOUZOVÁ, P., DOBEŠOVÁ, O., ŘEHÁKOVÁ, K., STEHLÍKOVÁ, Š., ČÍŽEK, P., DRÁBKOVÁ, Z., JAHN, P., DOUBEK, J.: Lymphocyte immunophenotyping and concentration of MMP-9 in transudates and exudates in horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2023, 261, 110645.
- 3) LONG, A., NOLEN-WALSTON, R.: Equine inflammatory markers in the twenty-first century: a focus on serum amyloid A. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 2020, 36, 147–160.
- 4) DANIEL, A.J., LEISE, B.S., BURGESS, B.A., MORLEY, P.S., CLONINGER, M., HASSEL, D.M.: Concentrations of serum amyloid A and plasma fibrinogen in horses undergoing emergency abdominal surgery. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2016, 26, 344–351.

5) OKINO, A.M., BÜRGER, C., CARDOSO, J.R., LAVADO, E.L., LOTUFO, P.A.,  
CAMPA, A.: The acute-phase proteins serum amyloid A and C reactive protein in transudates  
and exudates. Mediators of Inflammation. 2006, 047297.

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 103/2024/FVL.*

# Chondrogenní potenciál inhibitorů kaspázy-1

Blecha Corina<sup>1</sup>, Obrátilová Natália<sup>1</sup>, Matalová Eva<sup>1</sup>

*Ústav fyziologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno<sup>1</sup>*

## Úvod

Chondrocyty jsou exkluzivní buňky chrupavky, které diferencují z chondroblastů. Jejich zdrojem je kondenzovaný mezenchym a hlavní funkcí produkce extracelulární matrix. Ta u chrupavky sestává z řady složek, mezi nejdůležitější patří kolagen typu II a proteoglykany. Chrupavčitá pojivová tkáň je nezbytná pro ochranu kostních hlavic kloubu před mechanickým opotřebením a nežádoucí frikcí. K tomu dochází v případě osteoartrózy, která může být doprovázena zánětem (osteoartritida/OA). OA je nejčastější kloubní onemocnění se stále narůstající prevalencí jak ve veterinární, tak humánní medicíně (stárnoucí populace). Příčina OA je multifaktoriální a dosud není dostupná univerzální terapie. Léčba je směřována symptomatickou cestou, příp. chirurgickou. Regenerační medicína v této oblasti stojí před řadou výzev (Pozzuoli et al. 2024, PMID: 38357648). Jednou ze zvažovaných možností v regenerativních strategiích je aplikace inhibitorů proteáz, které jsou v OA chrupavce aktivovány a vykazují degradační efekt. To se týká zejména matrixových, ale také cysteinových proteáz (kaspáz).

Kaspázy jsou jedním z terapeutických cílů, protože jsou tradičně spojovány s apoptózou a zánětem, tedy dvěma procesy provázejícími OA (Salman et al. 2023, PMID: 36800974). Z hlediska zánětu je pro terapii OA nejatraktivnější kaspáza-1, dva z inhibitorů této kaspázy (Pralnacasan/VX-740 a Belnacasan/VX-765) již podstoupily první fáze preklinického testování. Aktuálně však vyvstává řada otázek (shrnuto v Dhani et al. 2021, PMID: 34654807), mezi které patří: Jaké jsou neapoptotické a nezánětové role kaspáz a jak přispívají k buněčným funkcím a rozvoji onemocnění? Jak může tyto procesy ovlivnit inhibice kaspáz? Jaké alternativní mechanismy mohou být aktivovány při aplikaci inhibitorů kaspáz? a posléze, jak na základě těchto znalostí můžeme optimalizovat modulace cílových kaspáz pro terapeutické využití bez negativních vedlejších efektů?

Cílem prezentovaného výzkumu bylo přispět k řešení těchto otázek, a to zhodnocením účinku inhibitorů kaspázy-1 na expresi genů vztahujících se k diferenciaci chondrocytů ve fyziologickém a „OA-like“ prostředí.

## Materiál a metodika

### Chondrogenní kultury

Mikromasové kultury chondrocytů byly získány ze základů předních končetin myši prenatalního dne E12 (standardní model chondrogenese /Underhill et al. 2014, PMID: 24482179/). Myši byly získány z chovu Masarykovy univerzity a tkáň odebírána *post mortem* (v souladu s platnou legislativou - 501/2020, resp. 246/1992 Sb.). Buňky byly kultivovány dle běžného protokolu (Saha et al. 2017, PMID: 27770257).

## Experimentální design

Mikromasy byly rozděleny do čtyř skupin: 1) kontrola, 2) IL1b („OA-like“ prostředí), 3) IL1b+Belnacasan, 4) IL1b+Pralnacasan. Kultivace probíhala 7 dní s výměnou média každý druhý den. Všechny experimenty byly provedeny ve třech biologických replikacích. Tvorba nodulů byla v průběhu kultivace hodnocena mikroskopicky, při odběru vzorků k dalším analýzám byly mikromasy obarveny a kvantifikovány pro porovnání v jednotlivých skupinách. Vzorky pro PCR Array byly odebírány do lyzačního/RTL pufru (Qiagen).

## PCR Array

Pro izolaci RNA ze vzorků byl využit RNeasy Mini Kit (Qiagen), pro přípravu cDNA pak SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific). Screening genové exprese byl proveden s pomocí Mouse Osteogenic RT2 Profiler PCR Array (Qiagen) obsahující housekeeping genes: Actb, B2m, Gapdh, Gusb, Hsp90ab1, pozitivní a negativní kontrolu. Hodnocení výsledků bylo založeno na Qiagen Gene Globe softwaru doporučovaném výrobcem (<https://geneglobe.qiagen.com/us/analyze>).

## **Výsledky**

PCR Array analýza zahrnovala 84 genů kódujících proteiny, které se uplatňují v chondrogení a osteogenní diferenciaci. Hodnocena byla jejich exprese v chondrocytech po aplikaci inhibitorů kaspázy-1 v „OA-like“ prostředí. Porovnáním exprese v inhibovaných skupinách mikromas a skupině bez inhibitorů byly identifikovány geny se zvýšenou, resp. sníženou expresí po inhibici kaspázy-1.

Top geny se signifikantní změnou exprese po inhibici kaspázy-1 jsou zvýrazněny v seznamu všech genů hodnocených v rámci Mouse Osteogenesis RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array (Qiagen, PAMM-026Z): Acvr1 (Activin a receptor, type I ), Ahsg (Alpha 2-HS Glycoprotein ), **Alpl** (Alkaline Phosphatase, Liver/Bone/Kidney), Anxa5 (Annexin A5), **Bglap (Osteocalcin)**, Bgn (Biglycan), Bmp1 (Bone Morphogenetic Protein 1), Bmp2, Bmp3, Bmp3b/Gdf10 (Growth Differentiation Factor 10 ), Bmp4, Bmp5, **Bmp6**, Bmp7, Bmpr1a (Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1A), Bmpr1b, Bmpr2, Cd36 (Thrombospondin Receptor), Cdh11 (Cadherin 11), Chrd (Chordin), Col1a1 (Collagen Type I Alpha 1 Chain), Col1a2, Col2a1, Col3a1, Col4a1, Col5a1, **Col10a1**, Col14a1, Comp (Cartilage Oligomeric Matrix Protein), Csf1/Mcsf (Colony Stimulating Factor 1/ Macrophage Colony Stimulating Factor 1), **Csf2/GM-CSF** (Colony Stimulating Factor 2), Csf3/GCSF (Colony Stimulating Factor 3), **Ctsk** (Cathepsin K), Dlx5 (Distal-Less Homeobox 5), Egf (Epidermal Growth Factor), Fgf1 (Fibroblast Growth Factor 1), Fgf2/bFGF, Fgfr1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1), Fgfr2, **Flt1** (Fms Related Tyrosine Kinase 1), Fn1 (Fibronectin 1), **Gli1** (GLI Family Zinc Finger 1 ), Igf1 (Insulin Like Growth Factor 1), Igf1r (Insulin Like Growth Factor 1 Receptor ), Ihh (Indian Hedgehog), Icam1 (Intercellular Adhesion Molecule 1), Itga2 (Integrin Subunit Alpha 2), Itga2b (Integrin Subunit Alpha 2b), Itga3, Itgam (Integrin Subunit Alpha M), Itgav (Integrin Subunit Alpha V), Itgb1 (Integrin Subunit Beta 1), Mmp2 (Matrix Metalloproteinase 2), Mmp8, **Mmp9**, **Mmp10**, Nfkb1 (Nuclear Factor Kappa B Subunit 1), Nog (Noggin), Pdgfra (Platelet Derived Growth Factor Subunit A), Phex (Phosphate Regulating Endopeptidase Homolog X-Linked), Runx2 (Runt Related Transcription Factor2), Serpinh1 (Serpin Family H Member 1), Smad1 (SMAD Family

Member 1), Smad2, Smad3, Smad4, Smad5, Sost (Sclerostin), Sox9 (SRY-Box 9), Sp7 (Osterix), **Spp1 (Osteopontin)**, Tgfb1

(Transforming Growth Factor Beta 1), Tgfb2, Tgfb3, Tgfbr1 (Transforming Growth Factor Beta Receptor 1), Tgfbr2, **Tgfbr3**, Tnf (Tumor Necrosis Factor), Tnfsf11 (TNF Superfamily Member 11), Twist1 (Twist Family BHLH Transcription Factor 1), Vcam1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1), Vdr (Vitamin D Receptor), Vegfa (Vascular Endothelial Growth Factor A), Vegfb.

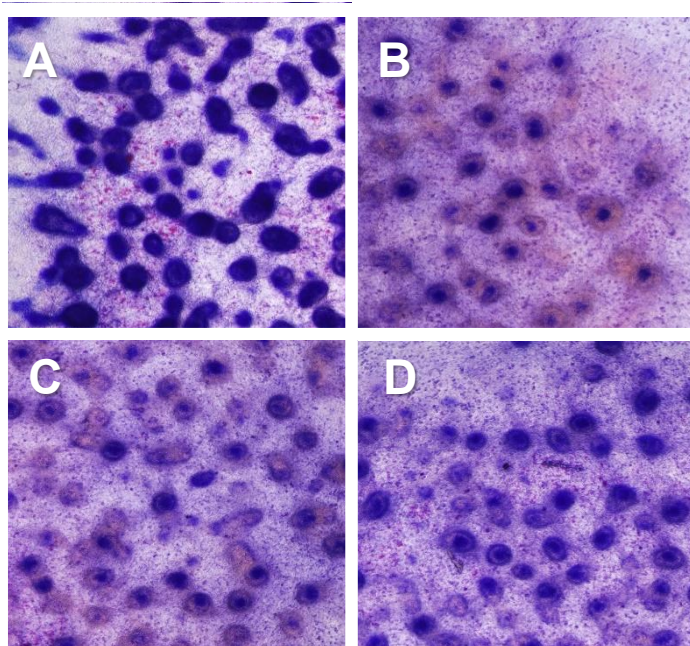
PCR Array analýza umožnila identifikaci genů, které souvisejí s chondrogenézí a osteogenezí, ale také s osteoartritidou, a jejichž exprese byla významně změněna po aplikaci inhibitoru kaspázy-1. Paralelně byly testovány dva inhibitory uvažované pro klinické aplikace, Belnacasan (VX-765) a Pralnacasan (VX-740). Oba inhibitory jsou peptidomimetické a reverzibilní, jejich účinek však není zcela shodný (Modi et al 2023, PMID: 37857145).

Po inhibici Belnacasanem (VX-765) patřily mezi top 3 geny se signifikantně zvýšenou expresí Flt1, Gli1 a Tgfbr3 (*Flt1* fold regulation: 1.94; *Gli1* fold regulation: 1.8; *Tgfbr3* fold regulation: 1.69), se signifikantně sníženou pak Mmp9, Bglap a Spp1 (*Mmp9* fold regulation: -2.94; *Bglap* fold regulation: -2.08; *Spp1* fold regulation: -1.83). Nejzajímavější rozdíl v porovnání s inhibicí Pralnacasanem se týkal genu Bglap, jehož exprese byla zaznamenána mezi geny se signifikantně zvýšenou expresí (*Bglap* fold regulation: 1.96).

Bglap je gen kódující osteokalcin, jeden z markerů maturovaných osteoblastů. Jeho exprese však byla zkoumána také během chondrogenese, u hypertrofických a OA-chondrocytů (Pullig et al. 2000, PMID: 10954778). V mikromasových kulturách byl osteokalcin lokalizován zejména v diferencovaných nodulech. Osteokalcin by tak mohl být klíčovým bodem v odlišnosti účinku VX-765 a VX-740 a vysvětlit souvislosti s morfologií nodulů po inhibici jednotlivými inhibitory (Obr. 1).

Výsledky jsou dále diskutovány v odborných pracích studentek/spoluřešitelek (Corina Blecha, Natálie Obrátilová) obhájených v říjnu 2024 na VETUNI Brno a v souvisejícím vědeckém článku (v přípravě pod názvem: Specification of caspase-1 inhibition effect of VX-765 and VX-740 on chondrocytes in inflammatory environment), který by měl být zveřejněn v příštím roce.

*Obr. 1: Morfologická analýza mikromasových kultur. Barvení alciánovou modří. Kontrola (A), „OA-like“ prostředí (B), VX-740 (C) a VX-765 (D).*



*Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 114/2024/FVL.*

# Výskyt protilátek proti RHDV a RHDV2 u králíků a lokalizace imunogenních epitopů v rámci proteinu VP60

Dobromila Molinková, Zdeněk Wetter, Miroslava Barančková, Tomáš Vrbka, Magdalena Burdová, Eliška Pospíšilíková

*Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství,*

*Veterinární univerzita Brno*

## Úvod

Mor králíků (Rabbit Hemorrhagic Disease, RHD) je aktuální onemocnění, řešené mezi chovateli i veterinárními lékaři působícími v této oblasti. Onemocnění bylo poprvé identifikováno v roce 1984 v Číně, kde způsobilo značné ekonomické ztráty (Liu et al. 1984). Jako původce onemocnění byl identifikován lagovirus RHDV (Rabbit Hemorrhagic Disease Virus) z čeledi Caliciviridae (Ohlinger et al. 1990). V roce 2010 byla ve Francii popsána nová patogenní varianta viru RHDV2 fylogeneticky vzdálená od jiných patogenních i nepatogenních lagovirů (Le Gall-Reculé et al. 2011). Cílem tohoto projektu bylo pokusit se sestavit vlastní druhově specifický test ELISA, který by umožnil zmapovat výskyt protilátek proti oběma druhům viru u králíků v ČR. Jako antigeny byly za tímto účelem vyrobeny rekombinantní proteiny VP60 obou virů a syntetické peptidy pokrývající části zmíněných proteinů.

## Materiál a metodika

V projektu byla vyšetřena krevní séra králíků (n=117) se známou vakcinační anamnézou pro výběr pozitivních a negativních séroreagentů a králíků bez známé vakcinační anamnézy (Tab. 1).

Tab. 1 Počty vyšetřených jedinců (f = samice, m = samci, x, ? = není uvedeno)

	Σ = 117			f = 20			m = 27			x = 70		
	vakcin	nevakcin	?	vakcin	nevakcin	?	vakcin	nevakcin	?	vakcin	nevakcin	?
RHDV1	31	24	62	3	15	2	4	4	19	24	5	41
RHDV2	2	53	62	2	16	2	0	8	19	0	29	41

Krevní séra zvířat byla získávána z veterinárních klinik, kde byla odebrána v rámci diagnostiky jiných onemocnění nebo v chovech jatečných králíků při porážce a vykrvení. Séra byla separována centrifugací a vzorky byly následně uskladněny při -20 °C. Část vzorků pro analýzy byla získána v rámci preventivních nebo diagnostických odběrů již v průběhu roku 2023.

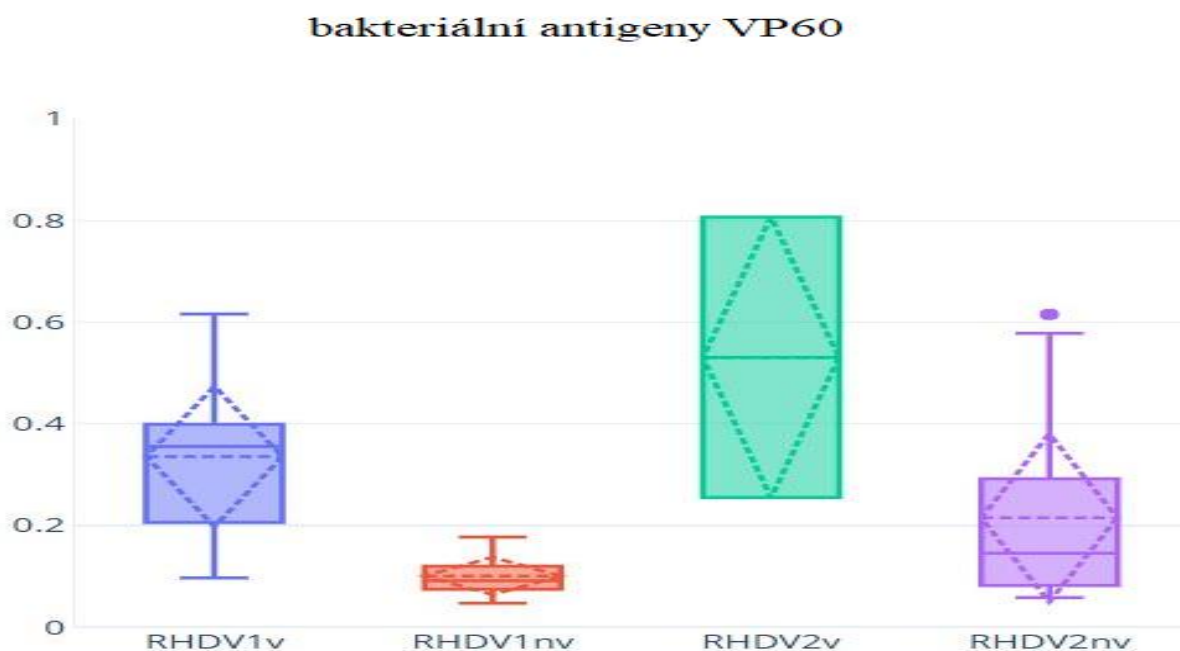
Proteiny VP60 obou variant RHDV byly vyčištěny z bakteriálních lyzátů expresních kultur *E. coli* s použitím metody Fast protein liquid chromatography (FPLC, Bio-Rad). Purifikace proběhla na základě vazby polyhistidinových řetězců na rekombinantních molekulách proteinů na Ni-NTA membránu. Následně byla s použitím proteinového standardu (10-230 kDa, NEB, USA) stanovena jejich koncentrace v jednotlivých frakcích v jamkách SDS-PAGE gelu a spektrofotometricky. Všechny vzorky sér byly vyšetřeny ELISA testy s použitím proteinu VP60 RHDV a RHDV2 jako antigenů. Pro prvotní testy byla použita koncentrace proteinu 1-

10 ug na jamku mikrotitrační destičky. Koncentrace proteinů stejně jako další kroky ELISA testů byly optimalizovány na základě průběžných výsledků.

Získaná data byla statisticky zpracována v programu Box Plot Generator (<https://chart-studio.plotly.com/create/box-plot/#/>) s cílem zhodnotit co nejpřesněji přítomnost protilátek proti RHDV a RHDV2. Byla vybrána nejvhodnější séra pro kontrolu imunogenicity dalších rekombinantních produktů, které budou v budoucnu využity pro vývoji vakcíny. ELISA testy s použitím syntetických peptidů byly použity v rámci obou VP60 ke stanovení epitopů s nejvyšší imunogenitou. Na základě výsledků byla vyhodnocena přítomnost a hladina protilátek vůči RHDV a RHDV2 u sledovaných zvířat a úloha vybraných epitopů proteinu VP60 při imunitní reakci.

## Výsledky

V grafu 1 je patrný vliv vakcinace na přítomnost protilátek detekovatelných testem ELISA, postaveným na přítomnosti antigenu VP60, který představuje kapsidový protein viru RHDV resp. RHDV2. Byla prokázána imunogenita bakteriemi exprimovaného virového proteinu, což je významným krokem pro eventuální design vakcinačního antigenu.



**Graf 1** Box-plot hodnot absorbancí naměřených u vakcinovaných a nevakcinovaných jedinců s antigenem VP60 (v = vakcinovaný, nv = nevakcinovaný)

V grafu 2 lze pozorovat nevýznamná reaktivita sér vakcinovaných i nevakcinovaných jedinců s *in silico* navrženými peptidovými antigeny. To znamená, že za imunitní reakci po infekci a vakcinaci zodpovídají jiné epitopy, než jaké představují peptidy použité v této práci.



## peptidové antigeny



**Graf 2** Box-plot hodnot absorbancí naměřených u vakcinovaných a nevakcinovaných jedinců s peptidovým antigenem (v = vakcinovaný, nv = nevakcinovaný)

### Závěr

V rámci projektu bylo vyšetřeno 117 sér králíků z území ČR na protilátky proti viru moru králíků RHDV a RHDV2. K vyšetření byly navrženy a optimalizovány testy ELISA jednak s rekombinantními a jednak s peptidovými antigeny. Testy prokázaly, že séra vakcinovaných jedinců reagují lépe s celým kapsidovým (rekombinantním) proteinem VP60, než s peptidovými antigeny. Na základě těchto výsledků budou ve spolupráci s proteomickým pracovištěm BIOCEV navrženy další peptidy, u nichž budou zkoumány imunogenní vlastnosti v navazujících projektech.

### Seznam literatury:

LIU, S. J., H. P. XUE, B. Q. PU and N. H. QIAN. A new viral disease in rabbits. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine* (Xumu yu Shouyi). 1984. 16(6), 253–255.

LE GALL-RECLÉ, G., F. ZWINGELSTEIN, S. BOUCHER, B. LE NORMAND, G. PLASSIART, Y. PORTEJOIE, A. DECORS, S. BERTAGNOLI, J.-L. GUÉRIN and S. MARCHANDEAU. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *The Veterinary Record* [online]. 2011 168(5), 137–138. ISSN 2042-7670.

OHLINGER, V. F., B. HAAS, G. MEYERS, F. WEILAND and H. J. THIEL, Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *Journal of Virology* [online]. 1990. 64(7), 3331–3336. ISSN 0022-538X.

<https://chart-studio.plotly.com/create/box-plot/#/>

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 111/2024/FVL***

# Séroprevalence SARS-CoV-2 protilátek u psů a koček

Pačíková Kristína, Jarolímová Alice

*Ústav infekčních chorob a mikrobiologie VETUNI Brno, Fakulta veterinárního lékařství,  
Veterinární univerzita Brno*

## Úvod

Viry z čeledi *Coronaviridae* jsou dobře známou skupinou patogenů ve veterinární i humánní medicíně. Koronaviry jsou obalené, jejich RNA je jednovláknitá s pozitivní polaritou (Kaczorek-Łukowska et al. 2022). Nová varianta koronaviru SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) se rozšířila po celém světě a způsobila v lednu 2020 vypuknutí globální pandemie onemocnění COVID-19, z angl. Coronavirus Disease (Weng, Su, a Wang 2021).

Od počátku pandemie již bylo hlášeno mnoho přirozených případů přenosu infekce z lidí na zvířata, včetně kočkovitých, psovitých a lasicovitých šelem, primátů, křečků aj. (World Organisation of Animal Health). Nakažení psi a kočky měli obvykle asymptomatický průběh infekce. Bylo však zaznamenáno několik málo případů infekce zvířat s klinickými projevy onemocnění, které zahrnovaly nespecifické potíže (apatie, anorexie, zvýšená tělesná teplota), postižení dýchacího systému (kašel, kýchání, výtoky z očí a nosu), anebo ve výjimečných případech také gastrointestinální problémy (zvracení, průjem) (Gaudreault et al. 2020; Giraldo-Ramirez et al. 2021; Liew et al. 2023; Natale et al. 2021; Piewbang et al. 2024). Jelikož nejčastěji chovanými zvířaty jsou psi a kočky, bylo cílem této práce zjistit výskyt protilátek proti SARS-CoV-2 ze vzorků krevních sér nebo plazmy získaných od vybraných jedinců těchto druhů domácích zvířat, kteří navštěvují Kliniku chorob psů a koček na Veterinární univerzitě Brno.

## Materiál a metodika

V rámci spolupráce s Klinikou laboratoří pro malá zvířata na Veterinární univerzitě Brno byly získány vzorky séra nebo plazmy psů a koček, které byly odebrány od září 2023 do července 2024. Vzorky byly vybrány ze vzorků původně získaných na biochemickou analýzu v rámci diagnostického postupu veterinárních lékařů z Kliniky chorob psů a koček na Veterinární univerzitě Brno. Zpětným vyhodnocením anamnestických a klinických údajů byli nalezeni 4 psi a 3 kočky s klinickými příznaky respiračního onemocnění v době odběru vzorku krve a jejichž vzorky byly zahrnuty do této práce. Informace o stavu onemocnění COVID-19 v domácnostech, odkud psi a kočky pocházeli, nebyla k dispozici.

Celkový počet 283 vzorků psů a 118 vzorků koček byl vyšetřen metodou Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) s využitím komerčního kitu ID Screen® SARS-CoV-2 Double Antigen Multi-species od firmy Innovative Diagnostics s měřením absorpance 450 nm. Vybraný ELISA test detekuje protilátky proti hlavnímu nukleokapsidovému proteinu (N protein). Pozitivně označené vzorky byly následně přetestovány virus neutralizačním testem (VNT) na Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně, v. v. i.

## Výsledky

Z celkového počtu 283 vzorků psů a 118 vzorků koček vyšetřených vzorků metodou ELISA bylo nalezeno 6,01 % (17/283) psů a 6,78 % (8/118) koček se specifickými protilátkami proti N proteinu viru SARS-CoV-2. Pozitivní výsledek ELISA testu měl také jeden pes a jedno kočka s respiračními příznaky v době odběru krve. Zpětným zhodnocení klinických a anamnestických údajů všech pozitivně otestovaných zvířat nebylo nalezeno žádné zvíře vykazující gastrointestinální příznaky nebo byly tyto příznaky přiřazeny k jiné diagnóze. Vzorky označeny metodou ELISA jako pozitivní nebo dubiózní byly přetestovány VNT a v 5 vzorcích psů a 4 vzorcích koček byly nalezeny virus neutralizační protilátky s titrem 1:40, 1:80 a  $\geq$  1:160.

## Závěr

Výsledky výskytu protilátek v naší studii jsou obdobné, jako ve studiích prováděných v jiných státech a v rámci kterých byl použit stejný komerční ELISA kit. Ve Francii, kde bylo identifikováno 4,8 % pozitivních psů (22/453 kusů) (Laidoudi et al. 2021). Oproti tomu v Thajsku bylo pozitivně označeno pouze 1,66 % (35/2102) psů a 0,36 % (4/1113) koček (Udom et al. 2022), Ve Spojených státech amerických, kde bylo jako pozitivní označeno 0,37 % (5/1336) psů a 1,15 % (11/956) koček (Barua et al. 2021) a v Polsku, kde byla u psů zjištěna séroprevalence 1,17 % (4/343) a 1,76 % (5/279) u koček (Pomorska-Mól et al. 2021). Nižší zaznamenaný výskyt protilátek v Thajsku, Spojených státech amerických a v Polsku je zřejmě z důvodu většího počtu testovaných zvířat. Rozdílné prevalence protilátek mohou být dané různými metodikami odběrů a velikostí a složením vyšetřovaných populací psů a koček a dále také datem prováděné studie.

Jelikož je molekula N proteinu relativně konzervovanou molekulou mezi koronaviry, nesoulad mezi nálezy ELISA testu detekujícího protilátky proti N proteinu a VNT by mohl být způsoben zkříženou reakcí mezi N proteinem SARS-CoV-2 a jinými endemickými koronaviry psů nebo koček (Jarrah et al. 2023). Křížová reakce u vybraného ELISA kitu však byla v několika studiích vyvrácena (Udom et al. 2022; Ratti et al. 2022; Pomorska-Mól et al. 2021).

Protilátky nalezeny u zvířata vykazujících v době odběru klinické příznaky respiračního onemocnění naznačují, že by virus SARS-CoV-2 mohl být novým infekčním patogenem způsobující u těchto druhů zvířat onemocnění s respiračními příznaky. Výsledky jsou však značně omezeny množstvím testovaných vzorků od zvířat s diagnostikovanými klinickými příznaky a také relativně brzkým odběrem vzorků po předpokládané infekci bez dosavadního vytvoření specifických protilátek.

**Tabulka č. 1 – Pozitivně otestované vzorky pomocí metod ELISA a VNT**

	Č	Pohlaví	Datum narození	Věk*	Plemeno	Datum odběru vzorku	ELISA S/P %	VNT	Klinické příznaky
<b>PSI</b>	1	F	15.09.2012	10	bígl	11.09.2023	156,5	negativní	žádné
	2	M	23.03.2021	2	německý ovčák	20.10.2023	80,8	negativní	žádné
	3	F	01.01.2010	13	americký stafordširský teriér	27.10.2023	259,6	negativní	žádné
	4	F	30.04.2016	7	jorkširský teriér	30.10.2023	371,8	≥ 1:160	žádné
	5	M	02.08.2014	9	leonberger	03.11.2023	192,7	negativní	žádné
	6	M	01.01.2015	8	výmarský ohař	03.11.2023	851,0	1:40	žádné
	7	M	01.01.2013	11	kříženec	24.01.2024	205,9	negativní	žádné
	8	F	01.08.2018	5	bílý švýcarský ovčák	30.01.2024	307,6	negativní	žádné
	9	M	24.05.2015	8	bílý švýcarský ovčák	09.02.2024	307,6	negativní	žádné
	10	F	27.03.2012	11	labrador	07.03.2024	232,8	negativní	žádné
	11	M	18.03.2020	4	miniaturní americký ovčák	10.04.2024	61,1	1:80	žádné
	12	M	19.09.2015	8	belgický ovčák	19.04.2024	97,2	≥ 1:160	žádné
	13	M	07.06.2022	2	německý ohař krátkosrstý	08.07.2024	177,5	1:40	žádné
	14	F	25.03.2008	11	labrador	22.01.2024	60,2	negativní	žádné
	15	M	29.05.2015	8	kříženec	18.01.2024	84,5	negativní	žádné
	16	M	10.03.2018	6	jorkširský teriér	15.04.2024	OVER	negativní	žádné
	17	M	15.01.2012	12	jorkširský teriér	07.03.2024	71,9	negativní	<b>RES</b>
<b>KOČKY</b>	1	M	06.09.2020	3	kočka domácí	22.04.2024	41,0	negativní	žádné
	2	F	01.01.2010	13	kočka domácí	02.10.2023	49,8	≥ 1:160	žádné
	3	M	01.01.2022	2	kočka domácí	22.01.2024	35,2	negativní	žádné
	4	F	01.01.2019	5	britská krátkosrstá kočka	17.01.2024	35,9	negativní	žádné
	5	F	11.04.2009	14	kočka domácí	24.01.2024	41,8	negativní	žádné
	6	M	01.01.2016	8	kočka domácí	25.01.2024	OVER	1:40	žádné
	7	M	01.01.2019	4	ragdoll	20.10.2023	67,4	≥ 1:160	žádné
	8	F	01.01.2016	7	kočka domácí	09.10.2023	259,8	≥ 1:160	<b>RES</b>

Zkratky: Č – pořadové číslo psa nebo kočky; ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; F – samice; M – samec; RES – respirační klinické příznaky; S/P % – poměr optické hustoty vzorku k průměru optické hustoty pozitivních kontrol; OVER – hodnota přesáhla měřitelný interval; \*věk zvířete udaný v letech v době odběru vzorku krve; VNT – virus neutralizační test

## Seznam literatury

- Barua, Subarna, Monirul Hoque, Folasade Adekanmbi, Patrick Kelly, Melinda Jenkins-Moore, Mia Kim Torchetti, Kelly Chenoweth, Theresa Wood, a Chengming Wang. 2021. „Antibodies to SARS-CoV-2 in dogs and cats, USA". *Emerging Microbes & Infections* 10 (1): 1669–74. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1967101>.
- Jarrah, Samar Afif, Louise Bach Kmetiuk, Fabrizia Valleriani, Barbara Bonfini, Alessio Lorusso, Violetta Vasinioti, Nicola Decaro, et al. 2023. „SARS-CoV-2 Antibodies in Dogs and Cats in a Highly Infected Area of Brazil during the Pandemic". *Frontiers in Veterinary Science* 10 (únor). <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1111728>.
- Kaczorek-Łukowska, Edyta, Kerstin Wernike, Martin Beer, Małgorzata Wróbel, Joanna Małaczewska, Elżbieta Mikulska-Skupień, Karolina Malewska, Izabela Mielczarska, a Andrzej Krzysztof Siwicki. 2022. „High Seroprevalence against SARS-CoV-2 among Dogs and Cats, Poland, 2021/2022". *Animals* 12 (16): 2016. <https://doi.org/10.3390/ani12162016>.
- Laidoudi, Younes, Youssouf Sereme, Hacène Medkour, Stéphanie Watier-Grillot, Pierre Scandola, Jacques Ginesta, Virginie Andréo, et al. 2021. „SARS-CoV-2 antibodies seroprevalence in dogs from France using ELISA and an automated western blotting assay". *One Health* 13 (prosinec):100293. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100293>.
- Pomorska-Mól, Małgorzata, Hanna Turlewicz-Podbielska, Maciej Gogulski, Jakub J. Ruskowski, Magdalena Kubiak, Anna Kuriga, Przemysław Barket, a Marek Postrzech. 2021. „A cross-sectional retrospective study of SARS-CoV-2 seroprevalence in domestic cats, dogs and rabbits in Poland". *BMC Veterinary Research* 17 (1): 322. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03033-2>.
- Ratti, Gabriele, Davide Lelli, Ana Moreno, Angelica Stranieri, Tiziana Trogu, Alessia Giordano, Andrea Grassi, et al. 2022. „Comparison of Diagnostic Performances of Different Serological Tests for SARS-CoV-2 Antibody Detection in Cats and Dogs". *Transboundary and Emerging Diseases* 69 (6): 3530–39. <https://doi.org/10.1111/tbed.14716>.
- Udom, Kitikhun, Waleemas Jairak, Ekkapat Chamsai, Kamonpan Charoenkul, Supanat Boonyapisitsopa, Napawan Bunpaong, Navapon Techakriengkrai, a Alongkorn Amonsin. 2022. „Serological Survey of Antibodies against SARS-CoV-2 in Dogs and Cats, Thailand". *Transboundary and Emerging Diseases* 69 (4): 2140–47. <https://doi.org/10.1111/tbed.14208>.
- Weng, Lin-Man, Xuan Su, a Xue-Qiang Wang. 2021. „Pain Symptoms in Patients with Coronavirus Disease (COVID-19): A Literature Review". *Journal of Pain Research* 14 (leden):147–59. <https://doi.org/10.2147/JPR.S269206>.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 110/2024/FVL***

# Detekce eDNA *Angiostrongylus cantonensis* jako nástroj pro screening bezpečnosti potravin a vody

Jana Kačmaříková<sup>1</sup>, Kateřina Janečková<sup>2</sup>, Barbora Červená<sup>1</sup>, Helena Stříbrná<sup>1</sup>

*Ústav patologické morfologie a parazitologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno<sup>1</sup>, Fakulta Veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno<sup>2</sup>*

## Úvod

Hlístice *Angiostrongylus cantonensis* je původcem eosinofilní meningitidy lidí i zvířat a řadí se mezi tzv. emergentní patogeny s výskytem nově již i v kontinentální Evropě. Jedná se o dvojhospitelského parazita, jehož definitivním hostitelem je potkan (*Rattus norvegicus*) nebo krysa (*Rattus rattus*) a mezihospitelem různé druhy plžů. V mezihospiteli dochází k vývoji larvy L3, která je infekční pro definitivní hostitele, ale zároveň také pro tzv. aberantní hostitele, u kterých se vývoj parazita zastavuje v nervové soustavě. Obvyklý způsob nákazy definitivních i aberantních hostitelů je pozřením infekčního mezihospitele, ovšem existuje i riziko nákazy volnými L3 larvami ze slizu plžů na potravinách, či z vodních nádrží infikovaných utopeným plžem. Vzhledem k existenci těchto stádií v prostředí je žádoucí vývoj screeningového systému pro zajištění bezpečnosti potravin, konkrétně listové zeleniny, která je mimo jiné dovážena i na naše území ze států s potvrzeným výskytem hlístice *A. cantonensis*, ale pro další možné využitím jako alternativy k invazivním metodám zahrnujícím odchyt hospitelských druhů pro detekci zamoření prostředí v endemických oblastech. K diagnostice stádií *A. cantonensis* byla vyvinuta vysoce citlivá metoda založená na využití real-time qPCR detekujícího DNA parazita, ovšem doposud byla používána pouze pro analýzu např. mozkomíšního moku či tkání plžů. Cílem práce bylo vyvinutí metodiky použitelné pro vzorky z prostředí, konkrétně vodu a listovou zeleninu.

## Materiál a metodika

### Izolace larev

Larvy hlístice *Angiostrongylus cantonensis* (dále jen L3) použité pro analýzy byly získány ze tkání mezihospitelů – plžů *Lissachatina fulica* z experimentálního chovu bezobratlých na VETUNI Brno. Larvy byly napipetovány do jednotlivých mikrozkušavek v požadovaném počtu a následně usmrceny za využití vysokých teplot (71 °C 1 min) pro vyloučení rizika infekce.

### Detekce DNA

Detekce DNA hlístice *A. cantonensis* v testovaných vzorcích byla provedena pomocí real-time qPCR podle protokolu Acan3990 (Sears et al. 2021). Pro analýzu byl využit přístroj LightCycler® 480 (Roche, Švýcarsko).

### Fáze testování metod koncentrace larev

V iniciační fázi bylo testováno několik metod pro zachycení L3 larev s cílem najít metodu, která bude dostatečně citlivá a zároveň uživatelsky přívětivá. Testovaným materiálem byla

kohoutková voda obsahující určenou koncentraci larev: 1, 5, 10, 20 a 50 L3. Byly vyzkoušeny tři metody, a to prostá sedimentace, síťovací metoda s proplachem sít a síťovací metoda s přímou izolací sít.

Při sedimentační metodě byla voda (400 ml) s požadovaným množstvím larev ponechána po dobu 1 hod ve skleněné kádince k prosté sedimentaci. Následně byl odstraněn supernatant a sediment byl přemístěn do sterilní 50 ml centrifugační zkumavky typu Falcon a zcentrifugován (2000 rpm, 2 min), následně byl 1 ml sedimentu odebrán sterilní Pasteurovou pipetou do nové mikrozukavky, opět zcentrifugován a supernatant odstraněn.

Při síťovací metodě s přímou izolací sít bylo 400 ml vody s larvami přelito přes aparát tvořený dvěma upravenými 50 ml zkumavkami s připevněnými sítí o velikosti ok 200x250  $\mu\text{m}$  (vzorek 0) k zadržetí hrubých nečistot a 21x21  $\mu\text{m}$  (vzorek 1) k zachycení larev. Přecezená voda se jímala do skleněné kádinky a zpracovala výše popsanou sedimentační metodou pro zjištění možného propadu částí tkáně larev (vzorek 2). Aparát byl opatrně rozložen a jednotlivá síta přesunuta sterilní pipetou do 2 ml mikrozukavek.

Poslední metodou byla síťovací metoda s proplachem sít, u které je postup obdobný předchozí metodě, ovšem jemné 21  $\mu\text{m}$  síto bylo následně obráceno a proudem čisté vody o objemu 50 ml propláchnuto do centrifugační zkumavky, jejíž sediment byl přesunut do mikrozukavky (vzorek 3).

Následně byla za pomoci izolačního kitu DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen, Německo) extrahována z jednotlivých vzorků DNA a provedena qPCR analýza. Po zhodnocení náročnosti, přesnosti a možného objemu zanalyzované vody byla k dalšímu testování zvolena metoda síťování s přímou izolací sít.

Z důvodu nežádoucího zachycování larev na prvním sítu byly stejným způsobem s pěti různými koncentracemi larev otestovány 3 další varianty hrubého síta: 1100x1100  $\mu\text{m}$ , 800x1000  $\mu\text{m}$  a 400x200  $\mu\text{m}$ . Po zhodnocení náročnosti, nejnižšího záchytu larev a schopnosti zajištění nejvyšší míry zachycování nečistot byla pro další testování zvolena polyesterová organza s oky 400x200  $\mu\text{m}$ .

#### Fáze optimalizace extrakce DNA

Vzhledem k možným DNA inhibitorům v reálných vzorcích z prostředí, např. rostlinných tkáních listové zeleniny nebo vodním kalu, jsme přistoupili k otestování tří různých způsobů extrakce DNA larev *A. cantonensis* ve vodě po proplachu zeleniny.

Praním 50 g listové zeleniny (salát polníček) ve 400 ml vody v zip sáčku a přecezením této vody přes síťovací aparát bylo získáno jemné síto s rostlinnou tkání, na který bylo přidáno buď 10 L3 nebo jedna L3. Vzorky s oběma koncentracemi byly následně použity pro extrakci DNA celkem třemi metodami: 1) tkáňovým kitem DNeasy Blood&Tissue, 2) kitem DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen, Německo) a 3) tkáňovým kitem Blood&Tissue (Qiagen, Německo) s modifikací za použití skleněných kuliček a látky Chelex 100 (Bio-Rad, USA).

Následná qPCR analýza prokázala, že nejúčinnějším způsobem extrakce DNA v případě použití vody po proplachu listové zeleniny je modifikace extrakce tkáňovým kitem Blood&Tissue, která pak byla použita pro další testování.

Fáze stanovení detekčního limitu při screeningu DNA *A. cantonensis* v listové zelenině

V poslední fázi pro stanovení detekčního limitu bylo využito pět různých koncentrací larev vpravených do listové zeleniny. K 50 g salátu polníček bylo v zip sáčku přidáno 400ml vody následované třepáním na třepače (1 min, 500 rpm). Voda byla zcezena přes aparát sít (hrubé síto 400x200 µm, jemné síto 21x21 µm), a protékající voda byla zachycena do skleněné kádinky. Pro extrakci DNA modifikovanou metodou tkáňovým kitem Blood&Tissue bylo využito jemné síto a sediment procezené vody. Každá koncentrace larev byla testována v pěti opakováních a pro následnou qPCR analýzu bylo použito duplikáty jednotlivých DNA izolátů.

## Výsledky

S využitím síťování vody použité pro omytí listové zeleniny s následnou extrakcí DNA pomocí modifikovaného protokolu pro tkáňový kit Blood&Tissue, ukázala qPCR analýza, že je možné touto metodou detekovat jedinou larvu parazitické hlístice *Angiostrongylus cantonensis* v 50 g listové zeleniny. Tabulka 1 znázorňuje výsledky detekčního limitu testované metody, při které bylo testováno 5 koncentrací larev v listové zelenině v pěti opakováních. Pozitivních výsledků bylo dosaženo ve všech případech, až na jeden případ analýzy sedimentu při koncentraci 50 L3. Cp hodnota je poté nepřímě úměrná množství DNA obsažené ve vzorku. Pro srovnání výsledků bylo použito DNA z jedné L3 jako pozitivní kontrola, u které bylo dosaženo Cp o hodnotě 13,53. Použitá metoda qPCR je vysoce senzitivní a zvládne amplifikovat i 1 fg DNA, což odpovídá 1/100 000 larvy. Díky kombinaci tohoto qPCR protokolu s nově vyvinutou metodou síťování vody po proplachu zeleniny vedoucí ke koncentrací larev je možné provádět surveillance s vysokou senzitivitou.

**Tabulka 1**

Koncentrace larev	Typ vzorku	Počet pozitivních vzorků	Průměrná hodnota Cp
50	Jemné síto	5/5	10,33
50	Sediment	4/5	25,09
20	Jemné síto	5/5	12,48
20	Sediment	5/5	21,73
10	Jemné síto	5/5	12,53
10	Sediment	5/5	26,86
5	Jemné síto	5/5	14,91
5	Sediment	5/5	21,77
1	Jemné síto	5/5	17,45
1	Sediment	5/5	27,42

## Seznam literatury:

SEARS, W.J.; QVARNSTROM, Y; DAHLSTROM, E; SNOOK, K; KALUNA, L; BALÁŽ, V; FECKOVÁ, B; ŠLAPETA J; MODRÝ, D; JARVI, S; NUTMAN, T B. AcanR3990 qPCR: A Novel, Highly Sensitive, Bioinformatically-Informed Assay to Detect *Angiostrongylus cantonensis* Infections. Online. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2021, roč. 73, č. 8, e1594–e1600. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1791>. [cit. 2024-11-24]



GUGGISBERG, A.R.; ALVAREZ ROJAS, C.A.; KRONENBERG, P.A.; MIRANDA, N., DEPLAZES, P. A Sensitive, One-Way Sequential Sieving Method to Isolate Helminths' Eggs and Protozoal Oocysts from Lettuce for Genetic Identification. Online. Pathogens. 2020, roč. 9, č. 8. ISSN 2076-0817. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pathogens9080624>. [cit. 2024-11-24].

COWIE, R.H. Pathways for transmission of angiostrongyliasis and the risk of disease associated with them. Hawai'i journal of medicine & public health: a journal of Asia Pacific Medicine & Public Health. 2013, vol. 72,6 Suppl 2: 70-4.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 113/2024/FVL***

# Využití síťovací techniky pro genotypizaci metastrongylidních hlístic u volně žijících vlků obecných se zaměřením na detekci *Angiostrongylus vasorum*

Jana Juránková<sup>1</sup>, Tereza Poláková<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav patologické morfologie a parazitologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno

## Úvod

V posledních letech je v České republice zaznamenáván návrat dříve prakticky vyhubených velkých masožravců konkrétně vlka obecného (*Canis lupus*), rysa ostrovida (*Lynx lynx*) a v některých oblastech také medvěda hnědého (*Ursus arctos*), Kutal et al., 2017. Nejvýraznější nárůst populace a geografického rozšíření v ČR je v posledním desetiletí pozorován právě u vlka obecného. Tento fenomén představuje v kulturní krajině naší země potenciál pro blízký kontakt těchto vrcholových predátorů s domácími zvířaty a člověkem. To může představovat potenciální riziko ve vztahu k přenosu parazitárních a dalších infekčních onemocnění mimo jiné i na domácí psy. Příkladem je metastrongylidní hlístice *Angiostrongylus vasorum*, která může u domácích psů vyvolat závažné onemocnění kardiovaskulárního a respiračního traktu. Ačkoliv typickým definitivním hostitelem *A. vasorum* je liška obecná (*Vulpes vulpes*), mohou jím být i vlci a jejich migrační potenciál tak může přispět k rozšíření tohoto parazita do nových oblastí (Tieri et al., 2021). Výskyt tohoto parazita v populaci volně žijících šelem na území ČR nebyl dosud publikován.

Cílem projektu bylo určení druhového spektra metastrongylidních hlístic se zaměřením na *A. vasorum* ze vzorků trusu vlků obecných z NP Šumava, a to na základě molekulárních dat u vzorků vyšetřených pomocí následného síťování. Dalším cílem bylo také srovnání záchytnosti L1 larev metastrongylidních hlístic při použití Baernamnnovy larvoskopie a následného síťování.

## Materiál a metodika

### Vzorkování a koprologické metody

V rámci monitoringu vlků obecných na území NP Šumava byly terénními pracovníky parku sbírány v letech 2020 až 2023 vzorky trusu těchto šelem. Díky smluvnímu výzkumu byly již dříve vzorky vyšetřeny standardními koprologickými metodami (flotace, sedimentace, larvoskopie) a částečně již také zpracovány metodou následného síťování, konkrétně v průběhu předchozího projektu IGA (103/2023/FVL). Metoda následného síťování využívá síť o dané velikosti ok (105, 38 a 21  $\mu\text{m}$ ), čímž umožňuje separaci různých vývojových stádií endoparazitů a přichystá je k navazujícímu molekulárnímu vyšetření (Mathis et al., 1996). L1 larvy metastrongylidních hlístic byly zachycovány na prostředním sítu (38  $\mu\text{m}$ ).

### Molekulární analýzy

Celková DNA ze vzorků přichystaných následným síťováním byla izolována pomocí komerčního izolačního kitu NucleoSpin Tissue XS (Machery-Nagel, Německo). DNA byla

izolována dle instrukcí uvedených v protokolu pro lidské a zvířecí tkáně. Pro genotypizaci metastrongylidních hlístic byla vybrána kombinace dvou markerů: jaderného ITS2 a mitochondriální podjednotky 1 cytochrom c oxidázy (COI). V případě ITS2 se jednalo o klasickou PCR, zatímco COI byla amplifikována v (semi)nested PCR. Pro amplifikaci celého ITS2 byly použity univerzální primery NC1 a NC2 (Gasser et al., 1993), kdežto primery pro necelý úsek COI byly navrženy na pracovišti řešitelů. Výsledné produkty byly vizualizovány pomocí elektroforézy na 2% agarózovém gelu obarveném Midori Green Advance (Elisabeth Pharmakon, ČR). Následně byly produkty přečištěné z gelu za použití kitu Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech, Taiwan) a odeslány na komerční sekvenaci (Macrogen Europe, Nizozemí). Získané sekvence byly zpracovány v programu Geneious Prime a porovnány se sekvencemi z databáze GenBank za použití BLAST analýzy (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### Statistické zhodnocení

Data pro statistické vyhodnocení byla zpracována v programu MS Excel. Pro srovnání účinnosti použitých metodik byl použit chi-kvadrát test. Vzorek byl vyhodnocen jako pozitivní, pokud PCR s následnou sekvenací identifikovalo druh metastrongylidní hlístice.

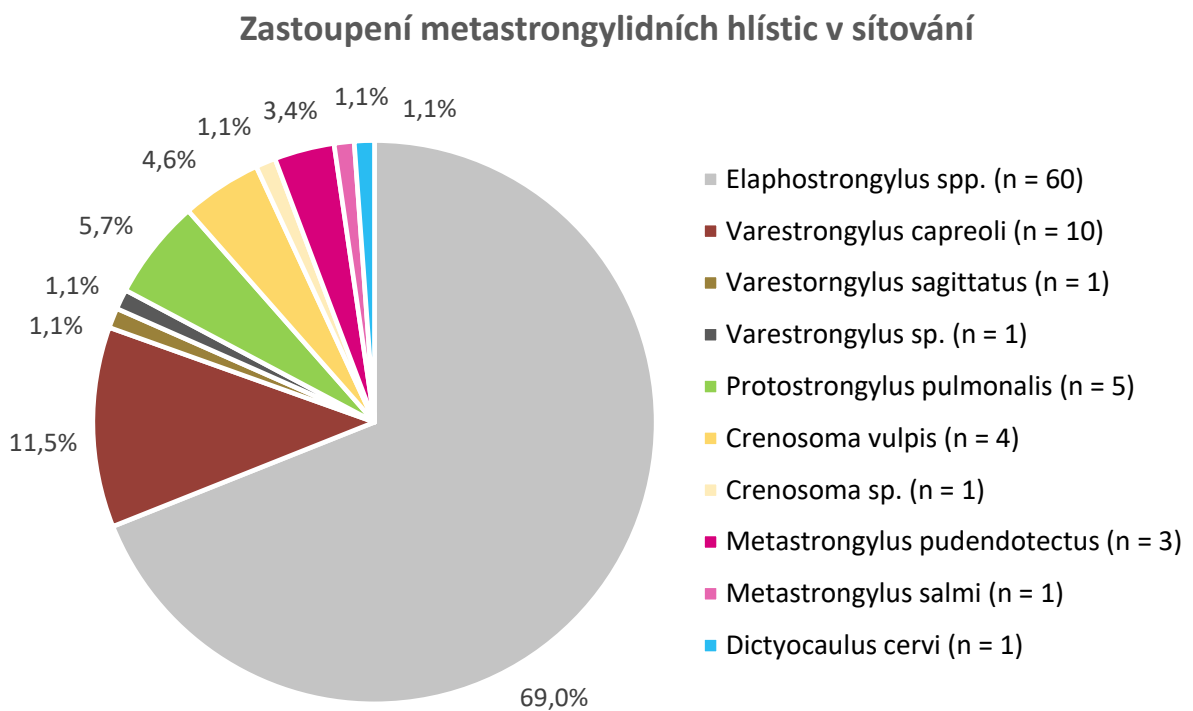
### Výsledky a diskuze

V rámci projektu bylo celkově vyšetřeno 357 vzorků trusu metodou následného síťování. Při genotypizaci larev bylo 23,5 % (84/357) vzorků pozitivních na přítomnost L1 larev metastrongylidních hlístic, které bylo možné rodově nebo druhově určit pomocí PCR kombinované se sekvenací (Graf 1, Tabulka 1). V případě 3 vzorků byly zaznamenány současně 2 druhy parazitů. Šokujícím zjištěním bylo, že pouze 4,6 % (4/87) z detekovaných larev tvořily metastrongylidní hlístice vlků a u zbylých více než 95 % se jednalo o pasáž z kořisti. Nejvíce pozitivních vzorků obsahovalo plicivky rodu *Elaphostrongylus* (69 %, 60/87) a celkově bylo detekováno 10 druhů metastrongylidních hlístic. Detekované plicivky patřily do šesti rodů: *Elaphostrongylus*, *Varestrongylus* a *Dictyocaulus* (parazité volně žijících přežvýkavců); *Metastrongylus* (parazité prasat); *Protostrongylus* (detekováni zástupci parazitující u zajícovců); *Crenosoma* (parazité různých druhů šelem). Přesné druhové určení některých zástupců (rod *Elaphostrongylus*) nebylo bez fylogenetické analýzy možné a tato bude provedena v připravované publikaci.

Při srovnání metodik Baermannovy larvoskopie a síťovací metody bylo statisticky prokázáno ( $p < 0,00001$ ), že v případě přemražených a enviromentálních vzorků trusu má síťování daleko vyšší záchyt L1 larev metastrongylidních hlístic. Larvoskopické vyšetření dle Baermanna odhalilo L1 larvy v 10,1 % vzorků (36/357), zatímco při vyšetřování síťovací metodou bylo pozitivních 23,5 % (84/357) vzorků. Zároveň však překryv pozitivních vzorků nebyl úplný a při kombinaci obou použitých metodik bylo pozitivních 28 % vzorků (100/357).

Naše data jasně ukazují, že naprostou většinu detekovaných L1 larev metastrongylidních hlístic v trusu vlků tvoří parazité kořisti. Fenomén pseudoparazitismu L1 larev však byl zatím publikován pouze v jednom případě (Bryan et al., 2010). Tato zjištění tak mohou zpochybnit spolehlivost předchozích výzkumů, které se opíraly pouze o morfologické určení larev z trusu (Hermosilla et al., 2017) a ukazují na nutnost genotypizace L1 larev detekovaných v trusu masožravců. Z našich zjištění také jasně vyplývá, že pro detekci L1 larev v enviromentálních vzorcích trusu masožravců je mnohem vhodnější použití síťovací metody.

Graf 1: Druhové zastoupení metastrongylidních hlístic detekovaných pomocí síťování



Tabulka 1: Výsledky sekvenací a druhového určení metastrongylidních hlístic

<b>Druh</b>	<b>Gen</b>	<b>Počet sekvencí</b>	<b>Homologie sekvencí (%)</b>	<b>Délka alignmentu</b>	<b>Výsledek BLASTu (% query cover; % shody)*</b>
<i>Elaphostrongylus</i> spp.	ITS2	27	96,5-100	586 bp	<a href="#">AF504027</a> (100 %; 99,14 %)
	COI	59	95,9-100	1395 bp	<a href="#">MW843794</a> (73 %; 98,64 %)
<i>Varestrongylus capreoli</i>	ITS2	5	98,5-99,7	405 bp	<a href="#">LT962658</a> (98 %; 99,25 %)
	COI	10	97,7-100	1385 bp	<a href="#">NC_068834</a> (99 %; 85,35 %)
<i>Varestrongylus sagittatus</i>	ITS2	1	/	531 bp	<a href="#">KJ439597</a> (88 %; 100 %)
	COI	1	/	1265 bp	<a href="#">NC_068834</a> (100 %; 86,02 %)
<i>Varestrongylus</i> sp.	ITS2	/	/	/	/
	COI	1	/	1379 bp	<a href="#">NC_068834</a> (100 %; 85,43 %)
<i>Protostrongylus pulmonalis</i>	ITS2	5	99,3-100	438 bp	<a href="#">KJ450994</a> (83 %; 100 %)
	COI	3	98,8-99,4	1369 bp	<a href="#">NC_023262</a> (100 %; 87,87 %)
<i>Crenosoma vulpis</i>	ITS2	3	99,7-100	483 bp	<a href="#">KF836608</a> (100 %; 99,59 %)
	COI	1	/	1371 bp	<a href="#">KM216824</a> (63 %; 99,55 %)
	ITS2	1	/	491 bp	<a href="#">MG878894</a> (99 %; 98,57 %)
<i>Crenosoma</i> sp.	COI	1	/	1114 bp	<a href="#">NC_085811</a> (100 %; 81,5 %)
<i>Metastrongylus pudendotectus</i>	ITS2	2	100	467 bp	<a href="#">AJ305382</a> (98 %; 100 %)
	COI	3	99,9-100	1369 bp	<a href="#">NC_013813</a> (100 %; 99,85 %)
<i>Metastrongylus salmi</i>	ITS2	1	/	520 bp	<a href="#">AJ305404</a> (99 %; 99,42 %)
	COI	/	/	/	/
<i>Dictyocaulus cervi</i>	ITS2	/	/	/	/
	COI	1	/	935 bp	<a href="#">KR231676</a> (99 %; 98,06 %)

\*do BLAST použit konsensus sekvencí z alignmentu

## Seznam literatury:

- Bryan, H.M., Sim, K.A., Darimont, C.T., Paquet, P.C., Wagner, B., Munoz-Fuentes, V., Smits, J.E., Chilton, N.B., (2010). Identification of *Parelaphostrongylus odocoilei* (Nematoda: Protostrongylidae) first-stage larvae in the feces of gray wolves (*Canis lupus*) by molecular methods. *J Wildl Dis*;46(1):297-302
- Gasser, R., Chilton, N., Hoste, H., Beveridge, I., (1993). Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nucleic acids research*. 21. 2525-6.
- Hermosilla, C., Kleinertz, S., Silva, L.M., Hirzmann, J., Huber, D., Kusak, J., Taubert, A., (2017). Protozoan and helminth parasite fauna of free-living Croatian wild wolves (*Canis lupus*) analyzed by scat collection. *Vet Parasitol*.15;233:14-19.
- Kutal, M., Belotti, E., Volfová, J., Mináriková, T., Bufka, L., Plednik, L., Krojerová-Prokešová, J., Bojda, M., Váňa, M., Kutalová, L., Beneš, J., Flousek, J., Tomášek, V., Kafka, P., Poledníková, K., Pospíšková, J., Dekář, P., Machciník, B., Koubek, P., Duřa, M. (2017): Výskyt velkých šelem – rysa ostrovida (*Lynx lynx*), vlka obecného (*Canis lupus*) a medvěda hnědého (*Ursus arctos*) – a kočky divoké (*Felis silvestris*) v České republice a na západním Slovensku v letech 2012–2016 (Carnivora). *Lynx, n.s.* (Praha), 48: 93-107.
- Mathis, A., Deplazes, P., Eckert, J., (1996). An improved test system for PCR-based specific detection of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Journal of Helminthology*, 70, 219-222.
- Tieri, E.E., Saletti, M.A., D'Angelo, A.R., Parisciani, G., Pelini, S., Cocco, A., Di Teodoro, G., Di Censo, E., D'Alterio, N., Latrofa, M.S., Otranto, D., Pascucci, I., (2021) *Angiostrongylus vasorum* in foxes (*Vulpes vulpes*) and wolves (*Canis lupus italicus*) from Abruzzo region, Italy. *Int J Parasitol Parasites Wildl*.15:184-194.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 106/2024/FVL***

## **Monitoring mikrobiální kontaminace dělohy a jeho vliv na zabřeznutí v poporodním období u klisen**

MVDr. Miroslava Mráčková PhD, Klára Indráková, Eliška Peroutková, Dominika Šmýd,  
MVDr. Petra Hallon PhD

*Klinika chorob koní, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno*

### **Úvod**

Velmi důležitým faktorem, který ovlivňuje reprodukci u koní je zdravotní stav dělohy u klisny. Rychlá involuce dělohy po porodu umožňuje, aby klisna znovu zabřezla často již 10. den po porodu, což je vzhledem k délce gravidity a sezónní pohlavní aktivitě koní v mnoha případech žádoucí. Většina dosud publikovaných studií však popisuje horší výsledky zabřezávání právě při využití první poporodní říje (Lane et al., 2016). Toto snížené zabřezávání je jistě ovlivněno mnoha faktory, kdy jedním z nich je i bakteriální kontaminace dělohy, ke které během porodu může docházet, neboť mechanické bariéry (stydké pysky, vestibulovaginální svěrač, krček děložní) v tomto momentě nemohou plnit svoji obrannou funkci. Zvláště pokud porod neprobíhá fyziologicky, dochází k dystokiím, retenci placenty apod., je riziko bakteriální kontaminace dělohy výrazně vyšší. Studie monitorující právě výskyt bakterií v děloze klisny po porodu existují, není jich mnoho, a ne vždy přinášejí shodné výsledky (Purswell et al., 1989; Diav et al., 2010). Zatímco Diav et al., 2010 ve své studii neprokázal bakteriální kontaminaci dělohy po nekomplikovaném porodu, Purswell et al., prokázal ve své studii pozitivní kultivaci u více jak 50 % klisen. Další studie se pak zabývají již přímo původci patologických stavů po porodu (Ferrer et Palomares, 2018) nebo se zaměřují na cytologické vyšetření dělohy (Krohn et al., 2019). Cílem projektu bylo získat ucelenou představu o mikrobiální kontaminaci dělohy u klisen a zmonitorovat, jak účinně jsou klisny schopny tuto kontaminaci z dělohy eliminovat, případně k jakým jiným změnám v mikrobiální kontaminaci dělohy dochází. Dalším cílem bylo posoudit vliv této kontaminace dělohy po porodu na schopnost klisny zabřeznout časném puerperálním období.

### **Materiál a metodika**

U 19 klisen byly při standardní kontrole reprodukčního traktu po porodu (do 48 hodin po porodu) a následně podruhé při první poporodní říji (9.-10. den po porodu), opět při rutinní kontrole, odebrány vzorky pro vyšetření mikrobiologické kontaminace dělohy. Vzorky byly odebírány duplikovaně pomocí dvouplášťového katetru určeného pro odebírání mikrobiologických vzorků z dělohy (Minitube, Germany). Tyto vzorky byly bezprostředně po odběru vloženy do transportního média dle Amiese a ihned doručeny do mikrobiologické laboratoře Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie ke kultivaci a identifikaci bakterií. Vzorky byly odebírány především od klisen v terénních podmínkách, kde byly realizovány jednak v rámci extramurální praxe Kliniky chorob koní a také pod vedením terénních veterinárních lékařů, u kterých studentky magisterského studijního programu FVHE a spoluřešitelky projektu běžně vykonávají nepovinnou praxi nad rámec výuky na VETUNI. Mikrobiologická vyšetření vzorků zajistily studentky spoluřešitelky po zaškolení pracovníky Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie VETUNI. Izolace bakteriálních kolonizátorů dělohy

klisen byla provedena cestou bakteriologické kultivace na Columbia blood agaru, McConkey agaru a dále pro izolaci producentů širokospektrých beta-laktamáz z čeledi *Enterobacteriaceae* také na McConkey agaru suplementovaném cefalosporinem 3. generace cefotaximem v množství 2 mg/l. Kromě inkubace v aerobních podmínkách při 37 °C byly všechny vzorky inkubovány také anaerobně pro případný záchyt mikroorganismů, které nerostou v přítomnosti kyslíku. Výsledky kultivačního vyšetření byly odečítány po 48 hodinách a narostlé kolonie byly následně identifikovány metodou MALDI-TOF MS na přístroji Microflex LT. V případě záchytu některého z původců endometritid koní byl izolát zamrazen pro další vyšetření zahrnující stanovení citlivosti k antibiotikům využívaných v equinní praxi a indikátorovým substancím diskovým difúzním testem.

Dále byla zaznamenána data o klisně (věk, počet předchozích porodů eventuální komplice při předchozích graviditách), způsobu připouštění/inseminace klisny, délce gravidity, průběhu gravidity, porodu a případných porodních či poporodních komplikacích, způsobu připouštění/inseminace na první poporodní říji, která byla následně vyhodnocena a jsou součástí výsledků tohoto projektu.

## Výsledky

Bylo zjištěno, že 73,7 % klisen mělo v prvních dvou dnech po porodu dělohu kontaminovanou mikroorganismy. Při první poporodní říji procento klisen s pozitivním záchytem mikroorganismů sice kleslo na 68,4 %, ale tento pokles nebyl překvapivě nikterak významný a klisny tedy nebyly schopny mikrobiální kontaminaci z dělohy do této doby, první poporodní říje, zcela eliminovat. Pouze 10,5 % klisen mělo oba stěry negativní, ale ani u jedné z těchto klisen nebyla první poporodní říje využita k připouštění či inseminaci. U všech klisen, u kterých byla první poporodní říje k inseminaci využita, byla inseminace neúspěšná. Je ale nutné zopakovat, že všechny inseminované klisny měly v době inseminace pozitivní záchyt mikroorganismů v děloze. Jednoznačně se tedy ukazuje, že v případě zamýšlené inseminace klisny na první poporodní říji je nutný zvýšený management klisny post partum, abychom zvýšili šanci klisny na zabřeznutí.

Celkový počet klisen	První stěr	Druhý stěr	Pozitivní oba stěry	Negativní oba stěry
19	73,70%	68,40%	52,60%	10,50%

Tabulka 1. Procentuální zastoupení mikrobiologické kontaminace dělohy

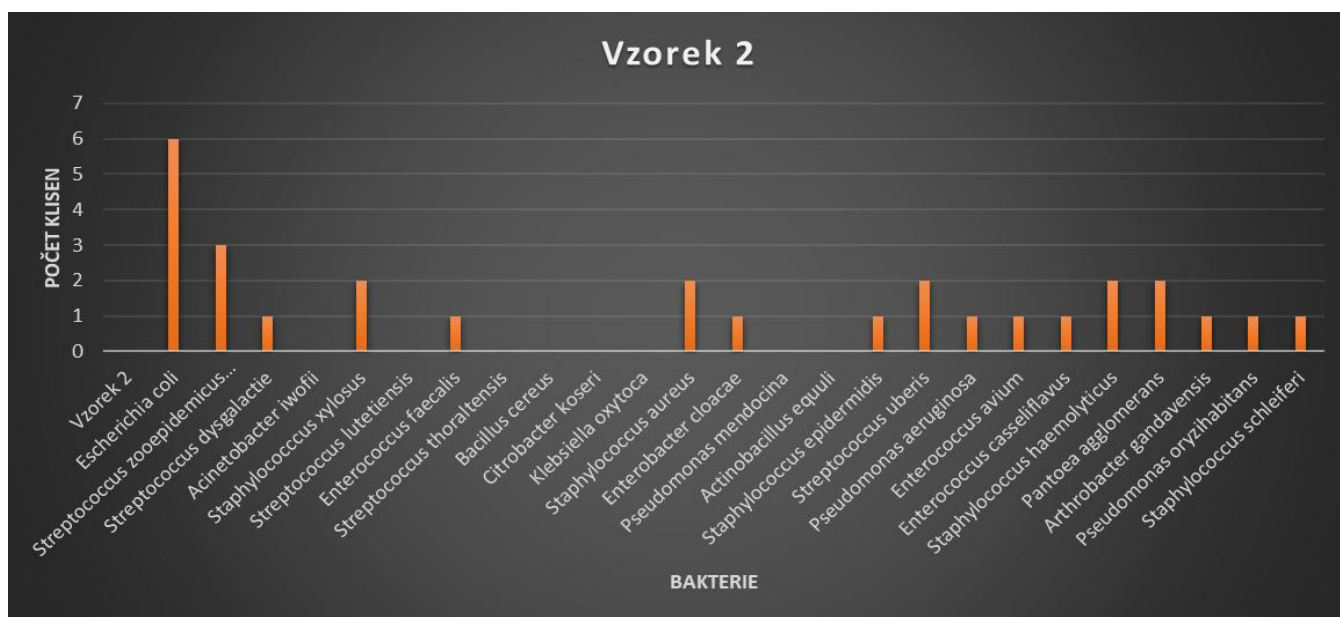
Zjištěná mikroflóra kontaminující dělohu klisen po porodu (vzorek 1) obsahovala rody *Streptococcus* (11), *Escherichia* (7), *Staphylococcus* (3), *Acinetobacter* (2), *Enterococcus* (2), *Bacillus* (1), *Citrobacter* (1), *Klebsiella* (1), *Enterobacter* (1), *Pseudomonas* (1), *Actinobacillus* (1).





Obrázek 1. Grafické znázornění zástupců bakterií vykultivovaných na vzorku 1

Rody zjištěné při první poporodní říji (vzorek 2) jsou mírně odlišné: *Staphylococcus* (8), *Escherichia* (6), *Streptococcus* (4), *Enterococcus* (3), *Pantoea* (2), *Bacillus* (1), *Citrobacter* (1), *Enterobacter* (1), *Arthrobacter* (1).



Obrázek 2. Grafické znázornění zástupců bakterií vykultivovaných na vzorku 2

Na základě zjištěných odlišností v rodech mikroorganismů při prvním a druhém stěru děložním je zřejmé, že ke kontaminaci dělohy nedochází pouze při porodu samotném, ale i v krátké době po porodu, kdy ještě nejsou zcela funkční anatomické bariéry pohlavního aparátu klisen (stydské pysky a celá perineální oblast, vestibulovaginální svěrač, děložní krček).

## **Seznam literatury**

Ferrer MS and Palomares R. Aerobic uterine isolates and antimicrobial susceptibility in mares with post-partum metritis. *Equine Vet J*, 2018;50:202-207.

Diawa M, Bailey CS, Schlafer D, Pozor M, Troedsson M, Benson S, Macpherson ML. Characteristics of endometrial culture and biopsy samples taken immediately postpartum from normal mares compared with those from mares with induced placentitis. *Animal Reproduction Science*, 2010;121S:369–370.

Lane E, Bijnen M, Osborne M, More S, Henderson I, Duffy P, Crowe M. Key Factors Affecting Reproductive Success of Thoroughbred Mares and Stallions on a Commercial Stud Farm. *Reprod Dom Anim*, 2016;51:181-187.

Purswell BJ, Ley WB, Sriranganathan N, Bowen JM. Aerobic and anaerobic bacterial flora in the postpartum mare. *Equine Veterinary Science*. 1989;9:141-4.

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 115/2024/FVL*

# Rekurentní laryngeální neuropatie, porovnání terapeutických přístupů

MVDr. Štěpán Bodeček, Ph.D.<sup>1</sup>, Terezie Lagová<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Klinika chorob koní, Veterinární univerzita Brno

<sup>2</sup>Magisterský studijní program – 6. ročník, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,  
Veterinární univerzita Brno

## Úvod

Rekurentní laryngeální neuropatie je degenerativní porucha idiopatického původu, která patří mezi nejčastější příčiny snížené výkonnosti a hlasitého dýchání u koní. V důsledku této poruchy dochází k parciální nebo totální obrně arytenoidní chrupavky a hlasivky. (Couetil a Hawkins, 2013) Při chirurgickém řešení RLN existuje několik typů terapeutických přístupů (ventrikulektomie a ventrikulokordektomie provedená přes laryngotomii nebo transendoskopicky pomocí laserového vlákna, laryngoplastika a jejich kombinace). Cílem tohoto projektu je porovnat efekt těchto terapeutických přístupů vzhledem k výkonnosti koně po zákroku, výskytu komplikací a přetrvávání klinických příznaků.

## Materiál a metodika

Do studie jsme zapojili celkem 80 pacientů, kteří byli v letech 2010 až 2024 na Klinice chorob koní VETUNI léčeni s RLN a podstoupili jeden z výše zmíněných zákroků. Tento časový rozsah byl stanoven s ohledem na zavedení transendoskopického laseru jako další možnosti řešení RLN. Majitelům, trenérům či jezdcům těchto koní byl následně zaslán dotazník, jehož cílem bylo zjistit informace především o přítomnosti hlasitého dýchání či změn výkonnosti před zákrokem a o tom, zda se po zákroku stav koně zlepšil nebo problémy stále přetrvávaly a zda nastaly po zákroku nějaké komplikace. Od 44 z opakovaně oslovených jsme následně obdrželi odpovědi na zasláný dotazník. Poté bylo vybráno 36 dotazníků, které obsahovaly vyhodnotitelné informace. Z těchto 36 pacientů jsme získali souhlas majitelů 14 koní, u kterých bylo v terénu provedeno kontrolní endoskopické vyšetření. Výsledky těchto vyšetření jsme pak srovnali s informacemi, které nám poskytli majitelé a zhodnotili úspěšnost zákroku. Vyšetření proběhlo po odebrání anamnézy a v závislosti na bázlivosti koně bylo provedeno buď za použití sedativ (cepesedan + butomidol nebo xylazin) nebo za pomoci fixace nosním skřipcem.

## Výsledky

(i) *Výsledky dotazníkového šetření*

*Zhodnocení terapeutických přístupů vzhledem k celkovému zlepšení stavu po zákroku*

Ze skupiny 36 koní bylo celkově pozorováno zlepšení v 26 případech. V 10 případech nedošlo ke změně stavu.

Zárok	Stav se zlepšil (Počet pacientů)	Stav zůstal stejný (Počet pacientů)
Laryngoplastika + ventrikulektomie přes laryngotomii	8	3
Laryngoplastika + transendoskopická laserová ventrikulektomie	1	
Laryngoplastika + ventrikulokordektomie přes laryngotomii	5	
Laryngoplastika + transendoskopická laserová ventrikulokordektomie	5	1
Transendoskopická laserová ventrikulokordektomie	7	6
Laryngoplastika – vždy prováděna pouze v kombinaci s jinou metodou, provádění zákroku v kombinaci s laryngoplastikou vykazovalo lepší úspěšnost než zákroky prováděné bez laryngoplastiky		

Tabulka 1: Výsledky zhodnocení terapeutických přístupů vzhledem k celkovému stavu koně

#### *Zhodnocení terapeutických přístupů vzhledem výskytu komplikací po zákroku*

Největší četnost komplikací se vyskytla u kombinace laryngoplastiky a ventrikulektomie přes laryngotomii (33 %). Dále se vyskytovala 27 % míra komplikací u kombinace laryngoplastiky a transendoskopické laserové ventrikulokordektomie. Stejnou míru četnosti komplikací (20 %) měla kombinace laryngoplastiky a ventrikulokordektomie přes laryngotomii a transendoskopická laserová ventrikulokordektomie.

Zárok	Kašel	Hlasité dýchání	Výtok z nozder	Serom	Reakce na antibiotika	Uvolnění stehů	Bez komplikací
	(Počet pacientů)						
Laryngoplastika + ventrikulektomie přes laryngotomii	4	2	2				3
Laryngoplastika + transendoskopická laserová ventrikulektomie							1

Laryngoplastika + ventrikulokordektomie přes laryngotomii	2	1		1			1
Laryngoplastika + transendoskopická laserová ventrikulokordektomie	2	1	1		1	1	
Transendoskopická laserová ventrikulokordektomie	1	5					7

Tabulka 2: Výsledky zhodnocení terapeutických přístupů vzhledem k výskytu pooperačních komplikací

*Zhodnocení terapeutických přístupů vzhledem k výkonnosti koní po zákroku*

Při hodnocení výkonnosti a srovnávání jednotlivých metod jsme se zaměřovali na to, zda výkonnost koně byla snížena již před zákrokem a zda se po zákroku zvýšila, snížila nebo zůstala stejně nízká a zákrok na výkonnost neměl vliv. Anebo zda se problémy s výkonností před zákrokem vůbec vyskytly.

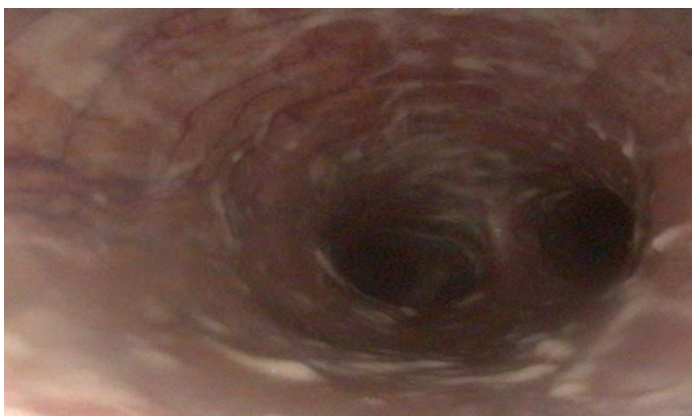
Zárok	Výkonnost se zvýšila	Výkonnost se zhoršila	Výkonnost zůstala snížená	Změny výkonnosti nebyly evidovány
	(Počet pacientů)			
Laryngoplastika + ventrikulektomie přes laryngotomii	4	2	2	3
Laryngoplastika + transendoskopická laserová ventrikulektomie				1
Laryngoplastika + ventrikulokordektomie přes laryngotomii	3			2
Laryngoplastika + transendoskopická laserová ventrikulokordektomie	4			2
Transendoskopická laserová ventrikulokordektomie	1		5	7

Tabulka 3: Výsledky zhodnocení terapeutických přístupů vzhledem ke zlepšení výkonnosti po zákroku

(ii) *Výsledky endoskopických vyšetření v terénu*

Výsledky kontrolních endoskopických vyšetření provedených u 14 koní u většiny případů neodhalily žádné závažné komplikace (10 koní). U čtyř koní byly zaznamenány komplikace ve formě menší či větší přítomnosti hlenu v dýchacích cestách či kašle (obr. 1, 2, 3), selhání sutury po laryngoplastickém zákroku (obr. 2), aspirace krmiva (obr. 4 a 5) a patrných známek zánětu levé arytenoidní chrupavky (obr. 6). Tyto změny můžeme vidět na následujících snímcích. Majitelé byli poučeni o opatřeních redukcujících přítomnost těchto komplikací jako je například změna zoohygienických podmínek, máčení sena a další dietární opatření či nutnost dalšího veterinárního ošetření.

### Závěr



Obrázek 1. Masivní přítomnost hlenu v průdušnici



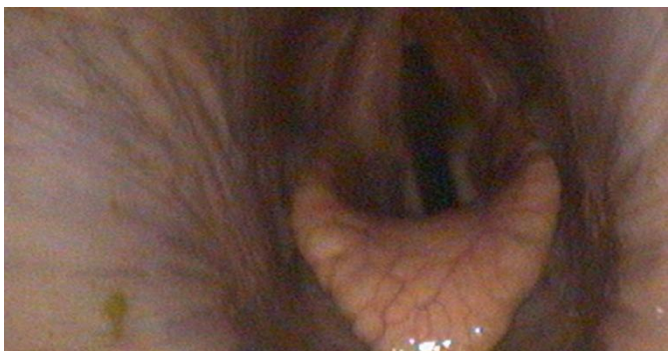
Obrázek 2. Přítomnost hlenu v kranální části průdušnice a okolí hrtanu, selhání sutury.



Obrázek 3. Slabá přítomnost hlenu v průdušnici



Obrázek 4. Aspirace krmiva v hrtanu a kranální části průdušnice



Obrázek 5. Přítomnost krmiva v hltanu



Obrázek 6. Zánět levé arytenoidní chrupavky

Z výsledků dotazníkového šetření můžeme říci, že z hlediska celkového zlepšení stavu koně po zákroku prokázala nejlepší výsledky kombinace laryngoplastiky a ventrikulokordektomie

provedené přes laryngotomii. Z hlediska zlepšení stavu koně po zákroku téměř stejné výsledky jako kombinace laryngoplastiky s ventrikulokordektomií přes laryngotomii prokázala kombinace laryngoplastiky s transendoskopickou laserovou ventrikulokordektomií, jelikož u případu, kdy ke zlepšení nedošlo, bylo příčinou selhání sutury po laryngoplastice. Z hlediska přítomnosti komplikací po zákroku, byla nejnižší míra jejich výskytu pozorována u transendoskopické laserové ventrikulokordektomie a kombinace laryngoplastiky s ventrikulokordektomií přes laryngotomii. Z hlediska zlepšení výkonnosti koně po zákroku opět nejlepší výsledky prokazuje kombinace laryngoplastiky a ventrikulokordektomie přes laryngotomii a kombinace laryngoplastiky a transendoskopické laserové ventrikulokordektomie. Ačkoli se dle našich výsledků zdá, že mezi provedením laryngoplastiky v kombinaci s ventrikulokordektomií přes laryngotomii a provedením laryngoplastiky v kombinaci s transendoskopickou laserovou ventrikulokordektomií není téměř žádný rozdíl, trendem dnešní doby pro léčbu RLN je jednoznačně využití laserového ošetření, a to nejen v ČR, ale i v zahraničí. (Biasutti a kol., 2016) Například na klinice chorob koní, která se nachází v areálu Univerzity Curych (UZH), je kombinace laryngoplastiky a transendoskopické laserové ventrikulokordektomie nejčastěji volenou metodu chirurgického řešení RLN. (Valletti Carlotta, 2024) Hlavním důvodem použití laseru je rychlejší rekonvalescence, bez nutnosti péče o laryngotomickou ránu. Zároveň tento zákrok patří mezi nejčastější způsob využití diodového laseru v equinní medicíně. (Tate L. P. a Tate K.B., 2019; Hawkins, 2015).

## Seznam literatury

1. BIASUTTI, S., DART, A. J. a JEFFCOTT, L. (2016). A review of recent developments in the clinical application of prosthetic laryngoplasty for recurrent laryngeal neuropathy: Indications, complications and outcome. *Equine Veterinary Education*. s. 29.
2. COUËTIL, L. a HAWKINS J. Abnormal respiratory sounds. In: COUËTIL, L. a HAWKINS J. (2013). *Respiratory diseases of the horse - a problem-oriented approach to diagnosis and management*, Manson Publishing, 73 Corringham Road, London NW11 7DL, England, United Kingdom, s. 179-186. ISBN 978-1-84076-186-3.
3. HAWKINS, J. Laser Ventriculocordecotomy. In: HAWKINS, J. (2015). *Advances In Equine Upper Respiratory Surgery*, Wiley Blackwell, 111 River Street, Hoboken, NJ 07030, USA, s. 21-27. ISBN: 978-0-47-095960-2
4. TATE, L. P., TATE, K. B. Equine laser surgery procedures. In: WINKLER, CH. J. (2019). *Laser surgery in veterinary medicine*, Wiley Blackwell, 111 River Street, Hoboken, NJ 07030, USA, s. 245-246, ISBN: 978-1-1194-8601-5
5. VALLETTI, Carlotta, veterinární lékařka na Univerzitě Curych (UZH) [ústní sdělení]. Curych, 17.10.2024.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 104/2024/FVL***



# Vliv medetomidinu s vatinoxanem na nitrooční tlak a velikost zornice u psů

Markéta Mrázová, Nina Bestrová, Markéta Kašparová

*Klinika chorob psů a koček, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno*

## Úvod

Nitrooční tlak (NOT) je důležitý pro oční homeostázu. Jeho změny mohou mít významný vliv na funkci oka. Hodnoty NOT se u zdravých psů pohybují od 11 do 25 mm Hg. Nitrooční tlak je ovlivněn tlakem na oko, arteriálním tlakem oxidu uhličitého a kyslíku, systémovým krevním tlakem, velikostí zornice (VZ), podávanými léky a dalšími.

Medetomidin, agonista  $\alpha_2$ -adrenoceptoru, navozuje sedaci prostřednictvím centrálního agonismu  $\alpha_2$ -adrenoceptorů. Medetomidin má významné vedlejší periferně a centrálně zprostředkované hemodynamické účinky. Postsynaptický agonismus vede k periferní vazokonstrikci následované zvýšeným tonusem *n. vagus* a sníženou srdeční frekvencí. Antagonista  $\alpha_2$ -adrenoceptoru vatinoxan (MK-467, L-659'066) špatně proniká hematoencefalickou bariérou. Prokázalo se, že vatinoxan je periferně selektivní po současném podání s medetomidinem u psů. Vatinoxan má potenciál omezit periferně zprostředkovanou vazokonstrikci a bradykardii způsobenou agonisty  $\alpha_2$ -adrenoceptorů při zachování centrálního sedativního účinku.

Medetomidin má minimální vliv na NOT. Vliv medetomidinu v kombinaci s vatinoxanem na NOT dosud popsán nebyl. Účelem předkládané studie bylo prozkoumat vliv vatinoxanu podávaného intravenózně s medetomidinem na NOT u zdravých psů při vědomí. Předpokládáme, že účinky kombinace medetomidinu s vatinoxanem budou podobné účinkům samotného medetomidinu, aniž by významně ovlivnily NOT nebo VZ.

## Materiál a metodika

Celkem bylo do studie zahrnuto 40 zdravých psů ve věku 2 – 8 let a hmotnosti 5 – 20 kg, kteří podstoupili rentgenové vyšetření muskuloskeletálního systému v sedaci. Všichni psi byli klasifikováni jako zdraví na základě anamnézy, klinického vyšetření a kompletního hematologického a biochemického vyšetření krve. Psi byli 12 hodin nalačno a měli volný přístup k vodě.

Před sedací bylo provedeno oftalmologické vyšetření včetně Schirmerova slzného testu I (STT-I), aplanační tonometrie, biomikroskopie šterbinovou lampou, barvení fluoresceinem, gonioskopie a nepřímé oftalmoskopie. Zařazeni byli pouze psi bez očních abnormalit, s NOT v rozmezí 15 – 25 mm Hg a STT-I vyšším než 12 mm min<sup>-1</sup>. Psi brachycefalických plemen nebo jiných plemen, která mohou mít oční rozdíly, nebyli do studie zahrnuti. Všechna měření byla provedena na zvířatech při vědomí.

K rozdělení zvířat do skupiny M (n = 20) nebo skupiny MV (n = 20) byl použit software (www.randomizer.org). Všem psům byl do *v. cephalica* zaveden intravenózní katétr. Po 10 minutách byly změřeny a zaznamenány hodnoty NOT, VZ, srdeční frekvence (SF) a středního arteriálního tlak (TKstř.) (T0).



Pro sedaci dostali psi skupiny M intravenózně medetomidin (Domitor, Orion Corporation, Finsko) v dávce  $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$  a psi MV skupině intravenózně medetomidin v dávce  $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$  s vatinoxanem (Zenalpha, Vetcare Oy, Finsko) v dávce  $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Všechna data byla sbírána ráno po 20 minutách aklimatizace v identické tiché místnosti bez oken za konstantních světelných podmínek. Všichni psi byli udržováni po celou dobu studie v poloze vleže na hrudníku bez komprese krku nebo očního bulbu. Měření prováděla stejná osoba, která nevěděla, jaký lék byl podán.

U všech psů byly měřeny a zaznamenány hodnoty NOT, VZ, SF a TKstř. vždy ve stejném pořadí bezprostředně před (T0) a 5 (T5), 10 (T10) a 20 (T20) minut po podání léků.

NOT byl měřen aplanačním tonometrem (TonoPen XL, Medtronic, MN, USA). Před měřením byl vždy použit nový pryžový kryt a tonometr zkalibrován. U všech zvířat byl NOT měřen pouze na levém oku. Tři měření s 5% chybou a s maximálně 10% rozptylem byla zprůměrována.

U všech psů byla VZ měřena pouze na levém oku pupilometrem (Haabův pupilometr, Merck Sharp & Dohme, NJ, USA).

Srdeční frekvence byla měřena auskultací srdečních zvuků po dobu 20 sekund a vynásobena třemi.

Střední arteriální tlak byl měřen neinvazivně monitorem vitálních funkcí (Cardel 9401, Midmark, OH, USA) manžetou aplikovanou na předloktí hrudní končetiny. Šířka manžety byla 40 % obvodu končetiny.

Všechna data byla analyzována programem InStat (GraphPad, CA, USA), KyPlot (KyensLab, Japonsko) a Excel (Microsoft, WA, USA). Normalita byla testována Shapiro-Wilkovým testem. Data s normální distribucí naměřená v T5, T10 a T20 byla porovnána s T0 jednocestnou analýzou rozptylu (ANOVA) pro opakovaná měření s Bonferroniho korekcí, pro data s nenormálním rozložením byl použit Friedmanův test. Naměřené hodnoty byly porovnány mezi skupinami v každém identickém časovém bodě dvoucestnou ANOVA pro opakovaná měření. Pro nenormálně rozložená data byly použity jejich neparametrické ekvivalenty ( $p < 0,05$ ). Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka nebo medián (rozmezí).

## Výsledky

Celkem bylo do studie zařazeno 40 psů, 13 plemen, 22 psů a 18 fen ve věku  $5,0 \pm 2,4$  roku a hmotnosti  $11,9 \pm 5,8$  kg. Mezi skupinami nebyly zaznamenány žádné signifikantní rozdíly s ohledem na plemeno, pohlaví, tělesnou hmotnost, věk nebo proměnné naměřené v T0.

V žádných časových bodech nebyly pozorovány signifikantní rozdíly v hodnotách NOT v rámci skupin ani mezi nimi.

Ve skupině M se VZ zmenšila u všech psů. Ve skupině M se VZ signifikantně zmenšila v T5 ( $p = 0,008$ ), T10 ( $p < 0,001$ ) a T20 ( $p < 0,001$ ) ve srovnání s T0. Ve skupině MV se VZ zmenšila u pěti psů, zvětšila u sedmi psů a zůstala nezměněna u sedmi psů. U jednoho psa ze skupiny MV se VZ nejprve zmenšila a poté zvětšila. Ve skupině MV se VZ oproti T0 signifikantně

nezměnila. Ve skupině MV byla VZ signifikantně větší ve srovnání se skupinou M v T5 ( $p = 0,011$ ), T10 ( $p < 0,001$ ) a T20 ( $p < 0,001$ ).

Srdeční frekvence se signifikantně snížila v obou skupinách v T5, T10 a T20 ve srovnání s T0. Ve skupině MV byla SF významně vyšší ve srovnání se skupinou M v T5 ( $p = 0,011$ ), T10 ( $p = 0,009$ ) a T20 ( $p = 0,038$ ).

Ve skupině M se TKstř. signifikantně snížil v T20 ( $p = 0,003$ ) ve srovnání s T0. Ve skupině MV se TKstř. signifikantně snížil v T10 ( $p = 0,044$ ) a T20 ( $p = 0,003$ ). Ve skupině MV byl TKstř. signifikantně nižší ve srovnání se skupinou M v T20 ( $p = 0,033$ ).

Žádné další signifikantně změny v rámci nebo mezi skupinami nebyly zjištěny.

## **Závěr**

Medetomidin aplikovaný samostatně nebo v kombinaci s vatinoxanem ve výše uvedených dávkách významně neovlivňuje nitrooční tlak. Medetomidin s vatinoxanem významně neovlivňuje velikost zornice, kterou samostatně aplikovaný medetomidin zmenšuje.

## **Seznam literatury:**

- (1) Aghababaei A, Ronagh A, Mosallanejad B, Baniadam A 2021: Effects of medetomidine, dexmedetomidine and their combination with acepromazine on the intraocular pressure IOP, tear secretion and pupil diameter in dogs. *Veterinary Medicine and Science* 7, 1090–1095.
- (2) Cullen L 1996: Medetomidine sedation in dogs and cats: a review of its pharmacology, antagonism and dose. *The British Veterinary Journal* 152, 519–535.
- (3) Flacke WE, Flacke JW, Bloor BC, McIntee DF, Sagan M 1993: Effects of dexmedetomidine on systemic and coronary hemodynamics in the anesthetized dog. *Journal of Cardiothorac and Vascular Anesthesia* 7, 41–49.
- (4) Honkavaara JM, Raekallio MR, Syrja PM, Pypendop BH, Knych HK, Kallio-Kujala IJ, Vainio OM 2020: Concentrations of medetomidine enantiomers and vatinoxan, an alpha2-adrenoceptor antagonist, in plasma and central nervous tissue after intravenous coadministration in dogs. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 47, 47–52.
- (5) Kanda T, Iguchi A, Yoshioka Ch, Nomura H, Higashi K, Kaya M, Yamamoto R, Kuramoto T, Furukawa T 2015: Effects of medetomidine and xylazine on intraocular pressure and pupil size in healthy Beagle dogs. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 42, 623–628.
- (6) Mrázová M, Raušer P, Burová J, Georigiou M, Fichtel T 2018: Influence of medetomidine, acepromazine, fentanyl or butorphanol on intraocular pressure and pupil size in healthy dogs. *Veterinarni Medicina Czech* 63, 413–419.
- (7) Rolfe NG, Kerr CL, McDonnell WN: Cardiopulmonary and sedative effects of the peripheral alpha2-adrenoceptor antagonist MK 0467 administered intravenously or

intramuscularly concurrently with medetomidine in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 73, 587–594.

- (8) Verbruggen AM, Akkerdaas LC, Hellebrekers LJ, Stades FC 2000: The effect of intravenous medetomidine on pupil size and intraocular pressure in normotensive dogs. *The Veterinary Quarterly* 22, 179–180.
- (9) Wallin-Håkanson N, Wallin-Håkanson B 2001: The effects of topical tropicamide and systemic medetomidine, followed by atipamezole reversal, on pupil size and intraocular pressure in normal dogs. *Veterinary Ophthalmology* 4, 3–6.
- (10) Wrześniewska K, Madany J, Winiarczyk D 2018: Comparison of intraocular pressure measurement with Schiotz Tonometer and Tono-Pen Vet Tonometer in healthy dogs. *Journal of Veterinary Research* 62, 243–247.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI Brno 102/2024/FVL***

# **Diagnostika pneumotoraxu metodou RATTUS (Rat thoracic ultrasound) u potkanů chovaných ze záliby**

Anna Piskovská<sup>1,2</sup>, Katarzyna Kraszewska<sup>3</sup>, Petr Linhart<sup>4</sup>, Vladimír Jekl<sup>1,2</sup>,

<sup>1</sup>*Veterinární klinika Jekl & Hauptman, Brno*

<sup>2</sup>*Vetcardia Veterinary Clinic, Warsaw, Poland*

<sup>3</sup>*Ústav farmakologie a farmacie, Fakulta Veterinárního lékařství, VETUNI Brno*

<sup>4</sup>*Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, VETUNI Brno*

## **Úvod**

Respirační onemocnění, především pneumonie, jsou velmi častým onemocněním pozorovaným u potkanů chovaných ze záliby (1-3). Plicní léze a abscedace jsou důsledkem závažné infekce, která vede k destrukci buněk respiračního epitelu a tvorbě fibrotické tkáně, kdy se objeví plicní konsolidace (2). Plicní konsolidace je charakterizována zvýšením hustoty tkáně, obvykle jako odpověď na patogenní stimulaci (4). Mezi příčiny plicních konsolidací patří zánět, plicní kontuze, bronchopneumonie nebo dynamický kolaps dýchacích cest, neoplazie, plicní tromboembolie a granulomatózní onemocnění (5). Jednou z možných příčin konsolidace plic je také atelektáza, při které dochází ke kolapsu alveolů z různých příčin, například také při pneumotoraxu, kdy dochází ke kolapsu plíce tlakem vzduchu v pleurální dutině.

Pneumotorax je definován jako přítomnost vzduchu v pleurálním prostoru vedoucí ke ztrátě podtlaku a částečné nebo totální atelektáze plic. Můžeme odlišit pneumotorax spontánní nebo získaný. Mezi dva hlavní typy spontánního pneumotoraxu patří primární (není patrné plicní onemocnění) a sekundární (způsobený probíhajícím plicním onemocněním jako je např. pneumocystóza, mykobakterióza, intersticiální plicní onemocnění nebo plicní fibróza). Patofyziologie sekundárního spontánního pneumotoraxu není zatím úplně objasněná, ale předpokládá se, že vzduch vstupuje do pleurálního prostoru po ruptuře alveolů způsobenou nekrózou nebo jiným mechanismem souvisejícím s probíhajícím plicním onemocněním. Hlavními klinickými projevy je dyspnoe, v humánní medicíně popisují i bolest na hrudi, cyanóza, hypoxemie a hyperkapnie (6 – 9).

## **Materiál a metodika**

### **Výběr případů a kritéria pro zařazení do studie**

Během prospektivní studie bylo celkově vyšetřeno 162 potkanů chovaných ze záliby (99 samic, 63 samců) v období od Července 2023 do ledna 2024 na soukromé veterinární klinice autorů. Věk zvířat se pohyboval od 2 do 32 měsíců ( $18,98 \pm 6,88$  měsíců; průměr $\pm$ SD) a

jejich živá hmotnost byla v rozmezí od 97 g do 885 g ( $461,59 \pm 138,05$  g; průměr $\pm$ SD). Před samotnou diagnostikou prošli všichni potkani celkovým klinickým vyšetřením. Kritéria pro zařazení do studie byla: buď klinické příznaky nebo abnormální poslechový nález dutiny hrudní indikující respirační onemocnění a provedení rentgenu plic (4 pozice). Kritéria pro vyloučení ze studie byla nekompletní rentgenogram nebo ultrasonogram, nekooperativní nebo nestabilní pacienti.

## **Vybavení**

Vyšetření provádíme lineární multifrekvenční sondou (8-14 MHz, SonoScape, S22, Čína, s MI 0,5-0,7, TIS 0,1). Používáme speciální nastavení pro zobrazení plic. Parametry pro harmonizaci jsou v tomto nastavení vypnuté, perzistence je nastavená na nulu, pozice fokusu je umístěna na úrovni pleurální linie a zvýšený zisk (TGC) je nastavený na vzdálenější části sonogramu. Toto nastavení nám vytvoří „hrubší“ obraz, který potřebujeme pro správnou identifikaci artefaktů. Vyšetření bylo provedeno v B-mód zobrazení a v M-mód zobrazení. U všech zvířat byly nahrány smyčky a uloženy obrázky pro možné následné posouzení.

Rentgenogramy plic byly provedeny u všech zvířat zahrnutých ve studii s expozicí 66 kV a 0,12 ms (Gierth HFX90V, Japonsko, 25 mA) ve 4 standardních pozicích: levá a pravá latero-laterální, ventro-dorzální a dorzo-ventrální), exponovány na hrudník.

## **Technika vyšetření**

Vyšetření je prováděno na zvířatech při vědomí (bez nutnosti anestezie nebo sedace). U většiny zvířat není nutné holit srst, obvykle stačí použít dostatečné množství sonografického gelu. Vyšetřující opatrně fixuje zvíře jednou rukou, zatímco druhou rukou drží sondu. Většina zvířat se po počáteční excitaci brzy uklidní a nechá se snadno vyšetřit.

Prvním krokem protokolu RATTUS je umístění sondy kolmo na žebra, marker sondy míří směrem k hlavě (vyšetření axilární a skapulární linie) a následně je sonda otočena o 90°, marker míří směrem ke sternu (je nezbytné dodržovat pozici sondy a markeru, abychom dosáhli standardizovaných výstupů a tím snadné opakovatelnosti vyšetření). Posledním krokem vyšetření je využití tzv. substernálního přístupu, kdy sondu umístíme kolmo na sternum se sternem uprostřed sondy a hodnotíme symetrii inflace plic a případný odsun srdeční siluety (2/3 srdce by měly ležet na levo, 1/3 na pravo). Abychom se vyhnuli přehlédnutí patologických nálezů je nezbytné precizně vyšetřit celé plicní pole od kraniální (brachiální svaly) po kaudální (abdominální znak záclony) a od dorzální (hypaxiální svaly) po ventrální (pektorální svaly) hranice dutiny hrudní. U ventrální hranice je nezbytné precizně vyšetřit kraniální mediastinum, můžeme provést i subjektivní zhodnocení srdce (10).

## **Hodnocené znaky**

Na základě literární rešerše a zkušeností autorů, následující hlavní znaky byly využity: absence klouzání plic (the lung sliding) a plicní bod (the lung point), znak čárového kódu a absence T linií (the barcode sign), abnormální znak záclony a abnormality v substernálním přístupu.

Absence klouzání plic (the lung sliding)

Klouzání plic je sonograficky zobrazitelné jako „třpytění“ pleurální linie. Znázorňuje pohyb parietální a viscerální pleury při nádechu a výdechu a je fyziologickým nálezem. Pokud v nějaké části plic toto klouzání nepozorujeme, existuje řada příčin a jednou z nich může být přítomnost vzduchu v pleurální dutině. Normální sonografické vyšetření plic je výsledek reverberačního artefaktu související s rozhraním měkká tkáň/vzduch. Pokud dojde k pneumotoraxu, vzduch se dostane mezi listy pleur. Výsledný pohled na plicní tkáň je proto stejný s výjimkou klouzání plic, které v případě pneumotoraxu nepozorujeme (je patrná pouze parietální pleura, viscerální pleuru nelze vyšetřit z důvodu přítomnosti vzduchu v pleurální dutině).

#### Plicní bod (the lung point)

Plicní bod je místo, kde je viditelné klouzání plic po přerušení. Vzhledem k tomu, že bývá složité plicní bod u potkanů identifikovat, protože vzdušná plicní tkáň může překrýt místo, kde nám vzduch uniká do pleurálního prostoru, můžeme jeho přítomnost hodnotit také pomocí M-módu, kde je absence klouzání plic viditelná jako znak čárového kódu (the barcode sign), oproti normálnímu znaku moře a pobřeží (the seashore sign). U potkanů je identifikace typických změn v M-módu velmi složitá. Vzhledem k vysoké dechové frekvenci je nezbytné snížit rychlost vyšetření v M-módu na minimum a minimalizovat pohyb zvířete. I u fyziologického nálezu je mnohdy velmi obtížné odlišit znak moře a pobřeží od patologického znaku čárového kódu. Je proto lepší orientovat se na přítomnost tzv. T linií, které zobrazují v M-módu plicní puls (the lung pulse). Plicní puls je přenos srdečního rytmu na povrch plic a jedná se o pohyb, který zaznamenáváme především v lalocích obklopujících srdce. V M-módu tvoří typické vertikální linie přerušující celý sonogram. Pokud nevidíme linie T, nedochází k přenosu srdečního pohybu na pleuru a je vysoce pravděpodobná přítomnost vzduchu v pleurální dutině.

#### Abnormální znak záclony (the curtain sign)

Vzdušné plíce a abdominální orgány by se měly pohybovat synchronně s nádechem a výdechem. Následkem expanze plic, které se plní vzduchem, se na ultrasonogramu utvoří obraz, kdy se plicní tkáň chová jako záclona, která synchronně s nádechem a výdechem skrývá a zase odkrývá orgány dutiny břišní. Pokud je pohyb obrácený nebo asynchronní s dýchacím cyklem, mluvíme o asynchronním znaku záclony. Pokud je abdominální obsah obklopen z obou stran vzdušnými plícemi, mluvíme o tzv. dvojitém znaku záclony.

#### Abnormality v substernálním přístupu

Substernální přístup používáme pro zhodnocení pozice srdeční siluety a symetrie inflace plic. Za fyziologických okolností leží srdce ze 2/3 vlevo a z 1/3 vpravo (porovnávané s mediální linií sternu), pleurální linie pravé i levé plíce je v rovině. Je nezbytné dbát na precizní kolmé umístění sondy ke sternu a pozice sternu přesně do středu lineární sondy, jinak může dojít k falešnému posunu srdce na jednu nebo druhou stranu. Pokud pozorujeme změnu polohy srdce, soustředíme se na průkaz konsolidace/atelektázy na dané straně. Pokud nalezneme ložisko atelektázy na straně, do které se srdce odsouvá, potvrzuje to hypotézu kolabovaného plicního laloku. Pokud naopak ložisko konsolidace odsouvá srdce obráceným směrem, podporuje to hypotézu přítomnosti plicní masy, například abscesu.

## Statistické zhodnocení

Byla stanovena specifická a senzitivita pro jednotlivé znaky (plicní bod, znak čárového kódu, abnormální znak záclony a abnormality v substernálním přístupu) pro jedince u kterých byl/nebyl prokázán pneumotorax. Plocha pod křivkou (AUC) byla vypočítána za využití Receiver Operating Characteristic curves (ROC) s využitím online ROC analysis (Eng, J. ROC analysis: web-based calculator for ROC curves, dostupné z: <http://www.jrocf.it.org>). Interval spolehlivosti byl vypočítán za využití VassarStats (online). Statistická významnost byla stanovena  $P = 0,05$ .

## Výsledky

Kritéria pro zařazení splnilo 151 potkanů (93 samic, 58 samců). Věk zvířat se pohyboval od 2 do 32 měsíců ( $19,08 \pm 6,93$  měsíců; průměr $\pm$ SD) a jejich živá hmotnost se pohybovala od 97 g do 885 g ( $461,27 \pm 138,97$  g; průměr $\pm$ SD). Byla stanovena specifická a senzitivita jednotlivých znaků pneumotoraxu. Výsledky pro jednotlivé znaky jsou sumarizovány v Tab. 1.

**Tab. 1:** RATTUS znaky pneumotoraxu, stanovení specificity a sensitivity daných znaků pro diagnostiku pneumotoraxu.

POTKAN	PLICNÍ BOD	ZNAK ČÁROVÉHO KÓDU	ABNORMÁLNÍ ZNAK ZÁCLONY	ABNORMALITY V SUBSTERNÁLNÍM PŘÍSTUPU
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
3	-	-	+	+
4	-	-	+	+
5	-	-	-	+
6	+	+	+	+
7	+	+	+	+
8	-	-	+	+
9	-	-	+	+
10	-	-	+	+
11	-	-	+	+
12	-	-	+	+
13	-	-	+	+
14	+	+	+	+
15	-	-	+	+
16	+	+	+	-
17	-	-	+	-
18	-	-	+	+

<b>19</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>20</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>CELKEM</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>19</b>	<b>17</b>
<b>SENSITIVITA (%)</b>	<b>35 (95% CI, 0.16- 0.59)</b>	<b>35 (95% CI, 0.16- 0.59)</b>	<b>95 (95% CI, 0.73- 1.0)</b>	<b>85 (95% CI, 0.61-0.96)</b>
<b>SPECIFICITA (%)</b>	<b>100 (95% CI, 0.97- 1.0)</b>	<b>100 (95% CI, 0.97- 1.0)</b>	<b>89 (95% CI, 0.82- 0.93)</b>	<b>71 (95% CI, 0.62-0.78)</b>
<b>CELKOVÝ POČET POTKANŮ BEZ PNEUMOTHORAXU, U KTERÝCH BYL ZNAK POZOROVÁN</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>15</b>	<b>38</b>

## Závěr

RATTUS je neinvazivní metoda pro diagnostiku pneumotoraxu u potkanů. Plicní bod a znak čárového kódu jsou specifické znaky pro tuto diagnózu. Znak záclony není specifickým znakem, vzhledem k tomu, že ho můžeme pozorovat například u geriatrických potkanů, nebo u potkanů s abscedující pneumonií, ale může nás na diagnózu pneumotoraxu navést. Hodnocení symetrie inflace plic, případně odsun srdeční siluety v substernálním přístupu je dalším nespecifickým znakem, který nás může navést na diagnózu pneumotorax.

Sekundární spontánní pneumotorax je u potkanů častou komplikací respiračních onemocnění. Ultrasonografické vyšetření metodou RATTUS, kterou posoudíme přítomnost nebo absenci několika znaků (plicní bod, abnormální znak záclony, hodnocení substernálním přístupem), je možno pneumotorax diagnostikovat bez použití rentgenu nebo počítačové tomografie, u kterých je obvykle nezbytné uvést potkana do celkové anestezie.

## Seznam literatury:

1. Rey F, Bulliot C, Bertin N, Mentré V. Morbidity and disease management in pet rats: a study of 375 cases. *Veterinary Record*. 2015;176:385-385
2. Benato, L. Respiratory diseases in rats. *Companion Animals*. 2012;17:47-50.



3. Kling, M.A. A review of respiratory system anatomy, physiology, and disease in the mouse, rat, hamster, and gerbil. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 2011;14:287-337
4. Miller, A. Practical approach to lung ultrasound. *Bja Education*, 2016;16:39-45.
5. Boysen, S., Gommeren, K., Chalhoub, S. The Essentials of Veterinary Point of Care Ultrasound: Pleural Space and Lung. Španělsko; Edra, 2022:182.
6. Rivas de Andrés JJ, Jiménez López MF, Molins López-Rodó L, Pérez Trullén A, Torres Lanzas J; Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery. Normativa sobre el diagnóstico y tratamiento del neumotórax espontáneo [Guidelines for the diagnosis and treatment of spontaneous pneumothorax]. *Arch Bronconeumol*. (2008);44(8):437-48. Spanish.
7. Sahn SA, Heffner JE. Spontaneous pneumothorax. *N Engl J Med*. (2000) 342(12):868-874.
8. Noppen M. Spontaneous pneumothorax: epidemiology, pathophysiology and cause. *Eur Respir Rev*. (2010) 19(117):217-219.
9. Zarogoulidis P, Kioumis I, Pitsiou G, et al. Pneumothorax: from definition to diagnosis and treatment. *J Thorac Dis*. (2014) 6:S372-S376.
10. Piskovská, A., Kraszewska, K., Hauptman, K., & Jekl, V.. The Rat Thoracic Ultrasound protocol: scanning technique and normal findings. *Frontiers in Veterinary Science*. (2024) 11, 1286614.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 105/2024/FVL***

# Využití parenterální aplikace karboxymaltózy železa v prevenci anémie z nedostatku železa u sajících selat

Martin Svoboda, Jan Vašek, Vojtěch Skupien, Veronika Vítková  
*Veterinární univerzita Brno, Klinika chorob přežvýkavců a prasat*

## Úvod

Anémie prasat z nedostatku železa představuje závažný problém v chovech prasat. Nejběžnějším preventivním opatřením je parenterální aplikace železa. Železo pro parenterální aplikaci je podáváno ve formě železo-sacharidových komplexů. Ty se skládají z minerálního jádra, které je obklopeno sacharidovým obalem. Funkcí sacharidového obalu je stabilizovat komplex a snížit riziko uvolňování volného železa, které může být příčinou nežádoucích účinků. Při podávání jsou komplexy vychytávány retikuloendoteliálními makrofágy (RES). Různé formy železa pro parenterální aplikaci se liší stabilitou komplexu, svojí účinností a výskytem nežádoucích účinků (Geisser et Burckhardt, 2011). Dextran železa je nejčastěji používanou formou železa u sajících selat. Tradičně je doporučována dávka 200 mg Fe<sup>3+</sup> im. u 2-3 dny starých selat. Po intramuskulární aplikaci dextranu železa u selat však byly popsány některé nepříznivé účinky. Volné ionty železa katalyzují tvorbu volných kyslíkových radikálů, které indukují lipoperoxidaci v membránách buněk, a tím je poškozují včetně makrofágů. Tím dochází ke zvyšování vnímavosti organismu k infekcím. Prokázán byl například vyšší výskyt polyartritid. Při výrazném nedostatku antioxidantů (selen, vitamín E) byly u selat popsány i případy fatálních intoxikací (Svoboda et al. 2017). Dextran železa byl používán také pro parenterální aplikaci železa při léčbě anémie u lidí, přičemž bylo zjištěno, že může způsobovat závažné imunologické reakce, včetně fatálních anafylaktických reakcí. Z tohoto důvodu byly hledány nové bezpečnější alternativy. Karboxymaltóza železa (FCM) je nová forma železa pro parenterální aplikaci železa, která neobsahuje dextran, a která se v současné době běžně používá v humánní medicíně. Díky své struktuře je FCM stabilnější než dříve používané přípravky. Je složena z jádra, z hydroxidu železitého stabilizovaného sacharidovým obalem. Tato forma umožňuje kontrolované dodávání železa do buněk retikuloendoteliálního systému (Koduru et Abraham, 2016). U humánních pacientů bylo zjištěno, že FCM vykazuje vyšší účinnost a bezpečnost ve srovnání s dříve používanými preparáty (železo – sacharóza) (Evstatiev et al. 2011). Studie porovnávající účinnost a bezpečnost FCM s dextranem železa u humánních pacientů prokázala srovnatelnou účinnost mezi těmito dvěma skupinami, přičemž nežádoucích účinků bylo zjištěno méně ve skupině s FCM (Hussain et al. 2013). V dostupné literatuře nejsou zatím žádné informace o účinnosti a bezpečnosti použití FCM u selat. Použití FCM u selat by mohlo znamenat alternativu k tradičně používanému dextranu železa. Cílem bylo ověřit použitelnost této aplikační formy v podmínkách chovu prasat.

## **Materiál a metodika**

Celkem bylo použito 24 selat ze tří vrhů. Selata byla před zahájením pokusu označena barevnou ušní známkou do pravého ušního boltce. V experimentu bylo použito tzv. dělených vrhů (split litters), tzn., že selata byla v každém vrhu náhodně rozdělena (randomizace) na tři skupiny. Ve skupině I (n = 8) bylo selatům aplikováno železo ve formě karboxymaltózy železa (Ferinject\*) v dávce 200 mg im. ve věku 3 dnů. Ve skupině II bylo selatům aplikováno železo ve formě dextranu železa (Ferribion\*) v dávce 200 mg i.m. ve věku 3 dnů. Ve skupině III (kontrolní anemická skupina) nebylo aplikováno železo až do věku 10 dní. Ve věku 10 dnů bylo těmto selatům intramuskulárně aplikováno železo léčebně ve formě dextranu železa v dávce 200 mg. Po aplikaci železa byla selata ve všech skupinách klinicky sledována s ohledem na výskyt nežádoucích účinků. Rovněž tak byly zaznamenávány případné lokální změny v místě aplikace železa.

Selata byla odstavena ve věku 25 dnů. Prasnicím a selatům byly předkládány standardní krmné směsi. Vzorky na hematologické a biochemické vyšetření byly odebrány ve věku 3, 10 a 24 dnů z *vena cava cranialis*. Selata byla vážena po narození a vždy při odběrech krve. Množství krve potřebné k vyšetření požadovaných parametrů se pohybovalo v rozmezí 1-3 ml na sele (0,5 ml na EDTA a až 2,5ml na heparin). Jako antikoagulant při odběru vzorků na hematologické vyšetření byla použita EDTA. Jako antikoagulant při odběru vzorku na biochemické vyšetření byl použit heparin. Hematologické vyšetření zahrnovalo tyto parametry: koncentrace hemoglobinu, počet erytrocytů, hematokrit, počet bílých krvinek, počet trombocytů. Dále byly stanoveny hodnoty MCV (střední objem erytrocytu), MCH (střední objem hemoglobinu), MCHC (střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech), RDW (distribuční šíře erytrocytů), MPV (střední objem trombocytů) a PCT (destičkový hematokrit). Biochemické vyšetření zahrnovalo stanovení koncentrace železa v krevní plazmě.

## **Výsledky a diskuze**

U žádného z použitých preparátů nebyly zjištěny nepříznivé vedlejší účinky ani lokální reakce v místě aplikace. Účinnost těchto preparátů byla zhodnocena na základě výsledků hematologického vyšetření a stanovení koncentrace železa v krevní plazmě.

### Červený krevní obraz

Sedm dní po aplikaci železa (3. den) došlo k významnému nárůstu koncentrace hemoglobinu, hematokritu a počtu červených krvinek ve skupinách ošetřených karboxymaltózou železa a dextranem železa. V kontrolní anemické skupině došlo k poklesu těchto parametrů mezi 3. a 10. dnem věku. V této skupině došlo v důsledku aplikace železa ve formě dextranu 10. den věku ke zvýšení koncentrace hemoglobinu a hodnot hematokritu ve 24. dnu věku. Koncentrace hemoglobinu, hematokrit a počet červených krvinek ve skupině, kde byla aplikována karboxymaltóza železa, byly ve věku 10 a 24 dnů srovnatelné se skupinou selat, u kterých byl

podán dextran železa. To ukazuje na srovnateľnú účinnosť týchto dvoch aplikačných foriem v prevencii anémie selat z nedostatku železa.

### Koncentrace železa v krevní plazmě

Sedm dní po aplikaci železa (3. den) došlo k významnému nárůstu koncentrace železa v krevní plazmě ve skupinách ošetřených karboxymaltózou železa a dextranem železa.

V období mezi 10 a 24 dnem došlo jak ve skupině ošetřené karboxymaltózou železa, tak ve skupině, kde byl aplikován dextran železa k výraznému poklesu koncentrace železa krevní plazmě. Dvacátý čtvrtý den koncentrace železa v krevní plazmě dosahovaly v obou těchto skupinách velmi nízkých hodnot. To ukazuje na to, že postupně začalo docházet k vyčerpávání zásob železa, a tím případně i ke zvýšenému riziku rozvoji subklinické formy anémie u odstavených selat. Za této situace lze doporučit v podmínkách daného chovu provádět opakovanou aplikaci železa. Tuto opakovanou aplikaci je doporučováno provádět ve věku 3 týdnů v dávce 200 mg železa na sele (Haugegaard et al. 2008).

### **Závěr**

Z výsledků vyplývá, že parenterální aplikace karboxymaltózy železa vykazuje v prevencii anémie selat srovnateľnou účinnosť s dextranem železa. Vzhledem k nízkým koncentracím železa v krevní plazmě zjištěné ve 24 dnů věku lze v podmínkách daného chovu doporučit provádět opakovanou aplikaci železa.

### **Seznam literatury**

Evstatiev R, Marteau P, Iqbal T, Khalif IL, Stein J, Bokemeyer B, Chohey IV, Gutzwiller FS, Riopel L, Gasche C 2011: FERGICor, a randomized controlled trial on ferric carboxymaltose for iron deficiency anemia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 141: 846-853.

Geisser P, Burckhardt S 2011: The pharmacokinetics and pharmacodynamics of iron preparations. *Pharmaceutics* 3: 12-33.

Haugegaard J, Wachmann H, Kristensen PJ 2008: Effect of supplementing fast growing late-weaned piglets twice with 200 mg iron dextran intra-muscular. *The Pig Journal* 61: 69-73.

Hussain I, Bhoyroo J, Butcher A, Koch TA, He A, Bregman DB 2013: Direct comparison of the safety and efficacy of ferric carboxymaltose versus iron dextran in patients with iron deficiency anemia. *Anemia* 2013: 1-10.

Koduru P, Abraham BP 2016: The role of ferric carboxymaltose in the treatment of iron deficiency anemia in patients with gastrointestinal disease. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 9: 76-85.

Svoboda M, Vaňhara J, Berlinská J 2017: Parenteral iron administration in suckling piglets – a review. Acta Veterinaria Brno 86: 249-261.

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 109/2024/FVL*

## **Příspěvky**

**Fakulty veterinární hygieny a ekologie**

# Vzorci chování orlů mořských v souvislosti s onemocněním Pinching Off Syndrome

Marek Dostál a Jan Škrábal

*Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno*

## Úvod

Orel mořský (*Haliaeetus albicilla*) je jediným zástupcem orlů rodu *Haliaeetus*, jehož hnízdící populace se nachází na území České republiky. Potravní spektrum tohoto dravce je velice široké a z části sezónní, přičemž významným zdrojem potravy jsou pro orly mořské také kadávery uhynulých zvířat. Jakožto fakultativně mrchožravý pták plní orel mořský roli přirozeného sanitáře a poskytuje v ekosystému významnou veterinárně ekologickou službu. V obecném měřítku může být ovšem tato potrava rezervoárem patogenních mikroorganismů, které se alimentární cestou přenosu mohou dostat do těla konzumenta a následně být rozšířeny mezi další organismy (1, 2, 3).

Patogenní mikroorganismy nejsou jedinými původci onemocnění, které může ovlivňovat kvalitu života dravce. Vliv na jeho zdraví mohou mít také například ektoparaziti, těžké kovy a vrozené vývojové vady genetického původu. Jednou z příslušných vad je „Pinching Off Syndrome“ (POS), který způsobuje malformace během růstu opeření křídel a ocasu – letek a rýdovacích per. Takto postižený jedinec poté není schopen letu. Příslušné generalizované abnormality růstu perí jsou v souvislosti s volně žijícími ptáky popsány velice limitně – pouze u jestřábů lesních (*Accipiter gentilis*), jestřábce pestrého (*Kaupifalco monogrammicus*), kání lesních (*Buteo buteo*) a orlů mořských (4).

V rámci satelitní telemetrie, využívající GPS/GSM telemetrická zařízení, je cílem studium behaviorální ekologie zvířat, kdy nedochází ze strany pozorovatele k rušení a ovlivnění etologie pozorovaného jedince. V kombinaci s *in situ* pozorováním a použitím technologie sběru dat prostřednictvím fotopastí jsou výstupem detailní analýzy chování sledovaných živočichů během různých období v roce (5).

Cílem projektu je rozšíření informací ve studiu časoprostorových aktivit orlů mořských během období hnízdění a jejich disperze, porovnání vzorců chování mezi pohlavími a věkovými kategoriemi, a případně mezi zdravými a na POS podezřelými jedinci orlů mořských.

## Materiál a metodika

Celkem 23 jedinců orlů mořských (13 samců a 10 samic) bylo ve věku 7–8 týdnů označeno GPS/GSM telemetrickým zařízením (Ecotone, Ornitela) mezi roky 2017–2024 na území České republiky. Další orli s podezřením na POS byli odchyceni a umístěni do záchranných stanic pro

odbornou veterinární péčí za účelem případného označení telemetrickým zařízením. Příslušným jedincům byl odebrán biologický materiál pro další laboratorní analýzy. Identita jedinců orlů mořských z dlouhodobě sledovaného hnízdícího páru v Branné, kde docházelo k opakovaným výskytům mláďat s POS, byla stanovena prostřednictvím analýzy mikrosatelitů a haplotypizace mtDNA (6, 7).

Data použitá v této práci pocházela z předcházejících let již probíhajícího výzkumu, přičemž nově získané výsledky byly díky tomuto projektu využity jako doplnění robustnějšího datasetu. Ten byl pro účely studia disperze (období mezi opuštěním rodného hnízda a vlastním hnízděním) rozdělen do jednoletých modulů a zahrnoval pouze první noční pozice (nocoviště) za den. Pro analýzu disperze orlů byla použita data do jejich čtvrtého roku života. Analýza hnízdního chování probíhala od prvního kontaktu s hnízdem po opuštění hnízdiště mláďaty a data byla zpracovávána ve 3 h frekvenci. V rámci tohoto projektu jsme studovali chování telemetricky značeného hnízdícího páru orlů mořských a jejich mláďat u Břeclavi.

Z pohledu disperze orlů jsme charakterizovali následující parametry: začátek disperze (stáří mláďete v den odletu od hnízda), pohybová trajektorie (spojnice mezi nocovišti v km), index potulnosti (denní vzdálenost mezi nocovišti v km), index obsazenosti (počet pozic vůči počtu využitých čtverců 10 x 10 km), nejvzdálenější pozice (loxodroma v km) a azimut (°) od rodného hnízda. Parametry hnízdního chování byly: aktivita (denní průměrná vzdálenost od hnízda v km), velikost domovského okrsku (95 % MCP – minimální konvexní polygon v km<sup>2</sup>), nejvzdálenější denní (4:00–22:00) a noční (22:00–4:00) pozice do hnízda v km.

Zpracování dat probíhalo v součinnosti s intenzivním terénním výzkumem *in situ*. Pro analýzu časoprostorových aktivit byl použit software ArcGIS Pro 3.1., respektive software RStudio 2022.07.1. v souvislosti se statistickým vyhodnocením.

## Výsledky

Průměrný začátek disperze orlů mořských byl pro obě pohlaví ve věku 160 dnů. Průměrná délka pohybové trajektorie v průběhu čtyř let dosahovala 4346 km pro samce a 4027 km pro samice ( $p > 0.05$ ). Zaznamenaný průměrný index potulnosti byl během doby sledování orlů 12 km pro samce a 11 km pro samice ( $p > 0.05$ ). Obě pohlaví měla stejný průměrný index obsazenosti 9 ( $p > 0.05$ ). Samci létali v průměru do maximální vzdálenosti 353 km (162°) od hnízda, zatímco samice 255 km (211°) ( $p > 0.05$ ). V žádném z těchto parametrů tedy nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi pohlavími. Také jsme nezjistili vliv pohlaví na chování orlů během jednotlivých let. Rozdíly v aktivitě jsme ovšem zaznamenali ve vztahu k pohybové trajektorii



( $p < 0.05$ ) a indexu potulnosti ( $p < 0.01$ ), kde se aktivita orlů během let zvyšuje. Index obsazenosti se naopak během čtyř let snižoval ( $p < 0.05$ ).

V průběhu hnízdění telemetricky značeného páru orlů mořských létal samec denně v průměru 1.8 km a samice 1.2 km od hnízda. Samec využíval pro hledání potravy a další aktivity 41.4 km<sup>2</sup>, zatímco samice 38.8 km<sup>2</sup>. Nejvzdálenější noční pozice byla 5.8 km pro samce a 1.2 km pro samici. Během dne se samec vzdálil maximálně 15.9 km od hnízda, samice o 2 km méně. Jejich dvě telemetricky sledovaná mláďata snižovala svůj pobyt na hnízdě po 50 dni, přičemž po 90 dnech od značení vysílačkou opustila rodné hnízdo.

Odebraná mláďata s POS onemocněním nebyla po roce intenzivní péče v záchranné stanici schopna letu, a tudíž nemohla být označena telemetrickým zařízením pro monitoring ve volné přírodě. Jejich letky a ocasní pera po dalším pelichání a přepeřování stále nevyrostla do fyziologického stavu. V každé nové růstové generaci opeření došlo naopak k ještě větší deformaci a zkracování per. Během veterinárního vyšetření bylo zjištěno, že uchycení postižených per v dermálních papilách je slabé, osten deformovaný a rozštěpený s nadměrným ukládáním keratinu, letky a ocasní pera jsou extrémně krátké a zakřivené. U dlouhodobě sledovaného hnízda v Branné, kde byla v průběhu 10 let zaznamenávána mláďata s POS, došlo přirozenou cestou k výměně samice v hnízdícím páru. Nově vylíhlá mláďata poté nebyla postižena onemocněním POS.

### **Závěr**

Chování orlů mořských pocházejících z České republiky během disperze se neliší mezi pohlavími. Zjistili jsme, že pohlaví také neovlivňuje disperzi orlů během jednotlivých let telemetrického sledování. Jejich disperze je ovšem ovlivněna věkem, přičemž s narůstajícím věkem stoupá pohybová aktivita a velikost využívané plochy. V námi monitorovaném hnízdícím páru byl aktivnější samec, což souvisí s jeho výhradní rolí při hledání potravy zejména během téměř nepřetržitého pobytu samice na hnízdě z důvodu inkubace vajec a krmení mláďat.

Prostřednictvím tohoto projektu bylo možné detailně studovat vývoj onemocnění POS. Příslušným onemocněním postižený orel mořský je dle našich výsledků potenciálním trvalým hendikepem, není schopen letu, získávání potravy, a tudíž přežití ve volné přírodě. Na základě terénního výzkumu sledování hnízdícího páru orlů v Branné podporujeme hypotézu, že onemocnění POS je s největší pravděpodobností genetického původu přenášené po mateřské linii.

### Seznam literatury:

1. BĚLKA, T. Orel mořský (*Haliaeetus albicilla*). *Zpravodaj SOVDS*. 2023, vol. 19, s. 5–6.
2. HUDEC, K. a ŠŤASTNÝ, K. *Fauna ČR: Ptáci – Aves 2/1*. Praha: Academia, 2005.
3. BLANCO, G. Influence of diet on the gastrointestinal flora of wintering Red Kites. *European Journal of Wildlife Research*. 2014, vol. 60, s. 695–698.
4. MÜLLER, K.; ALTENKAMP, R.; BRUNNBERG, L.; FREYMANN, H.; FRÖLICH, K.; KOLLMANN, R.; KRONE, O.; LITERÁK, I.; MIZERA, T.; SÖMMER, P. a SCHETTLER, E. Pinching Off Syndrome in free-ranging White-tailed Sea Eagles (*Haliaeetus albicilla*) in Europe: Frequency and geographic distribution of a generalized feather abnormality. *Journal of Avian Medicine and Surgery*. 2007, vol. 21, s. 103–109.
5. RYMEŠOVÁ, D.; RAAB, R.; MACHÁLKOVÁ, V.; HORAL, D.; DORŇÁKOVÁ, D.; ROZSYPALOVÁ, L.; SPAKOVŠZKY, P. a LITERÁK, I. First-year dispersal in White-tailed Eagles *Haliaeetus albicilla*. *European Journal of Wildlife research*. 2021, vol. 67, article no. 44.
6. LITERÁK, I.; KRONE, O.; BAUMANN, P.; MIZERA, T. a KARYAKIN, I. Additional Records of Pinching Off Syndrome in White-tailed Eagles. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, under review.
7. HONNEN, A.C.; HAILER, F.; KENNTNER, N.; LITERÁK, I.; DUBSKÁ, L. a ZACHOS, F.E. Mitochondrial DNA and nuclear microsatellites reveal high diversity and genetic structure in an avian top predator, White-tailed Sea Eagle, in Central Europe. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2010, vol. 99, s. 727–737.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 202/2024/FVHE.***

## Využití kávového logru při výrobě biologicky rozložitelných brček

Dominika Kotianová<sup>1</sup>, Lena Zelenka<sup>1</sup>, Jakub Budina<sup>1</sup>, Fouad Ali Abdullah Abdullah<sup>2</sup>,  
Dani Dordević<sup>1</sup>, Bohuslava Tremlová<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,  
Veterinární univerzita Brno*

<sup>2</sup>*Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, Fakulta veterinární  
hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno*

### Úvod

Z důvodu rostoucího povědomí o nepříznivých účincích jednorázových plastů na životní prostředí, ale také na základě restrikcí ze strany Evropské unie, se stále více odborných publikací zaměřuje na vývoj rozložitelných alternativ, které by mohly tyto původní výrobky nahradit (Choeybundit et al., 2024). V rámci intenzivního výzkumu zaměřeného na produkci bioplastů se škrob ukázal jako jedna z klíčových surovin, přičemž obsah amylozy ve škrobu hraje zásadní roli při procesech želatinace a retrogradace, které jsou důležité pro tvorbu filmů (Collado et al., 2023). Právě proto je jedním z perspektivních směrů využití odpadních produktů bohatých na polysacharidy a lipidy, pocházejících z potravinářského průmyslu (Arikan a Bilgen, 2019). Jedním z takových vedlejších produktů je právě kávová sedlina (SCG – Spent Coffee Ground), která je zároveň bohatá i na bioaktivní sloučeniny, jako jsou například polyfenoly, jež jsou schopny příznivě ovlivňovat fyzikální, morfologické a mechanické vlastnosti produkovaných biopolymerů (Dirpan et al., 2023). Hlavním cílem této práce bylo zavést a optimalizovat metodiku výroby brček s přídavkem kávové sedliny a zhodnotit možnosti využití tohoto výrobku v praxi.

### Materiál a metodika

#### Výroba brček

V prvním kroku bylo naváženo odpovídající množství vepřové želatiny, která byla přidána do destilované vody o teplotě 55–60 °C. Následně byl roztok míchán na magnetické míchače, která byla přehřívána na teplotu 60 °C (350 ot./min), až do úplného rozpuštění želatiny. V dalším kroku byl přidán škrob a kávová sedlina. Po homogenizaci byla směs nalita do odměrného válce a namáčením aplikována na povrch formy. Po aplikaci směsi byly formy ponechány k vysušení po dobu 12–24 hodin. Konkrétní navážky jednotlivých surovin jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Složení vzorků brček

Vzorek	Složení
K-RS	25 ml destilované vody + 5 g želatiny + 0,5 g rýžového škrobu
K-BS	25 ml destilované vody + 5 g želatiny + 0,5 g bramborového škrobu
K-KS	25 ml destilované vody + 5 g želatiny + 0,5 g kukuřičného škrobu
RS+SCG	25 ml destilované vody + 5 g želatiny + 0,5 g rýžového škrobu + 0,75 g SCG
BS+SCG	25 ml destilované vody + 5 g želatiny + 0,5 g bramborového škrobu + 0,75 g SCG
KS+SCG	25 ml destilované vody + 5 g želatiny + 0,5 g kukuřičného škrobu + 0,75 g SCG

K – kontrola, RS – rýžový škrob, BS – bramborový škrob, KS – kukuřičný škrob, SCG – spent coffee grounds

#### Měření antioxidační kapacity

Na stanovení množství celkových polyfenolických látek (TPC – Total polyphenol content) bylo nejdříve naváženo přesně 0,1 g vzorku, a následně přidáno 20 ml roztoku ethanol:voda v poměru 1:1. Vzorky byly poté extrahovány po dobu 30 minut v ultrazvukové lázni a přefiltrovány. Následně byl 1 ml extrahovaného vzorku smíchán s 5,9 ml 7,5% roztoku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 5,9 ml zředěného Folin-Ciocalteauova činidla v odměrné baňce o objemu 25 ml. Směs byla inkubována po dobu 30 minut ve tmě. Absorbance byla měřena při vlnové délce 765 nm za použití slepého vzorku. Výsledky byly vyjádřeny jako množství kyseliny gallové v miligramech na gram vzorku.

Antioxidační kapacita metodou FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) byla vyhodnocena po navážení 0,1 g vzorku, do kterého bylo následně přidáno 20 ml roztoku ethanol:voda (1:1). Vzorky byly poté extrahovány po dobu 30 minut v ultrazvukové lázni a přefiltrovány. V tmavých vialkách bylo smícháno 180 µl připraveného extrakt, 300 µl destilované vody a 3,6 ml pracovního roztoku, s obsahem acetátového pufr, TPTZ a FeCl<sub>3</sub>. Vzorky byly inkubovány ve tmě po dobu 8 minut. Absorbance byla měřena při vlnové délce 593 nm a porovnávána s kontrolním vzorkem (pracovní roztok a destilovaná voda). Pro kvantifikaci byla vytvořena kalibrační křivka pomocí Troloxu, přičemž výsledky byly vyjádřeny jako µmol Troloxu na gram vzorku.

#### Měření textury

Texturální parametr/parametry tvrdost (g) a lámavost (mm) byly testovány za použití přístroje TA.XT plus texturometru (Godalming, UK) podle mezinárodní normy ASTM D882-02. Biologicky rozložitelná brčka byla srovnávána s plastovými a papírovými brčky. Vzorky byly upraveny na délku 5 cm a každé měření bylo provedeno třikrát.

## Měření rozpustnosti a obsahu vody

Pro stanovení rozpustnosti brček byly vzorky po nařezání na délku 2 cm a zvážení – hmotnost W1 (KERN, Německo) sušeny v sušárně (Ecoccel 55) při teplotě 105 °C po dobu 2 hodin. Po usušení byly vzorky znovu zváženy (W2). Poté byly vzorky ponořeny do destilované vody a mořské vody a sušeny při pokojové teplotě po dobu 24 hodin. Po 24 hodinách byly opět zváženy (W3). Následně byly vzorky po této inkubaci při pokojové teplotě umístěny do sušárny vyhřáté na 105 °C po dobu 24 hodin a poté znovu zváženy (W4).

Všechny analýzy byly statisticky zpracovány softwarem IBM SPSS.

## Výsledky

Tabulka 2 zobrazuje výsledky měření antioxidační kapacity pomocí metody FRAP a výsledky obsahu celkových polyfenolů. Z těchto výsledků vyplývá, že vzorky obsahující SCG vykazovali výrazně vyšší hodnoty antioxidační kapacity (FRAP) a ve srovnání s kontrolními vzorky ( $p < 0,05$ ). Nejvyšší hodnoty byly dosaženy u vzorku RS+SCG. Analýza antioxidačního potenciálu prokázala taky přítomnost bioaktivních látek, jako jsou polyfenoly. Z výsledků vyplývá, že přídavek SCG pozitivně ovlivnil množství celkových polyfenolů ve vzorcích brček, přičemž nejvyšší hodnota byla dosažena u vzorku K-BS. Tyto látky mohou nejen zlepšit stabilitu brček, ale také přispět k jejich biologické hodnotě.

Tabulka 2: Výsledky antioxidační kapacity metodou FRAP a obsah celkových polyfenolů brček

Vzorek	FRAP ( $\mu\text{mol Troloxu/g}$ )	TPC (mg kyseliny gallové/ml)
K-RS	6,08 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	4,66 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>
RS+SCG	12,48 $\pm$ 0,28 <sup>d</sup>	6,22 $\pm$ 0,54 <sup>bc</sup>
K-BS	5,51 $\pm$ 0,12 <sup>ca</sup>	6,99 $\pm$ 2,22
BS+SCG	10,43 $\pm$ 0,14 <sup>e</sup>	6,61 $\pm$ 0,41 <sup>c</sup>
K-KS	4,18 $\pm$ 0,01 <sup>f</sup>	5,23 $\pm$ 0,70 <sup>ab</sup>
KS+SCG	9,42 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	5,66 $\pm$ 0,86

\* rozdílná písmena v horním indexu značí statisticky významné ( $p < 0,05$ ) rozdíly mezi řádky

Na základě analýzy rozpustnosti a obsahu vody v experimentálně připravených vzorcích brček s přídavkem SCG bylo zjištěno, že obsah vody ve všech vzorcích se pohyboval v rozmezí 9,59–16,57 %, přičemž mezi vzorky nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly. Rozpustnost zjištěná v destilované a mořské vodě, po 24 hodinách, byla 100 % pro všechny typy vzorků.

Výsledky v Tabulce 3 naznačují, že vzorky s přídavkem SCG vykazovaly lepší mechanické vlastnosti ve srovnání s papírovými i plastovými brčky. Nejvyšší tvrdost byla zjištěna u vzorku

RS+SCG ( $11\,500,6 \pm 863,95$  g). Lámavost vzorků s SCG byla nižší, což naznačuje větší odolnost materiálu proti mechanickému namáhání. Tyto výsledky naznačují, že SCG může pozitivně ovlivnit pevnost a celkovou strukturu brček.

Tabulka 3: Výsledky analýzy textury brček

Vzorek	Tvrdost (g)	Lámavost (mm)
K1-Plast	$254,64 \pm 12,51^a$	$3,54 \pm 0,28^a$
K2-Papír	$2\,421,99 \pm 244,49^c$	$29,04 \pm 0,49^b$
KS+SCG	$5\,626,73 \pm 3472,91$	$11,94 \pm 10,12$
BS+SCG	$4\,265,03 \pm 1952,06$	$10,08 \pm 10,83$
RS+SCG	$11\,500,6 \pm 863,95^b$	$4,35 \pm 1,42^c$

\* rozdílná písmena v horním indexu značí statisticky významné ( $p < 0,05$ ) rozdíly mezi řádky

### Závěr

Na základě analýz bylo zjištěno, že přidavek SCG do biologicky rozložitelných brček významně zlepšil jejich mechanické vlastnosti a zvýšil antioxidační kapacitu. Nejlepší výsledky byly dosaženy u vzorku RS+SCG, což poukazuje na pozitivní interakci mezi rýžovým škrobem a SCG. Tyto závěry potvrzují potenciál SCG jako hodnotné suroviny pro udržitelnou produkci bioplastů, která přispívá ke snížení environmentální zátěže spojené s produkcí a používáním jednorázových plastů ve světě.

### Seznam literatury

ARKAN, E. B. & BILGEN H. D. Production of bioplastic from potato peel waste and investigation of its biodegradability. *International Advanced Researches and Engineering Journal*. 2019, 3(2), 93-97.

COLLADO, CH. S. M., YU M. A. C., LABRADOR B. CH. C., DASMARINAS K. M.P., OMICTIN R. D., TAGUD A. G., MEAL R. S. V., ESCASINAS K.T. Utilizing Cassava Starch and Powdered Rice Bran in Making Biodegradable Straws. *Get International Research Journal*. 2023, 1(2), 97-105.

DIRPAN, A., AINANI A. F. & DJALAL M. A Review on Biopolymer-Based Biodegradable Film for Food Packaging: Trends over the Last Decade and Future Research. *Polymers*. 2023, 15(13), 1-33.

CHOEYBUNDIT, W., KARBOWIAK T., LAGORCE A., NGIWNGAM K., AURAS R., RACHTANAPUM P., NOIWAN D., TONGDEESOONTORN W. Eco-Friendly Straws: A Fusion of Soy Protein Isolate and Cassava Starch Coated with Beeswax and Shellac Wax. *Polymers*. 2024, 16(13), 1887.

***Táto práca bola financovaná grantem IGA VETUNI 203/2024/FVHE.***

## Vplyv génov pre metabolizmus na globálny úspech ExPEC kmeňov v koncepte jedného zdravia

Kristína Krúteková<sup>1</sup>, Kristína Nešporová<sup>2</sup>, Jana Palkovičová<sup>3</sup>, Monika Dolejská<sup>1,3</sup>, Sander Govers<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, <sup>2</sup>Ústav biologie, KU Leuven, Belgicko, <sup>3</sup>CEITEC, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

### Úvod

Extraintestinálne patogénne kmene *Escherichie coli* (ExPEC) vyvolávajú mnoho závažných infekcií (meningitídy, bakterémie). Jedným z kmeňov ExPEC je *E. coli* ST744. Tento kmeň nesie multirezistenciu k antibiotikám a je globálne rozšírený. Jeho izolácia z rôznych zdrojov (klinický materiál, odpadové vody, voľne žijúce vtáky) naznačuje výborné prispôsobenie sa podmienkam prostredia a úspech v konkurenčnom boji (1, 2). Preliminárne sekvenačné dáta dokázali prítomnosť génov pre metabolizmus, pri ktorých sa predpokladá, že posilňujú celkovú *fitness* tohto kmeňa. Doteraz však chýbajú štúdie, ktoré by sa tejto tematike venovali podrobnejšie. Preto bude cieľom tohto projektu určiť vplyv génov pre metabolizmus na *fitness E. coli* ST744 v rôznych podmienkach.

### Materiál a metódika

Na základe preliminárnych genomických dát bolo vybraných spolu 30 kmeňov *E. coli* rôznych sekvenčných typov (ST). Vzorky pochádzali hlavne z Českej republiky a boli zmesou klinických izolátov, izolátov z odpadových vôd, hydiny a voľne žijúceho vtáctva. Zbierku vybraných izolátov tvorili *E. coli* ST744 (n=23) a *E. coli* iného ST (ST57, ST69, ST93, ST131, ST155, ST354 a ST457). U všetkých vzoriek bola stanovená hodnota minimálnej inhibičnej koncentrácie s použitím komerčne dostupnej testovacej súpravy MIC GN 1 a GN 2 (96-jamková mikrotitračná platnička s obsahom antimikrobiálnych látok v zostupnom koncentračnom gradiente). Farebná zmena bola po inkubácii vyhodnotená vizuálne a hodnoty boli porovnané s hodnotami uvedenými v EUCAST.

Pre sledovanie účinku génov pre metabolizmus bolo vybratých 15 kmeňov (12 kmeňov *E. coli* ST744 a *E. coli* ST 69, ST155 a ST354). Vzorky sme vykultivovali na platni s LB agarom pri 37°C, cez noc. Následne sme preniesli jednu kolóniu do tekutého LB média a kultivovali 18 hodín

pri 37°C, za stáleho trepania (200 RPM). Na druhý deň sme kultúru v 96-jamkovej mikrotitračnej platničke nariadili v pomere 1:100.

Meranie prebehlo na prístroji Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Biotek, USA), v 96 jamkovej platničke (200 µl kultúry/jamka). Kmene boli počas všetkých experimentov kultivované 24 hodín a meranie optickej denzity prebiehalo v 15-minútových intervaloch. Na základe prítomnosti génov pre *cold-shock* proteíny u kmeňov *E. coli* ST744, sme sledovali vplyv teploty na rýchlosť rastu a nástup lag fázy. Kultivácia v LB médiu, bez prídavku antibiotika, prebehla pri 25°C, 37°C a 42°C. Druhý gén, na ktorý sme sa zamerali bol *betU*, kódujúci transportér pre osmoprotektívny glycín betaín. Na základe toho boli zvolené podmienky: LB médium s obsahom 2,5% NaCl, LB médium s obsahom 2,5% NaCl a prídavkom 150 µM glycín betaínu a LB médium bez aditív. Kultivácia prebehla pri 37°C. *Fitness* kmeňov v osmotickom strese a rozdielnych teplotách sme porovnali u jednotlivých kmeňov v rôznych podmienkach na základe rýchlosti rastu ( $V_{max}$ ) a nástupu lag fázy (Lagtime).

Na získanie komplexnejších informácií o *E. coli* ST744 boli kmene analyzované fluorescenčnou mikroskopiou s použitím DAPI farbenia (4',6-diamidino-2-fenylindol, modré fluorescenčné farbivo).

## Výsledky

Každý testovaný kmeň bol multirezistentný, pričom vykazoval rezistenciu aspoň ku štyrom rôznym antibiotikám. Najvyššia rezistencia bola zaznamenaná voči teracyklínom (tigecyklín) a fluorochinolónom (ciprofloxacín), na ktoré bolo rezistentných 100 % testovaných kmeňov. Rezistenciu k nechráneným penicilínom (ampicilín, piperacilín) vykazovalo 96 % kmeňov. Rezistencia k cefalosporínom (cefuroxím) sa vyskytovala u 36 % izolátov, pričom na cefepím boli takmer všetky izoláty citlivé. Rezistencia na karbapenémy bola ojedinelá.

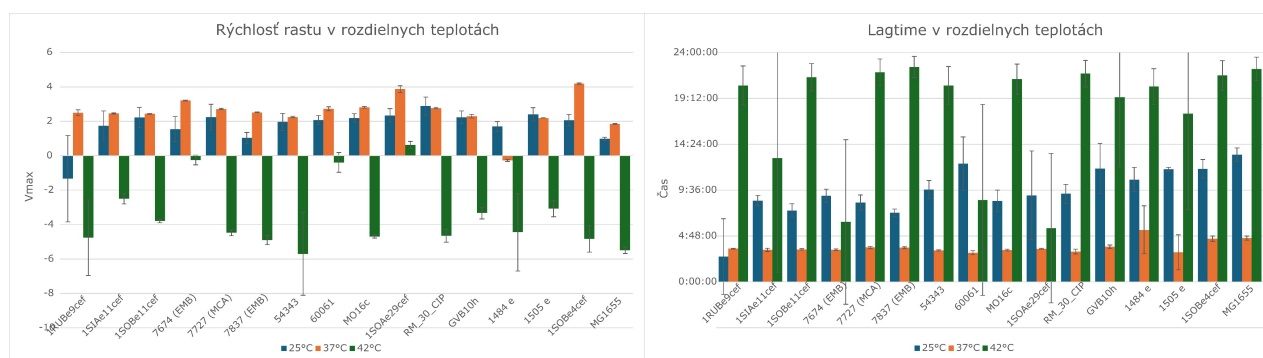
Komparatívna genomika odhalila, že *E. coli* ST744 obsahuje špecifickú variabilnú oblasť, ktorá chýba v genóme MG1655. Sekvenovaním dlhými čítaniami boli v tejto oblasti identifikované gény rezistencie na antibiotiká, ortuť a dezinfekčné látky (kvartérne amónne zlúčeniny). Táto oblasť obsahuje aj gén *betU* pre transportér glycín betaínu, ktorý chráni bunky pred osmotickým stresom. ST744, rovnako ako MG1655, obsahuje gény pre *cold-shock* proteíny, ktoré znižujú riziko degradácie RNA pri nízkych teplotách. Obsah génov pre metabolizmus u jednotlivých kmeňov vybraných pre rastové krivky je znázornený v Tabuľke č. 1



**Tabuľka č. 1:** Prítomnosť génov pre metabolizmus u kmeňov *E.coli*. Modré – prítomné, biele – neprítomné

Názov kmeňa	ST	BetU protein	cold shock proteíny
1RUBe9cef	ST744		
1SIAe11cef	ST744		
1SOBe11cef	ST744		
7674 (EMB)	ST744		
7727 (MCA)	ST744		
7837 (EMB)	ST744		
54343	ST744		
60061	ST744		
MO16c	ST744		
1SOAe29cef	ST744		
RM_30_CIP	ST744		
GVB10h	ST744		
1484 e	ST354		
1505 e	ST155		
1SOBe4cef	ST69		
MG1655	K12		

Na základe rastových kriviek ( $V_{max}$  a Lagtime) sme dokázali, že prítomnosť *cold-shock* proteínov má pozitívny vplyv na fitness kmeňov. V suboptimálnej teplote ( $25^{\circ}\text{C}$ ) bol *fitness* kmeňov obsahujúcich *cold-shock* proteíny podobný optimálnej teplote ( $37^{\circ}\text{C}$ ). Na druhú stranu, pri teplote  $42^{\circ}\text{C}$  boli namerané hodnoty výrazne odlišné, rýchlosť rastu bola výrazne nižšia a Lagtime výrazne vyšší (Obrázok č. 1).



**A** **B**  
**Obrázok č. 1** Vplyv teploty na kmene obsahujúce *cold-shock* proteíny. A - Vplyv teploty na  $V_{max}$ , B - Vplyv teploty na Lagtime.

Rýchlosť rastu a Lagtime kmeňov *E. coli* ST744 obsahujúcich gén *betU* sa významne nelíši v podmienkach s osmotickým stresom (prídavok NaCl, prídavok NaCl a betaínu). Prítomnosť *betU* nemá, v nami použitých podmienkach, výrazný vplyv na *fitness* kmeňov.

Pomocou fluorescenčnej mikroskopie bolo dokázané, že medzi živými bunkami *E. coli* ST744 je vysoká variabilita aj napriek tomu, že ide o blízko príbuzné kmene s rovnakým až identickým genetickým obsahom.

### Záver

Všetky kmene *E. coli* ST744 vykazovali multirezistenciu. Najvyššia rezistencia bola zaznamenaná voči tetracyklínom a fluorochinolónom, zatiaľ čo rezistencia voči karbapenémom bola ojedinelá. Komparatívna genomika odhalila špecifickú variabilnú oblasť v genóme ST744, obsahujúcu, okrem iného, aj gény pre transportéry osmoticky ochranného glycín betaínu, ktoré v referenčnom kmeni MG1655 chýbajú.

Prítomnosť génu *betU* nepreukázala výrazný vplyv na *fitness* kmeňov v testovaných podmienkach osmotického stresu. Na druhú stranu sme potvrdili ochrannú úlohu *cold-shock* proteínov pri suboptimálnych kultivačných podmienkach. Fluorescenčná mikroskopia odhalila vysokú fenotypovú variabilitu medzi živými bunkami ST744, napriek ich takmer identickému genetickému obsahu.

Tento projekt prináša nové poznatky o genetickej variabilite a metabolizme *E. coli* ST744, čím prispieva k lepšiemu pochopeniu mechanizmov adaptácie týchto kmeňov.

### Seznam literatury:

1 ĆWIEK, Katarzyna, et al. Phenotypic and genotypic characterization of *mcr-1*-positive multidrug-resistant *Escherichia coli* ST93, ST117, ST156, ST10, and ST744 isolated from poultry in Poland. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2021, 52.3: 1597-1609.

2 ABRAHAM, Sam, et al. First detection of extended-spectrum cephalosporin- and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in Australian food-producing animals. *Journal of global antimicrobial resistance*, 2015, 3.4: 273-277.

***Táto práca bola financovaná grantom IGA VETUNI 206/2024/FVHE***

## Ko-evoluce bakteriálních patogenů a plazmidů s využitím metody CRISPR-Cas9

Markéta Ryšavá<sup>1,2</sup>, Michaela Růžičková<sup>1,2</sup>, Monika Dolejšká<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, <sup>2</sup>CEITEC, Veterinární univerzita Brno

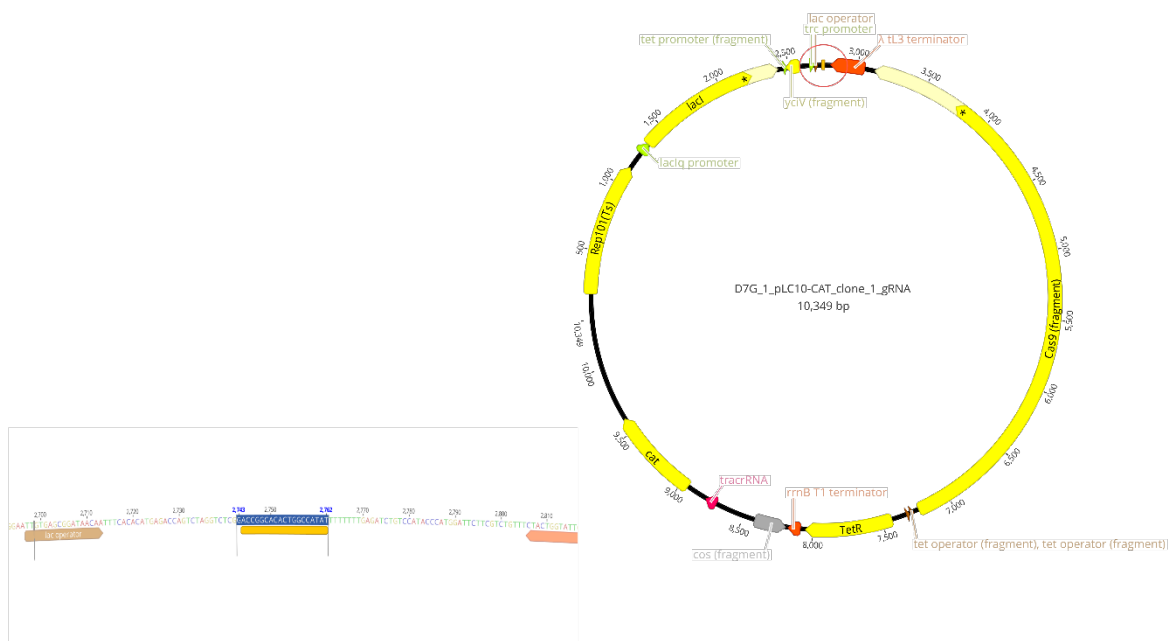
### Úvod

Antibiotická rezistence je přirozený jev spojený s rozsáhlým užíváním antibiotik, který představuje jeden z nejzávažnějších problémů 21. století [1]. Mezi patogeny s antibiotickou rezistencí nabývá na důležitosti *Escherichia coli*. Přirozeně je citlivá k většině antibakteriálních látek, avšak tento druh je schopen akumulovat geny rezistence a horizontálně je přenášet. Hlavní roli v šíření antibiotické rezistence sehrávají plazmidy, což jsou kruhové molekuly DNA schopné replikace nezávisle na chromozomu, které se přenášejí mezi bakteriemi pomocí konjugace. Navzdory tomu, že plazmidy poskytují bakteriím výhody pro přežití, zároveň představují pro buňku určitou energetickou zátěž. To se projevuje horším růstem a nižší schopností udržet se v prostředí bez antibiotik ve srovnání s kmenem bez plazmidu. Bakterie tuto zátěž vyrovnávají pomocí mutací na plazmidech či chromozomech tzv. kompenzační evolucí [2]. Aby bylo možné vyhodnotit přínos a zátěž, které plazmidy bakterii poskytují, je potřebné nejprve plazmid z buňky odstranit. Pro tento krok byla zvolena inovativní metoda CRISPR-Cas9. Většina dosavadních výzkumů se soustředila na malé, jednoduché plazmidy v laboratorně upravených bakteriálních kmenech. Takové experimentální nastavení však nedokáže plně odhalit reálné dopady plazmidů na fitness bakterie v jejich přirozených hostitelích, a nakonec zkresluje informace o skutečných procesech v reálném prostředí. Proto byly vybrány plazmidy a bakterie, které se v posledních letech šíří u člověka, zvířat a v prostředí, s cílem nastavit experiment, který co nejlépe odráží aktuálně probíhající procesy.

### Materiál a metodika

Soubor k testování byl vybrán na základě výsledků analýzy naší kolekce 400 kmenů ExPEC (extraintestinální patogenní *Escherichia coli*), které byly získány z České republiky a ze zahraničí v předchozích studiích [3]. Naše sbírka zahrnuje izoláty z různých zdrojů včetně pacientů, domácích, hospodářských a volně žijících teplokrevných zvířat a prostředí. Izoláty již byly dříve osekvenovány metodou krátkých čtení, a na základě těchto genotypových dat byly vybrány vhodné kmeny k odstranění plazmidu. Selektce probíhala na základě počtu plazmidů, genů rezistence aj. Izoláty *E. coli* byly pro účely charakterizace rezistentního fenotypu podrobeny testům citlivosti k antibiotikům za účelem stanovení minimální inhibiční koncentrace [4]. Komparací fenotypových a genotypových dat byl vybrán soubor 15–20 kmenů, na které byl následně navržen plazmidový

vektor nesoucí CRISPR systém, jehož úkolem bylo odstranit z daných kmenů cílový plazmid. Byl vytvořen návrh vektoru CRISPR-Cas9 s naváděcí RNA specifickou pro sekvenci nacházející se výhradně na plazmidu, nikoliv na bakteriálním chromozomu, aby se předešlo nechtěnému poškození chromozomu. Cílová sekvence byla zaměřena na toxin z toxin-antitoxinového systému, přítomný pouze na plazmidu. Po syntéze ve formě oligonukleotidu byla sekvence zaklonována pomocí klonovací metody Golden Gate Cloning [5] do vektoru pLC10 s genem pro rezistenci k chloramfenikolu. Takto připravený vektor byl elektroporací přenesen do nových laboratorních buněk. Buňky byly kultivovány na LBA (Luria Bertani agar) médiu společně s chloramfenikolem. Bylo vybráno 10 kolonií, které byly ověřeny pomocí PCR a elektroforézy. Správné zařazení naváděcí RNA bylo ověřeno Sangerovým sekvenováním. Z vybraných kmenů byly připraveny elektrokompetentní buňky pro následnou elektroporaci plazmidovým vektorem. Plazmidový vektor s naváděcí RNA byl vyizolován z laboratorních buněk a takto připravená DNA byla elektroporována do vybraných kmenů. Elektroporace byla úspěšná u osmi kmenů. Následně byl u těchto kmenů aktivován CRISPR-Cas9 systém. Poté byly izoláty naočkovány na LB médium bez antibiotika a 3 hodiny inkubovány v 37 °C pro eliminaci termolabilního vektoru. Po třech hodinách byly izoláty naočkovány na petriho misky s chloramfenikolem, který indikuje přítomnost vektoru. Dále na médium s cefotaximem, který potvrzuje přítomnost cílového plazmidu a na médium bez antibiotika. Vzhledem k nárůstu izolátů na miskách s cefotaximem, je zřejmé, že nedošlo k eliminaci plazmidu.



**Obrázek 1.** Sekvence vektorového plazmidu pLC10 s genem rezistence na chloramfenikol a zaklonovanou navrženou naváděcí sekvencí RNA.

## Výsledky

Byl úspěšně navržen CRISPR-Cas9 vektor obsahující naváděcí RNA specifickou pro sekvenci nacházející se výhradně na plazmidu. Naváděcí sekvence byla syntetizována jako oligonukleotid a úspěšně zaklonována do vektoru pLC10 nesoucího gen pro rezistenci k chloramfenikolu pomocí metody Golden Gate Cloning. Elektroporace vektoru do laboratorních buněk byla úspěšná. Elektroporace do klinicky významných kmenů byla úspěšná u 40 % (8 z 20) transformovaných kmenů.

V rámci tohoto projektu byla navržena naváděcí RNA zaměřená na antitoxin v toxin-antitoxinovém systému plazmidu s cílem eliminovat tento systém a narušit stabilitu plazmidu. Avšak při následných analýzách bylo zjištěno, že plazmidy testovaných kmenů obsahují nejen jednotlivé toxin-antitoxinové systémy, ale i vícečetné varianty těchto systémů, což činí pokus o eliminaci složitější. Navíc byly identifikována přítomnost antiCRISPR systémů, které mohou potlačit účinnost CRISPR-Cas9, čímž výrazně snižují úspěšnost odstranění plazmidu.

Tyto složité vlastnosti plazmidů nebyly zcela odhaleny v původní analýze prováděné pomocí sekvenování krátkých čtení, která poskytuje pouze omezený přehled o celkové struktuře plazmidu. Abychom získali podrobnější informace o struktuře a obsahu těchto plazmidů, bylo nezbytné podrobit testované kmeny dodatečnému sekvenování dlouhých čtení.

Tato dodatečná analýza umožnila podrobnější pochopení plazmidové biologie testovaných kmenů a odhalila faktory ovlivňující úspěšnost eliminace plazmidů. Ačkoliv nebyl experimentální plán realizován v plném rozsahu, analýza plazmidových systémů, včetně toxin-antitoxinových a antiCRISPR mechanismů, poskytla nový pohled na výzvy spojené s použitím CRISPR-Cas9 u klinických bakterií. Získané poznatky během realizace projektu poskytly cenné informace, které významně přispěly k hlubšímu porozumění komplexním interakcím mezi klinickými bakteriálními kmeny, plazmidy a CRISPR-Cas9 systémy.

## Závěr

Výsledky navrhovaného projektu přinesly klíčové poznatky o komplexnosti odstraňování plazmidů z klinicky významných bakterií pomocí CRISPR-Cas9 systému. Úspěšně byla navržena a implementována strategie cíleného odstranění plazmidů zaměřená na toxin-antitoxinové systémy. Experimenty však odhalily přítomnost vícečetných toxin-antitoxinových systémů a antiCRISPR mechanismů, které výrazně omezily účinnost CRISPR-Cas9. Dodatečné sekvenování dlouhých čtení poskytlo detailnější vhled do struktury plazmidů, čímž objasnilo faktory ovlivňující jejich stabilitu a schopnost eliminace. Výsledky tohoto projektu zdůrazňují potřebu dalšího výzkumu

zaměřeného na překonání obranných mechanismů plazmidů a poskytují nové směry pro využití CRISPR-Cas9 v řešení problému antibiotické rezistence.

### **Seznam literatury:**

[1] POOLMAN, JT., et al., 2016. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*, a Common Human Pathogen: Challenges for Vaccine Development and Progress in the Field. *J Infect Dis*; 213: 6-13

[2] San Millan, A., 2018. Evolution of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in the Clinical Context. *Trends in Microbiology* 26, 978–985. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.06.007>

[3] JAMBOROVA, I., et al., 2018. *Extensive Genetic Commonality among Wildlife, Wastewater, Community, and Nosocomial Isolates of Escherichia coli Sequence Type 131 (H30R1 and H30Rx Subclones) That Carry blaCTX-M-27 or blaCTX-M-15*. *Antimicrob Agents Chemother*; pii: e00519-18.

[4] ANDREWS, JM., 2001. *Determination of minimum inhibitory concentrations*. *J Antimicrob Chemother*; 48 Suppl 1:5-16.

[5] Engler, C., Marillonnet, S., 2014. *Golden Gate Cloning*. In: Valla, S., Lale, R. (eds) *DNA Cloning and Assembly Methods*. *Methods in Molecular Biology*, vol 1116. Humana Press, Totowa, NJ. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-764-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-764-8_9)

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 208/2024/FVHE.***

# ***Escherichia coli* ST131 virotyp E: komplexní genomická analýza vysoce klonální multirezistentní linie a jejího šíření v prostředí**

Michaela Růžičková<sup>1,2</sup>, Ivo Papoušek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, <sup>2</sup>CEITEC, Veterinární univerzita Brno

## **Úvod**

Neustále se zvyšující antibiotická rezistence bakterií představuje rozsáhlý problém nejen v oblasti humánní a veterinární medicíny, ale také v případě volně žijících zvířat a životního prostředí. Gramnegativní bakterie, včetně *Escherichia coli*, představují rozsáhlou skupinu rezistentních mikroorganismů kolonizujících různá prostředí. *E. coli* sekvenční typ (ST) 131 patří mezi celosvětově rozšířené klonální linie multirezistentních kmenů. Tato linie je z velké části zodpovědná za vznik nozokomiálních nákaz, ale také za infekce drůbeže a domácích zvířat. Vysoká míra výskytu konjugativních plazmidů zvyšuje pravděpodobnost šíření genů rezistence i virulence, a vede k tomu, že je v dnešní době tento ST hlavní linií zodpovědnou za šíření širokospektrých beta-laktamáz.

Mimo běžné fylogenetické skupiny A, B, C0, C1 a C2 [1] je možné ST131 rozdělovat do virotypů A, B, C, D, E a F charakterizovaných vybranými faktory virulence. V našem projektu se zaměřujeme na virotyp E, který je asociován s fylogenetickou skupinou C2. Skupina virotypu E se vyznačuje poměrně vysokou klonalitou, a to jak mezi izoláty získanými z jednoho zdroje, tak mezi izoláty pocházejícími z různých prostředí. U izolátů nalezených u pacientů s infekcemi močových cest se také často vyskytuje genomický ostrov *pheU*, na kterém se obvykle nachází gen *cnf1* zodpovědný za produkci cytotoxického nekrotizujícího faktoru spolu s operonem *hlyCABD* zapříčínujícího produkci toxinů ze skupiny hemolysinů. U tohoto genomického ostrova je často diskutován přenos mezi různými kmeny *E. coli* za pomoci konjugativních IncF plazmidů [2, 3]. Objevena byla také přítomnost *arc* operonu pro utilizaci argininu ohraničeného inserčními sekvencemi, díky nimž je tento operon podobně jako výše zmíněné geny nejčastěji přenášen na konjugativních IncF plazmidech.

## **Materiál a metodika**

V projektu byly charakterizovány a porovnány bakterie rezistentní k antibiotikům běžně využívaným v klinické praxi. Testovaná sbírka 108 *E. coli* ST131 virotypu E se skládala ze vzorků získaných během sběru izolátů *E. coli* ST131 v průběhu let 2009–2021. Bylo také analyzováno 1482 sekvencí virotypu E stažených z globální databáze Enterobase. Z celkového počtu 1590

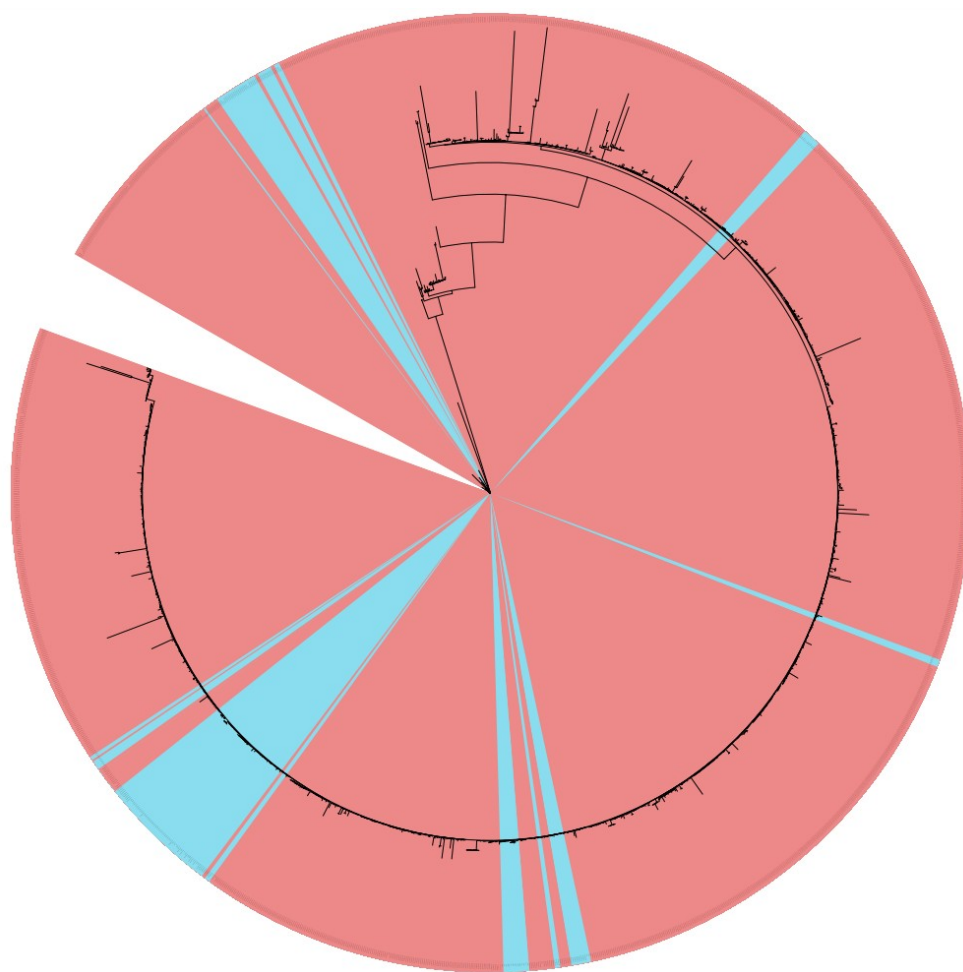
sekvencí virotypu E pocházelo 557 sekvencí z Evropy, 494 ze Severní Ameriky, 274 z Oceánie, 226 z Asie, 20 z Jižní Ameriky a 19 z Afriky. Našich 108 izolátů *E. coli* virotypu E bylo pro účely doplnění dat z celogenomového sekvenování (WGS) o analýzu rezistentního fenotypu otestováno na citlivost k vybraným antibiotikům ze třídy betalaktamů, fluorochinolonů a karbapenemů. Dosud neosekvenované izoláty spadající do sbírky ST131 byly podrobeny WGS analýze krátkých čtení pro případné odhalení dalších zástupců virotypu E. Celogenomová DNA na WGS byla extrahována kitem NucleoSpin® Tissue a sekvenování proběhlo na platformě NovaSeq 6000 (Illumina). Kvalitativní kontrola získaných dat byla provedena softwarem Trimmomatic, ve kterém byly ořezány adaptorové sekvence a odfiltrovány sekvence s nižší kvalitou. Upravená data byla poskládána v programu SPAdes. Pomocí nástroje MLST [4] byl potvrzen ST131. Sekvenční data byla charakterizována v programu PlasmidFinder ve webovém rozhraní Center for Genomic Epidemiology (CGE; <https://www.genomicepidemiology.org>), který nám pomohl identifikovat plazmidy nesené izoláty a zařadit je do příslušných inkompatibilních skupin. S využitím algoritmů ResFinder a VirulenceFinder (oba CGE) byly detekovány geny rezistence k antibiotikům a virulenční faktory. V závislosti na ST IncF plazmidů a přítomných genů rezistence byly vybrány reprezentativní izoláty pro sekvenování dlouhých čtení na platformě MinION (Oxford Nanopore Technologies) a DNA těchto izolátů byla izolována kity NucleoBond HMW DNA a Nanobind CBB Big DNA. Tato data byla poskládána s využitím nástroje Unicycler a získané sekvence plazmidů byly anotovány v programu Bakta. V softwaru RStudio [5] byly provedeny fylogenetické analýzy včetně vytvoření fylogenetických stromů a heatmap založených na jednonukleotidových polymorfismech, které nám pomohly sledovat příbuznost izolátů této linie. Tyto analýzy byly provedeny jak na našich izolátech, tak na veřejně dostupných sekvencích, a poskytly tak komplexní přehled o *E. coli* ST131 virotypu E.

## Výsledky

V rámci studie byla zhodnocena sbírka 108 izolátů *E. coli* ST131 virotypu E pocházející z České republiky, a data byla porovnána s globální sbírkou 1482 sekvencí získaných z veřejně dostupné databáze Enterobase. Ze 108 izolátů naší sbírky jich 105 (97,22 %) neslo IncF plazmidy s nejčastějšími sekvenčními typy F31/F36:A4:B- (63/108; 58,33 %), F36:A4:B1 (18/108; 16,67 %) a F29:A-B10 (10/108; 9,26 %). Právě přítomnost plazmidů nesoucích varianty alel F31, F36, popř. F31/F36 je spojována s výskytem *arc* operonu, který byl nalezen u všech takových kmenů. Z celé naší sbírky byl *arc* operon nalezen u 89/108 (82,41 %) izolátů, což je signifikantně vyšší podíl než u souboru sekvencí z Enterobase, kde se *arc* operon nacházel u 776/1482 (52,36 %) genomů. To by mohlo být vysvětleno například blízkou příbuzností našich izolátů, které ukázaly průměrný rozdíl



571 jednonukleotidových polymorfismů (SNP; *single-nucleotide polymorphism*) oproti 799 SNP nalezených ve sbírce stažených genomů. U 100 % (108/108) izolátů naší sbírky byl nalezen gen *cnf1* a gen *hlyA*, které často bývají spojovány právě s přítomností *arc* operonu. Sekvenování dlouhých čtení bylo provedeno na 12 reprezentativních izolátech a potvrdilo lokalizaci genů *cnf1* a *hlyA* na stejných plazmidech, na kterých se vyskytoval i *arc* operon. Vzhledem k nižší prevalenci *arc* operonu oproti těmto genům však nebyla úplná souvislost mezi jejich společnou přítomností potvrzena. Geny *hlyB*, *hlyC*, *hlyD* a *hlyE*, které spolu s *hlyA* často tvoří operon *hlyCABD* kódující produkci hemolysinu, nebyly nalezeny u žádného z izolátů za pomoci sekvenování krátkých ani dlouhých čtení. U 96,30 % (104/108) izolátů naší sbírky byl také nalezen gen *bla<sub>CTX-M</sub>*, který kóduje rezistenci k beta-laktamům jakožto nejčastěji používané skupině antibiotik, což korelovalo s 93,05 % (1379/1482) pozitivních sekvencí ze souboru stažených genomů. V rámci analýz příbuznosti mezi sbírkou stažených genomů a našimi izoláty byl na základě SNP sestaven fylogenetický strom (Obr. 1) a SNP matice zobrazující genetické vzdálenosti mezi jednotlivými izoláty. Dle těchto výsledků se naše izoláty mísí s genomy pocházejícími z různých částí světa a vykazují blízkou fylogenetickou příbuznost bez ohledu na zdroj a místo odběru.



**Obrázek 1.** Fylogenetický strom zobrazující distribuci izolátů pocházejících z naší sbírky (modrá barva) a sekvencí získaných z databáze Enterobase (červená barva)

## Závěr

Studie nabízí pohled na sbírku izolátů *E. coli* ST131 virotypu E pocházejících z České republiky a sekvencí z veřejně dostupné databáze Enterobase. Většina izolátů z obou sbírek byla asociována s epidemiologicky významnými IncF plazmidy. Téměř u všech izolátů obou sbírek byl také nalezen gen *bla*<sub>CTX-M</sub> pro rezistenci k beta-laktamovým antibiotikům. Byly prozkoumány genetické vzdálenosti mezi jednotlivými izoláty. Naše izoláty zde vykazují blízkou fylogenetickou příbuznost s genomy z různých částí světa, což potvrzuje vysokou klonální podobnost této linie napříč celým světem.

## Seznam literatury:

[1] NICOLAS-CHANOINE, MH., et al. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev.*, 2014, 27(3):543-74.

[2] PAJAND, O., et al. Arrangements of mobile genetic elements among virotype E subpopulation of *Escherichia coli* sequence type 131 strains with high antimicrobial resistance and virulence gene content. *mSphere*, 2021, 6:e00550-21.

[3] BARRIOS-VILLA, E., et al. Adherent/invasive *Escherichia coli* (AIEC) isolates from asymptomatic people: new *E. coli* ST131 O25:H4/H30-Rx virotypes. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*, 2018, 17:42.

[4] LARSEN, MV., et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012, no. 50, s. 1355–61.

[5] RACINE, JS. RStudio: A Platform-Independent IDE for R and Sweave. *Journal of Applied Economics*. 2012, no. 27, s. 167–172.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 209/2024/FVHE.***

# Mikrobiální kvalita a další vybrané charakteristiky výrobků jerky na českém trhu

Helena Veselá, František Ježek, Marta Dušková, Josef Kameník, Simona Ondruchová,

Sára Pokorná, Sofia Varšová, Natálie Fialová

*Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno*

## Úvod

Jerky představuje jeden z nejstarších masných výrobků, který se konzervuje sušením při relativně nízkých teplotách. Tyto snacky jsou oblíbenými produkty u konzumentů kvůli snadno dostupnému zdroji bílkovin, specifické chuti a dlouhé trvanlivosti. Jerky se navíc vyznačuje nízkým obsahem sacharidů a tuků. Mezi spotřebiteli je nejoblíbenějším druhem hovězí jerky, ale na vzestupu jsou i výrobky z jiných druhů masa (Yang et al., 2009). Kvalita sušeného masa je ovlivněna řadou faktorů, jako je množství intramuskulárního tuku, věk a plemeno zvířat, technika sušení a použité přísady. Fyzikálně-chemické parametry, mikrobiologické parametry a senzorické vlastnosti jsou základními ukazateli kvality sušeného masa. Z důvodů používání nižších teplot a vyššímu riziku křížové kontaminace při výrobě může představovat pro spotřebitele jisté riziko. Mikrobiologický profil sušeného masa je ovlivněn snížením obsahu vody v mase, které způsobí omezení nebo zastavení růstu mikroorganismů. Nízká aktivita vody ale může přispívat k rozvoji plísní. Změna pH nebo kontaminace vzdušnou atmosférou může poskytnout podmínky pro růst bakterií mléčného kvašení (BMK) (Mediani et al., 2022). Některé druhy patogenních bakterií, jako je *Salmonella* spp., *S. aureus*, klostridia ad., mohou proces sušení přežít (Mishra et al., 2017). *Listeria monocytogenes* může přežívat a množit se i při nízkých teplotách, což zvyšuje riziko kontaminace (Coradini et al., 2019). Z hlediska senzorické jakosti masa je křehkost jedním z nejdůležitějších parametrů. V případě sušeného masa je ovlivněna zbytkovou vlhkostí, která je cca 20 %. Textura může být následně ovlivněna použitím různých druhů zkrhčujících a zvlhčujících látek (Cheng et al., 2023). Cílem této studie bylo ve vybraných vzorcích jerky stanovit následující mikroorganismy: CPM, BMK, bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, *S. aureus*, *B. cereus*, *C. perfringens*, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, a plísně jejich mikrobiologickou kvalitu, dále analyzovat a porovnat fyzikálně chemické parametry (pH,  $a_w$ , obsah sušiny, tuku, bílkovin a kolagenu). Součástí práce bylo také stanovení barevných parametrů a velikosti střížní síly pomocí instrumentálních metod.

## Materiál a metodika

Pro analýzy byly zakoupeny v tržní síti ČR různé druhy masných výrobků jerky. Bylo analyzováno 45 vzorků – hovězí (n = 16), krutí (n = 10), zvěřina (n = 5), vepřové (n = 4), kuřecí (n = 3) a biltong

(n = 7). Každý vzorek byl zakoupen ve 2 různých šaržích, celkově bylo vyšetřeno 90 vzorků jerky. U 4 vzorků nebylo z důvodu nepříznivého mikrobiologického profilu provedeno sensorické hodnocení. V každém vzorku byly stanoveny následující skupiny mikroorganismů: celkový počet mikroorganismů (CPM), bakterie mléčného kvašení (BMK), *Enterobacteriaceae*, *S. aureus*, *B. cereus*, *C. perfringens*, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* a plísně. Kultivace a vyhodnocení byly prováděny dle platných ISO norem. Sérotypizace izolátů byla provedena podle White-Kauffmann-Le Minor schématu aglutinací na skličku se specifickými séry pro O a H antigen. Pomocí metody PCR byly detekovány geny kódující bičíkové proteiny (*fljB*, *fliC*). Hodnota pH byla měřena ve výluhu pH-metrem WTW pH 340i (WTW GmBh, Německo). Aktivita vody byla stanovena na přístroji Novasina LabMaster (Novasina, Švýcarsko). Pro stanovení obsahu sušiny byla použita metoda sušení při teplotě  $103 \pm 2$  °C po dobu 24 hodin. Obsah tuku byl stanoven na přístroji Soxtec™ 2055 (FOSS, Sweden). Obsah celkových bílkovin byl stanoven na přístroji Kjeltac™ 2300 (FOSS, Sweden) metodou podle Kjeldahla. Obsah kolagenu byl stanoven spektrofotometricky při vlnové délce 550 nm na spektrofotometru GENESYSTEM 6 (Thermo Electron Corporation, USA) jako množství 4-hydroxyprolinu. Thiobarbiturové číslo (TBA) bylo stanoveno jako ekvivalenty malondialdehydu destilační metodou reakcí s kyselinou 2-thiobarbiturovou. Instrumentální hodnocení barvy bylo provedeno pomocí spektrofotometru KonicaMinolta CM-5 (KonicaMinolta, Japonsko). Měřeny byly parametry  $L^*$  - světlost,  $a^*$  - červená a  $b^*$  - žlutá. Velikost střížní síly byla měřena dle Warner-Bratzlera na přístroji INSTRON 5544 (Instron Corporation, USA). Sensorické hodnocení bylo provedeno panelem 10 proškolených hodnotitelů pomocí devítibodových grafických stupnic dle platných ISO norem. Statistická analýza byla provedena pomocí softwaru UNISTAT® 6.5 (Unistat Ltd., Londýn, Spojené království). Data byla zpracována pomocí statistického testu ANOVA s Tukey post testem. Statistické hodnocení bylo prováděno při 5% hladině významnosti. Rozdíly byly považovány za statisticky významné, pokud bylo  $P < 0,05$ .

## Výsledky

### Mikrobiologická analýza

Výsledky bakteriologických analýz vzorků jerky jsou uvedeny v tab. 1. Z tabulky je zřejmé, že se průměrná kontaminace (CPM) hovězího, krůtího, vepřového a zvěřinového jerky pohybovala okolo 3 log KTJ/g, což svědčí z mikrobiologického hlediska o kvalitním výrobku. Počáteční hodnoty CPM v sušeném mase se pohybují v rozmezí 1-3 log KTJ/g. Další rozvoj mikroorganismů záleží na způsobu balení, druhu masa a způsobu skladování (Yang et al., 2009). Bakterie mléčného kvašení dosáhly nejvyšších hodnot ve vzorcích biltongu (téměř 4 log KTJ/g). Průměrně se hodnoty BMK pohybovaly kolem 2 log KTJ/g. Počty naznačují, že se jedná kvalitní výrobky s vysokou údržností.

Bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, považované za hygienický indikátor prostředí, byly určeny u všech druhů masa kromě vepřového a zvěřiny. Nejvyšší záchyt byl u kuřecího masa. Plísně nebyly prokázány pouze u vepřového masa. Bylo zjištěno, že kuřecí maso vykazuje nejvyšší průměrné hodnoty v počtu CPM a *Enterobacteriaceae* a vyšší hodnotu BMK v porovnání s ostatními druhy masa. Nejvyšší počet BMK a plísní byl zjištěn u biltongu. Statisticky významné rozdíly ( $P < 0,05$ ) v počtech mikroorganismů u jednotlivých druhů sušeného masa ukazuje tabulka 1. U všech kategorií vzorků (4,44 %) kromě zvěřiny byl *S. aureus* prokázán. *Bacillus cereus* byl stanoven u 13,33 % vzorků (hovězí, zvěřina, krůtí, biltong). Bakterie *Clostridium perfringens* nebyla detekována při primokultivaci, pouze při pomnožení, a to u 4,44 % vzorků. U jednoho vzorku kuřecího masa byla určena *Salmonella* Enteritidis. V případě salmonely může představovat riziko vstupní surovina, častější je ale sekundární kontaminace, kdy se salmonela dostává do produktů z výrobního zařízení, pomůcek a od pracovníků. *Listeria monocytogenes* nebyla prokázána u žádného vzorku. Přestože vykazují průměrné počty sledovaných indikátorových bakterií relativně příznivé hodnoty, byly zjištěny vzorky s vysokými hodnotami CPM a s hodnotami *Enterobacteriaceae* přesahující 3 log KTJ/g. Výrobci musí věnovat přípravě jerky velkou pozornost s ohledem na hygienu vstupní suroviny, provozní i osobní hygienu. Rovněž kontrolní orgány musí při své inspekční činnosti sledovat dodržování pravidel správné hygienické praxe.

Tabulka 1 Výskyt celkového počtu mikroorganismů (CPM), bakterií mléčného kvašení (BMK), bakterií čeledě *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter.*) a plísní u různých druhů sušeného masa. Výsledky jsou uvedeny v log KTJ/g (průměr, minimální a maximální hodnota).

Parametr	HOVĚZÍ	KRŮTÍ	VEPŘOVÉ	ZVĚŘINOVÉ	KUŘECÍ	BILTONG
CPM (min.; max.)	3,41 ± 1,61 <sup>ad</sup> (<1; 8,34)	3,10 ± 1,97 <sup>a</sup> (<1; 7,26)	3,39 ± 2,00 <sup>ac</sup> (<1; 8,28)	2,99 ± 1,59 <sup>ad</sup> (<1; 5,04)	5,02 ± 2,69 <sup>bcd</sup> (2,0; 9,79)	4,69 ± 1,78 <sup>bc</sup> (1,85; 7,59)
BMK (min.; max.)	2,31 ± 1,63 <sup>a</sup> (<1,7; 7,54)	2,42 ± 1,84 <sup>a</sup> (<1,7; 7,23)	0,85 ± 0,00 <sup>b</sup> (<1,7; <1,7)	2,74 ± 1,09 <sup>ac</sup> (<1,7; 7,32)	3,52 ± 2,72 <sup>ac</sup> (<1,7; 7,32)	3,99 ± 1,91 <sup>c</sup> (<1,7; 6,72)
<i>Enterobacter.</i> (min.; max.)	0,63 ± 0,48 <sup>a</sup> (<1; 3,04)	0,67 ± 0,42 <sup>a</sup> (<1; 2,04)	0,50 ± 0,00 <sup>a</sup> (<1; <1)	0,50 ± 0,00 <sup>a</sup> (<1; 3,45)	1,30 ± 1,18 <sup>b</sup> (<1; 3,45)	0,65 ± 0,54 <sup>a</sup> (<1; 2,61)
Plísně (nim.; max.)	1,06 ± 0,31 <sup>a</sup> (<2; 2,78)	1,07 ± 0,32 <sup>a</sup> (<2; 2,48)	1,00 ± 0,00 <sup>a</sup> (<2; <2)	1,42 ± 0,73 <sup>ab</sup> (<2; 2,48)	1,22 ± 0,48 <sup>ab</sup> (<2; 2,3)	1,78 ± 1,52 <sup>b</sup> (<2; 5,38)

<sup>a, b, c, d</sup> Rozdílné indexy v řádcích ukazují statisticky významné rozdíly ( $P < 0,05$ ).

#### Fyzikálně – chemická analýza

Výsledky fyzikálně chemických analýz jsou uvedeny v tabulce 2. Zatímco nejnižší pH bylo zjištěno u biltongu, nejvyšší pH mělo kuřecí jerky. Hodnoty aktivity vody se rámci všech vyšetřovaných vzorků pohybovaly od 0,49 po 0,89 (hovězí jerky). Nejnižší aktivita vody a zároveň nejvyšší obsah

sušiny byl zjištěn u kuřecího jerky. Rovněž obsah popela byl u kuřecího jerky významně ( $P < 0,05$ ) vyšší než u ostatních druhů masa. Nejvíce tuku obsahovalo vepřové jerky, významně méně tuku ( $P < 0,05$ ) bylo zjištěno u jerky krůtího, zvěřinového a kuřecího, u nichž byl zároveň vyšší ( $P < 0,05$ ) obsah bílkovin než u jerky hovězího, vepřového a biltongu. Hovězí jerky a biltong obsahovaly nejvíce ( $P < 0,05$ ) kolagenu.

Tabulka 2 Hodnoty fyzikálně chemických ukazatelů u jednotlivých druhů masného výrobku jerky.

Parametr	HOVĚZÍ	KRŮTÍ	VEPŘOVÉ	ZVĚŘINOVÉ	KUŘECÍ	BILTONG
pH (min.; max.)	5,46 ± 0,27 <sup>a</sup> (4,85; 5,98)	5,52 ± 0,43 <sup>a</sup> (4,38; 6,03)	5,39 ± 0,23 <sup>a</sup> (4,87; 5,75)	5,47 ± 0,18 <sup>a</sup> (5,23; 5,74)	5,76 ± 0,15 <sup>b</sup> (5,48; 5,96)	5,22 ± 0,21 <sup>c</sup> (4,89; 5,64)
a <sub>w</sub> (min.; max.)	0,72 ± 0,09 <sup>ac</sup> (0,49; 0,89)	0,74 ± 0,10 <sup>acd</sup> (0,57; 0,88)	0,76 ± 0,11 <sup>abd</sup> (0,56; 0,87)	0,77 ± 0,05 <sup>bd</sup> (0,69; 0,85)	0,68 ± 0,12 <sup>c</sup> (0,55; 0,85)	0,76 ± 0,09 <sup>bd</sup> (0,59; 0,87)
Sušina (%) (min.; max.)	75,20 ± 6,44 <sup>a</sup> (62,43; 88,81)	73,42 ± 6,59 <sup>ab</sup> (62,15; 84,88)	72,58 ± 8,13 <sup>abd</sup> (63,31; 85,42)	72,75 ± 3,87 <sup>b</sup> (66,17; 78,70)	76,21 ± 8,75 <sup>ab</sup> (63,70; 85,24)	69,23 ± 8,13 <sup>cd</sup> (58,14; 85,39)
Popel (%) (min.; max.)	6,34 ± 1,36 <sup>a</sup> (3,23; 8,69)	6,74 ± 1,26 <sup>a</sup> (3,45; 8,89)	6,46 ± 1,34 <sup>a</sup> (4,50; 9,19)	6,44 ± 0,38 <sup>a</sup> (5,69; 7,11)	7,41 ± 0,84 <sup>b</sup> (6,03; 8,31)	6,52 ± 1,17 <sup>a</sup> (3,54; 7,82)
Tuk (%) (min.; max.)	6,54 ± 3,00 <sup>a</sup> (1,79; 15,12)	3,93 ± 1,78 <sup>b</sup> (1,45; 9,44)	7,80 ± 3,67 <sup>a</sup> (3,15; 14,65)	4,71 ± 2,05 <sup>bc</sup> (2,82; 9,29)	4,81 ± 0,93 <sup>c</sup> (3,57; 6,20)	7,54 ± 4,03 <sup>a</sup> (2,75; 19,81)
Bílkoviny (%) (min.; max.)	49,96 ± 9,95 <sup>a</sup> (32,80; 68,49)	56,83 ± 8,97 <sup>b</sup> (40,66; 69,98)	53,17 ± 7,15 <sup>c</sup> (40,78; 66,30)	57,23 ± 5,64 <sup>b</sup> (47,86; 65,88)	59,00 ± 9,24 <sup>b</sup> (40,33; 69,21)	50,32 ± 7,09 <sup>ac</sup> (37,11; 63,74)
Kolagen (%) (min.; max.)	1,95 ± 0,63 <sup>a</sup> (1,09; 3,32)	1,13 ± 0,32 <sup>bc</sup> (0,74; 1,97)	1,14 ± 0,33 <sup>bc</sup> (0,61; 1,91)	1,47 ± 0,63 <sup>b</sup> (0,88; 2,68)	0,98 ± 0,18 <sup>c</sup> (0,64; 1,17)	2,29 ± 0,66 <sup>a</sup> (1,26; 3,40)
a, b, c, d Rozdílné indexy v řádcích ukazují statisticky významné rozdíly ( $P < 0,05$ ).						

Vyhodnocení ostatních parametrů (obsah soli, barva, textura) včetně sensorické analýzy a kontroly značení bude publikováno v recenzovaném časopisu.

### Seznam literatury:

CHENG, H. et al. Effect of freezing raw meat on the physicochemical characteristics of beef jerky. *Meat Science*. 2023, 197, 109082.

CORADINI, M. G. L. et al. Occurrence and characterization of *Listeria monocytogenes* from beef jerky processing line. *Journal of Food Science and Technology*. 2019, 56, 436-442.

MISHRA, B. et al. Dehydrated meat products: A review. *International Journal of Livestock Research*. 2017, 7, 10-22.

MEDIANI, A. et al. A comprehensive review of drying meat products and the associated effects and changes. *Frontiers in Nutrition*. 2022, 9, 1057366.

YANG, H. S. et al. The physicochemical and microbiological characteristics of pork jerky in comparison to beef jerky. *Meat Science*. 2009, 82, 3, 289-294.

**Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 214/2024/FVHE.**

# Herpesviry obojživelníků v Česku a okolních zemích

Laura Bullová<sup>1</sup>, Francescapia Balivo<sup>1</sup>, Vojtech Baláž<sup>1</sup>,

<sup>1</sup> Ústav ekologie a chorob zoozvírat, zvěře, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,

Vetuni Brno

## Úvod

Obojživelníci jsou globálně nejrychleji ubývající skupinou obratlovců a patogeny jsou nečastější příčinou kritického zhoršení statusu ohrožení jednotlivých druhů (Luedtke et al. 2023). Jednou z obecně málo studovaných skupin patogenů u obojživelníků jsou viry z řádu Herpesvirales, čeledi Alloherpesviridae. Do herpesvirů patří významné patogeny působící napříč všemi třídami obratlovců, od ryb po savce (McGeoch et al. 2006). U chovaných druhů často působí velké ekonomické škody, jejich význam u volně žijících druhů je nedostatečně prozkoumán. U obojživelníků byly dosud identifikovány čtyři druhy: Ranid herpesvirus 1 (RaHV-1), Ranid herpesvirus 2 (RaHV-2), Ranid herpesvirus 3 (RaHV-3) zařazené do nově ustanoveného rodu Batravirus a zatím od nich stranou stojící Bufonid herpesvirus 1 (BfHV-1). Přestože Batravirus Ranidallo-1 je známý už od r. 1934, původně jako „Lucké tumor herpesvirus“, je druhová diverzita HV obojživelníků dosud výrazně podhodnocená a neprostudovaná.

V Evropě je prokázán výskyt Batravirus Ranidallo-3 u skokanů hnědých (*Rana temporaria*) (Origgi et al. 2017, Origgi and Taugbol 2023). BfHV-1 je přítomný u ropuch obecných (*Bufo bufo*) (Origgi et al. 2018, Origgi et al. 2021). Infekce se v obou případech u dospělých jedinců projevuje kožními lézemi, a přímá spojitost mezi HV a mortalitou nebyla potvrzena. Pro účely diagnostiky HV obojživelníků byly vyvinuty primery pro PCR s různou specifitou (Licheri and Origgi 2020, Origgi and Taugbol 2023). Herpesviry u infikovaných obojživelníků obvykle způsobují kožní léze v podobě lymfou naplněných puchýřků (Origgi et al. 2021), přítomnost takových lézí může naznačovat přítomnost herpesvirů. Na základě fotografických dokladů se lze domnívat, že herpesviry se v ČR vyskytují na většině území a u více druhů, než bylo dosud potvrzeno.

## Materiál a metodika

Byl analyzován soubor 526 vzorků DNA ze stěrových vzorků obojživelníků z volné přírody a lidské péče, který byl tvořen vzorky z předchozích výzkumů a sběry v roce 2024. V průběhu jara a začátku léta proběhlo vzorkování na základě spolupráce s NP Podyjí (Z. Mačát) se zacílením na pulce blatnice skvrnitě (*Pelobates fuscus*) a kuněk (*Bombina* sp.). V rámci této spolupráce byly získány navíc vzorky podezřelých případů úhynů a neoplázií u ještěrky zelené s podezřením na plazi herpesvirus. Mimo běžné stěrové vzorky byly na jaře 2024 nasbírány také vzorky cca 40ks uhynulých ropuch obecných na migrační trase, které budou ještě podrobeny dalším analýzám. Obvykle byly vzorky odebírány nedestruktivní metodou kožních stěrů. DNA byla izolována pomocí jedнокrokové izolace s použitím PrepMan Ultra, v případě tkání a několika bukálních stěrů pomocí DNA izolačního kitu Qiagen Blood and tissue.

Jako diagnostická metoda byla zvolena qPCR s využitím interkalačního barviva SybrGreen založená na využití primerů EUPB-FW-2 (5'-GTRCARGCTCAYAGAAACAACACATG-3') a EUPB-RV-1 (5'-GGTCCMGARGGYAYAAAATG-3') určených k end-point PCR amplifikující evropské herpesviry obojživelníků (Licheri and Origgi 2020). Pomocí teplotního gradientu jsme na

vzorcích z jedinců s příznaky herpesvirózy (a následně sekvenčně potvrzených) testovali ideální teplotní program PCR.

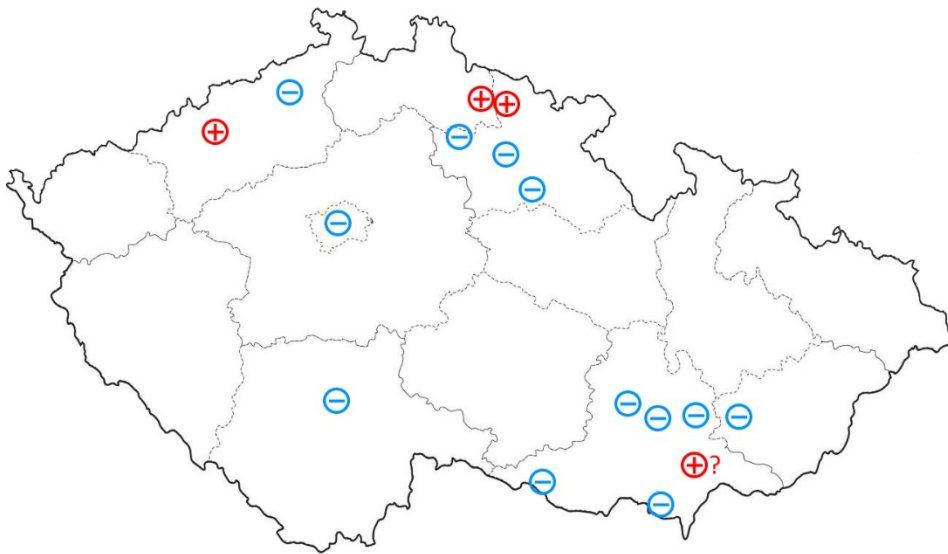
Složení reakční směsi	objem na 1 jamku v $\mu$ l	Program thermocykléru dle Licheri et Origgi, 2020		
Sybr green Roche Master 2x	15	iniciační denaturace	94°C	3 min
EUPB-FW-2 (10 $\mu$ M)	5	denaturace	94 °C	30s
EUPB-RV-1 (10 $\mu$ M)	5	nasedání primerů	52°C	30s
	total mix =	syntéza DNA	72°C	30s
Objem reakční směsi na jamku	25	finální syntéza DNA	72°C	10 min
Objem vzorku	5 $\mu$ l	měření teploty tání	95°C	5s
			65°C	1 min
Celkový objem	30	65-97 navyšování teploty, při měření fluorescence, 10 měření na 1 °C		
		chlazení	40°C	10s

Vzorky s pozitivním výsledkem amplifikace DNA, byly purifikovány a oboustranně sekvenovány s primery použitými k PCR u firmy SEQme. Výsledné sekvence byly dočištěny alignovány a srovnány s databází Genbank.

## Výsledky

Potvrdili jsme použitelnost primerů pro detekci evropských herpesvirů obojživelníků dle Licheri et Origgi (2020), ale adaptovali jsme protokol k použití s qPCR a umožňující tak srovnání síly signálu (množství viru ve vzorku). Na základě qPCR, analýzy teploty tání produktů a sekvenace jsme potvrdili výskyt BfHV-1 v České republice už od roku 2013. Všechny pozitivní případy Bufonid herpesviru byly zaznamenány u ropuch obecné, Bufo bufo. Sekvenční data krátkého úseku, užívaného primárně k diagnostice, ukazují 100% shodu s referenčním genomem BfHV-1 ze Švýcarska z roku 2018, kdy byl tento herpesvirus vědecky popsán. Přes značné úsilí jsme nezachytili žádný z herpesvirů skokanovitých. Batravirus ranidallo-3, který byl opakovaně zaznamenán v západní a severní Evropě a jeho výskyt je dle mnoha vizuálních dokladů velmi pravděpodobný i u nás. Vzorky z blatnic skvrnitých, u kterých máme také doložené příznaky indikující infekci herpesviru, měly jeden nejasný výsledek, takže je potřeba téma dále prozkoumat. Pokud by se potvrdil výskyt HV u tohoto druhu, jednalo by se o první záchyt a potenciálně nový druh žabího herpesviru.





Obr. 1. Pozitivní a negativní lokality BfHV-1 v rámci Česka. V případě lokality Dubňany u Hodonína, označené otazníkem, nebyl pozitivní nález dosud potvrzen sekvenčně.

#### Seznam literatury:

- Licheri, M., and F. C. Origgi. 2020. Consensus PCR protocols for the detection of amphibian herpesviruses (Batrachovirus). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **32**:864-872.
- Luedtke, J. A et al. 2023. Ongoing declines for the world's amphibians in the face of emerging threats. *Nature* **622**:308-314.
- McGeoch, D. J., F. J. Rixon, and A. J. Davison. 2006. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Research* **117**:90-104.
- Origgi, F. C., P. Otten, P. Lohmann, U. Sattler, T. Wahli, A. Lavazza, V. Gaschen, and M. H. Stoffel. 2021. Herpesvirus-Associated Proliferative Skin Disease in Frogs and Toads: Proposed Pathogenesis. *Vet Pathol* **58**:713-729.
- Origgi, F. C., B. R. Schmidt, P. Lohmann, P. Otten, E. Akdesir, V. Gaschen, L. Aguilar-Bultet, T. Wahli, U. Sattler, and M. H. Stoffel. 2017. Ranid Herpesvirus 3 and Proliferative Dermatitis in Free-Ranging Wild Common Frogs (*Rana temporaria*). *Veterinary Pathology* **54**:686-694.
- Origgi, F. C., B. R. Schmidt, P. Lohmann, P. Otten, R. K. Meier, S. R. R. Pisano, G. Moore-Jones, M. Tecilla, U. Sattler, T. Wahli, V. Gaschen, and M. H. Stoffel. 2018. Bufonid herpesvirus 1 (BfHV1) associated dermatitis and mortality in free ranging common toads (*Bufo bufo*) in Switzerland. *Scientific Reports* **8**.
- Origgi, F. C., and A. Taugbol. 2023. Ranid Herpesvirus 3 Infection in Common Frog *Rana temporaria* Tadpoles. *Emerging Infectious Diseases* **29**:1228-1231.

*Tato práce byla financovaná grantem 216/2024/FVHE.*

# Využití *in vivo* a *in vitro* testů pro posouzení účinků azolových fungicidů a antimykotik na organismy vodního prostředí

Barbora Riesová<sup>1</sup>, Renáta Hesová<sup>1</sup>, Pavla Lakdawala<sup>1</sup>, Monika Němcová<sup>2</sup>, Barbora Havelková<sup>2</sup>,  
Lucie Kováčová<sup>1</sup>, Michaela Suchanová<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno

<sup>2</sup>Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno

## Úvod

Znečištění vod různorodými kontaminanty je často diskutovaným globálním problémem. Rezidua pesticidů a léčiv, která se ve vodách nacházejí, mohou ohrožovat necílové organismy, kumulovat se v sedimentech, kontaminovat podzemní vody a potravní řetězce. Některá rezidua lze dokonce detekovat i v pitné vodě. Zatímco limity pro rezidua pesticidů jsou legislativně stanoveny (v ČR Vyhláška č. 252/2004 Sb.), pro většinu léčiv tyto limity chybí.

Azolové látky jsou díky svým fungicidním vlastnostem hojně využívány v zemědělství i medicíně. Jejich mechanismus účinku spočívá v inhibici přeměny lanosterolu na ergosterol prostřednictvím cytochromu P450 (Huang et al., 2022). Triazoly, jako širokospektrální fungicidy obsahující heterocykl 1,2,4-triazol, tvoří jednu z nejpoužívanějších skupin fungicidů. Rezidua triazolů jsou běžně detekována v povrchových vodách (Shen et al., 2021), kde negativně ovlivňují vodní organismy. Například u prothiokonazolu (PTC) bylo popsáno zpomalené líhnutí embryí dánií pruhovaných (*Danio rerio*) po expozici koncentracím 0,075 a 0,150 mg/L, kratší délka těl embryí, zvýšená mortalita a vyšší výskyt perikaridálních edémů (Tian et al., 2019).

Flukonazol (FLU), antimykotikum používané v léčbě plísňových infekcí, se po použití dostává do čistíren odpadních vod, ve kterých není dokonale přečištěn, a vstupuje tak do povrchových vod. Jeho rezidua rovněž negativně ovlivňují necílové vodní organismy, například u embryí *D. rerio* vystavených 1 mg/L FLU byly popsány vývojové deformity a zvýšená tvorba kyslíkových radikálů (Bhagat et al., 2021).

## Materiál a metodika

V rámci studie byla hodnocena ekotoxicita azolových látek (PTC, PTC-d, FLU a TRIAZ) kontaminujících povrchové vody pro několik druhů organismů vázaných na vodní prostředí pomocí řady *in vivo* a *in vitro* testů. Pro testování byly využity metody, které nevyžadují využívání pokusných zvířat dle Směrnice 2010/63/EU o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely.

Metodicky se vycházelo z příslušných norem dle OECD 201 (test inhibice růstu řas), OECD 221 (test inhibice růstu *Lemna* sp.), OECD 202 (akutní imobilizační test s *Daphnia* sp.), OECD 211 (reprodukční test s *Daphnia* sp.), a jako alternativa k testu toxicity na rybách test dle OECD 236 (embryonální test toxicity s *Danio rerio*), dále byl proveden test s nitěnkou (*Tubifex tubifex*) pomocí modifikované metody OECD 207. Vliv testovaných látek na zástupce producentů ve vodním ekosystému (řasy, okřehek) byl posuzován na základě inhibice růstu a množství biomasy. Stanoveno bylo i množství chlorofylu A, B a celkového chlorofylu. U zástupce zooplanktonu (*Daphnia magna* Straus) byla akutním imobilizačním testem stanovena akutní toxicita a chronickým testem byly vyhodnoceny účinky na reprodukci perlooček. Mortalita a imobilizace jsou efekty, které byly sledovány v testu s nitěnkou (*T. tubifex*). Perloočka *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) je nejen významným modelovým druhem v ekotoxikologii, ale i planktonním korýšem, který je klíčovým konzumentem řas a sinic a zároveň potrava mnoha ryb. Plní tak funkci spojovacího článku mezi primární produkcí fytoplanktonu a vyššími trofickými úrovněmi ve vodním ekosystému. Dále byly provedeny testy na embryích ryb (*Danio rerio*) a žab (*Xenopus laevis*) dle modifikované metodiky OECD č. 236 s přidáním subletálních endpointů. Dalším provedeným experimentem bylo sledování buněčné smrti (apoptózy i nekrózy), rychlosti metabolické přeměny přidaného substrátu a změny v aktivitě izoenzymu cytochrom P4501A1 na kultuře buněk derivovaných z jater kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) pomocí komerčně dostupných kitů (Promega). Potenciální rizika spojená s výskytem reziduí testovaných látek byly posuzována jak z hlediska akutní, tak i chronické toxicity. Testovací organismy / buněčné kultury byly exponovány různým koncentracím testovaných látek, přičemž nejnižší testovaná koncentrace každé látky vždy odpovídala koncentraci environmentální.

### Výsledky

Testy akutní toxicity ukázaly, že FLU je pro embrya žab *X. laevis* toxičtější než TRIAZ. FLU ani TRIAZ nezvýšili mortalitu ani neovlivnili rychlost líhnutí, avšak expozice TRIAZ způsobila významný nárůst malformací ve skupinách 1 000 µg/l ( $p < 0,01$ ) a 100 000 µg/l ( $p < 0,0001$ ). FLU způsobil malformace již od 0,1 µg/l ( $p < 0,0001$ ). Expozice oběma látkám měla za následek zpomalení srdečního tepu, přičemž v případě TRIAZ to bylo v koncentracích 100, 10 000 ( $p < 0,05$ ) a 100 000 µg/l ( $p < 0,0001$ ) a v případě FLU v koncentracích 1 000 a 20 000 µg/l ( $p < 0,01$ ). TRIAZ zkrátil délku těl ve skupině exponované 10 000 µg/l ( $p < 0,01$ ), zatímco po expozici FLU o koncentracích 10, 1 000 ( $p < 0,0001$ ) a 20 000 µg/l ( $p < 0,01$ ) bylo reportováno prodloužení délky těl. PTC a PTC-d nezpůsobili významný nárůst mortality u embryí *D. rerio*, ale negativně ovlivnili míru líhnutí. PTC urychlil líhnutí v koncentracích 50 až 5000 µg/l ( $p < 0,05$ ) v 72 hpf a výrazněji v

500 a 1000 µg/l v 96 hpf ( $p < 0,0001$ ). PTC-d zpomalil líhnutí po expozici 10 000 µg/l v 96 hpf ( $p < 0,05$ ). Vyšší výskyt malformací ve srovnání s kontrolou byl prokázán ve skupině 5000 µg/l PTC ( $p < 0,0001$ ) a také u PTC-d v 5000 a 10 000 µg/l ( $p < 0,05$ ). Oba pesticidy urychlily srdeční tep *D. rerio*, v případě PTC tomu tak bylo v 0,5 až 5000 µg/l a u PTC-d v 5000 a 10 000 µg/l. PTC a PTC-d vykazovali toxicitu pro jaterní buňky kachny divoké při 1000 µg/l, s nekrózou 26 % u PTC a 18 % u PTC-d. Pokles počtu buněk vedl ke snížení metabolického výkonu; při 500 a 1000 µg/l bylo množství zmetabolizovaného substrátu za 24 hodin výrazně redukováno ( $p < 0,01$ ) oproti kontrole. Nízké koncentrace PTC (0,05 µg/l) a PTC-d (0,05 a 0,5 µg/l) významně zvýšily metabolickou aktivitu ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$  pro PTC-d 0,5 µg/l). Píky byly 1,7–1,6× vyšší a dosaženy 1,7× rychleji než u kontroly. PTC a PTC-d výrazně snížili aktivitu CYP4501A1 ( $p < 0,01$ ) ve všech koncentracích po 24 hodinách, bez vlivu na počet životaschopných buněk. Po 48 hodinách byla aktivita CYP450 u PTC i PTC-d srovnatelná s kontrolou ( $p > 0,05$ ), ale po 72 hodinách ji některé koncentrace, zejména PTC, zvýšily. Expozice *Daphnia magna* PTC způsobila mortalitu po 24 a 48 hodinách v koncentraci 5000 µg/l ( $p < 0,01$ ). Mortalita nitěnek *Tubifex tubifex* byla významná pouze v této nejvyšší koncentraci, což vedlo i k poklesu hmotnosti. PTC-d neměl významný vliv na mortalitu *D. magna* a *T. tubifex*. PTC inhiboval růst okřehku *Lemna minor* po 120 h v nejvyšší koncentraci ( $p < 0,05$ ), s inhibicí ve všech koncentracích na konci testu (168 h), kromě nejnižší. PTC-d vykázal inhibici růstu již po 120 h ve všech koncentracích ( $p < 0,01$ ). Obě látky způsobily statisticky významný pokles biomasy (168 h). Inhibice růstové rychlosti řas byla pozorována pouze u PTC v koncentraci 5000 µg/l ( $p < 0,01$ ). Vliv FLU na mortalitu *D. magna* byl zaznamenán pouze v nejvyšší koncentraci v čase 24 h a 48 h oproti kontrole. Vliv testovaných látek na mortalitu *T. tubifex* nebyl zaznamenán. Pouze v případě FLU došlo v nejvyšší koncentraci k poklesu hmotnosti oproti kontrole ( $p < 0,01$ ).

### Závěr

Cílem studie bylo zhodnocení účinků azolových léčiv (FLU a TRIAZ) a azolových pesticidů (PTC a jeho metabolitu PTC-d) na významné zástupce trofické úrovně producentů a konzumentů ve vodním ekosystému. Výsledky předložené studie prokázaly, že testované látky mají významný vliv na míru líhnutí srdeční tep a délky těl embryí ryb a žab. Dále měl PTC a PTC-d negativní vliv na apoptózu, výkonnost metabolismu a produkci CYP4501A1 v jaterních buňkách kachny divoké. Expozice PTC způsobila mortalitu *D. magna*, u nitěnek *T. tubifex* i pokles hmotnosti. PTC a PTC-d negativně inhibovali růst okřehku *L. minor* a řas. Obě látky způsobily pokles biomasy. FLU měl vliv na mortalitu *D. magna* a pokles hmotnosti *T. tubifex*.

### **Seznam literatury:**

Bhagat, J., Zang, L., Nakayama, H., Nishimura, N., Shimada, Y. Effects of nanoplastic on toxicity of azole fungicides (ketoconazole and fluconazole) in zebrafish embryos. *Science of The Total Environment*. 2021. 800: 149463.

Huang, T., Zhao, Y., He, J., Cheng, H., Martyniuk, Ch.J. Endocrine disruption by azole fungicides in fish: A review of the evidence. *Science of The Total Environment*. 2022. 822: 153412.

Shen, J., Liu, P., Sun, Y., Xu, X., Guo, L., Rao, Q., Chen, M., Liu, X. Embryonic exposure to prothioconazole induces oxidative stress and apoptosis in zebrafish (*Danio rerio*) early life stage. *Science of The Total Environment*. 2021. 756: 143859.

Tian, S., Teng, M., Meng, Z., Yan, S., Jia, M., Li, R., Liu, L., Yan, J., Zhou, Z., Zhu, W. Toxicity effects in zebrafish embryos (*Danio rerio*) induced by prothioconazole. *Environmental Pollution*. 2019. 255: 113269.

Vyhláška č. 252/2004 Sb. Vyhláška, kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody. In: *Zákony pro lidi* [online]. AION CS, [cit. 2023-11-13]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2004-252>.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 218/2024/FVHE.***

# Vplyv perorálneho príjmu bisfenolu AF na zmeny vybraných biomarkerov endokrinatej disrupcie u diploidných a triploidných jedincov dánia pruhovaného (*Danio rerio*)

Michaela Frederika Vargová, Přemysl Mikula, Nikola Pešková, Vendula Stoklasová

*Ústav ochrany a welfare zvierat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno*

## Úvod

Bisfenoly predstavujú nevyhnutnú skupinu látok využívaných pri výrobe plastov, epoxidových živíc či termopapiera (Mikula, 2023). Bisfenol A (BPA) sa v posledných desaťročiach široko používal ako monomér na výrobu polykarbonátových plastov a epoxidových živíc (Yang et al., 2020). BPA pôsobí ako zlúčenina narúšajúca endokrinný systém interaguje s rôznymi tkanivovými receptormi, ako je estrogénový receptor, androgénny receptor, receptor hormónu štítnej žľazy a má nepriaznivé účinky na metabolizmus, reprodukčné orgány, nervový systém, kardiovaskulárny a imunitný systém (Xing et al., 2022). S ohľadom na preukázané toxické účinky je jeho priemyselné využitie v súčasnosti do značnej miery regulované (Catenza et al. 2021). Hoci BPA bol postupne nahradený inými zástupcami zo skupiny bisfenolov s podobnými fyzikálno-chemickými vlastnosťami a komerčnou hodnotou, rastúci počet výskumov ukazuje, že tieto alternatívy BPA majú tiež výrazné účinky narúšajúce endokrinný systém, ktoré môžu byť ešte silnejšie ako účinky BPA (Zhang et al., 2024). Bisfenol AF (BPAF) je jednou z hlavných náhrad BPA, ako aj dôležitou surovinou na výrobu fluoroelastomérov a vysokovýkonných monomérov. Vďaka svojmu širokému použitiu v priemysle sa BPAF stal novým environmentálnym polutantom. BPAF bol zistený v rôznych environmentálnych matriciach, ako sú vody riek a oceánov, sedimenty a pôda (Lai et al., 2024). Okrem toho bol BPAF zistený v mliečnych výrobkoch, morských plodoch, v ľudských telesných tekutinách a materskom mlieku (Li et al., 2020). Cieľom nášho experimentu je posúdenie vplyvu expozície diploidných a triploidných danií pruhovaných (*Danio rerio*) bisfenolom AF (BPAF) na vybrané biomarkery endokrinatej disrupcie. A to hlavne biomarkery disrupcie estrogenevej regulácie (vitellogenin a 11-ketotestosteron) a tiež ukazovatele narušenia procesov tyroidnej regulácie (tyroxín a trijódtyronín). Zameriavame sa na analýzu vybraných ukazovateľov oxidatívneho stresu, génovej transkripcie a histologické vyšetrenie.

## Materiál a metodika

Test prebehol podľa metodiky OECD 215 pre testovanie chemikálií (Fish, Juvenile Test). Do testu bolo zaradených celkom 296 pokusných rýb. Bezprostredne po dodaní boli ryby rozdelené do 12

sklenených nádrží o užitnom objeme cca 20 L (rozmery 50 × 20 × 25 cm). Do každého akvária sa ryby umiestnili rovnomerne s tým, že diploidný a triploidný jedinci boli behom celého experimentu rozdelený oddelene. Behom úvodných 2 týždňov boli všetky ryby adaptované laboratórnym podmienkam. V tomto období prijímali komerčne dostupné krmivo bez obsahu testovanej látky (BPAF). Ryby boli behom experimentu kŕmené 3× denne *ad libitum*. Po ukončení úvodnej adaptačnej fáze nasledovala expozícia rýb v dĺžke 6 týždňov, behom ktorých bola väčšia časť rýb exponovaná BPAF podávaním v krmive. Rozdelenie rýb do skupín bolo nasledujúce: 1) diploidný jedinci danií pruhovaných – kontrola. 2) diploidný jedinci danií pruhovaných – expozícia 10 µg BPAF na kg krmiva. 3) diploidný jedinci danií pruhovaných – expozícia 1000 µg BPAF na kg krmiva. 4) triploidný jedinci danií pruhovaných – kontrola. 5) triploidný jedinci danií pruhovaných – expozícia 10 µg BPAF na kg krmiva. 6) triploidný jedinci danií pruhovaných – expozícia 1000 µg BPAF na kg krmiva.

Behom celého testu, bola 2× denne vykonávaná výmena vody vo všetkých nádržiach. Mechanické čistenie dna a vnútorných povrchov bolo vykonávané minimálne raz za deň. Počas celého testu boli monitorované fyzikálno-chemické vlastnosti a kvalita vody v nádržiach (pH, teplota, nasýtenie vody kyslíkom, obsah dusitanov a amoniaku vo vode). Tieto parametre boli zisťované 1× za deň. Priebežne bol sledovaný aj zdravotný stav pokusných zvierat, kontrola prebiehala najmenej 3× za deň vždy počas kŕmenia. Po 6 týždňoch expozície boli všetky ryby z experimentu usmrtené s použitím anestetika MS-222 (tricaine methanesulphonate). U všetkých rýb bolo vykonané zhodnotenie základných morfológických parametrov (dĺžka tela, hmotnosť) a u diploidných jedincov bolo určené pohlavie, pretože pre vybrané analýzy boli využívaný len samci (triploidný jedinci predstavujú homogénne samčie populácie rýb). Následne boli pripravené celotelové homogenáty rýb pre analýzu oxidatívneho stresu (kataláza (CAT), glutathion peroxidáza (GPx), glutathion reductáza (GR), glutathion-S-transferáza (GST)), stanovenie koncentrácií vitellogenínu, 11-ketotestosteronu, tyroxínu, analýzu génovej transkripcie a histologické vyšetrenie. Štatistické vyhodnotenie získaných dát bolo uskutočnené v programe Unistat 6.5 for Excel. Testovanie bolo uskutočnené na hladine významnosti  $p < 0,05$ .

## Výsledky

Pri sledovaní oxidatívneho stresu boli zistené signifikantné rozdiely pri analýze celotelového homogenátu diploidných jedincov dánia pruhovaného (*Danio rerio*). Enzýmová analýza ukázala, že antioxidačný a detoxikačný stav organizmu rýb bol výrazne narušený, keďže väčšina sledovaných indexov vykazovala štatisticky významné zmeny. Pri sledovaní aktivity katalázy (CAT) neboli

zistené žiadne štatisticky významné rozdiely v exponovaných skupinách (BPAF 10 µg/kg krmiva a BPAF 1000 µg/kg krmiva) oproti kontrole (viď tabuľka 1). Pri sledovaní aktivity GPx bol zaznamenaný štatisticky významný rozdiel oproti kontrole v exponovanej skupine BPAF 10 µg/kg krmiva (viď. tabuľka 1).

Pri sledovaní aktivity GR bol zaznamenaný štatisticky významný rozdiel oproti kontrole v exponovanej skupine BPAF 1000 µg/kg krmiva (viď tabuľka 1). Pri sledovaní aktivity GST neboli zaznamenané žiadne štatisticky významné rozdiely v exponovaných skupinách oproti kontrole (BPAF 10 µg/kg krmiva a BPAF 1000 µg/kg krmiva), (viď tabuľka 1). Pri sledovaní aktivity TBARS boli zaznamenané štatisticky významné rozdiely oproti kontrole v exponovaných skupinách BPAF 10 µg/kg krmiva a BPAF 1000 µg/kg krmiva (viď tabuľka 1).

Tabuľka 1. Biomarkery oxidačného stresu v celotelovom homogenáte diploidných jedincov dánia pruhovaného (*Danio rerio*), po expozícií BPAF 10 a 1000 µg/kg krmiva. Dáta sú uvádzané ako priemer ± stredná chyba priemeru (SE). Štatisticky významné rozdiely ( $p < 0,05$ ) sú uvádzané odlišnými písmenami.

INDEX	KONTROLA	BPAF 10	BPAF 1000
CAT	101,4 ± 4,93 <sup>a</sup>	102,7 ± 4,12 <sup>a</sup>	100,8 ± 4,94 <sup>a</sup>
GPx	21,4 ± 2,37 <sup>a</sup>	14,3 ± 1,55 <sup>b</sup>	16,4 ± 0,96 <sup>a</sup>
GR	11,4 ± 0,47 <sup>a</sup>	11,0 ± 0,66 <sup>a</sup>	9,4 ± 0,8 <sup>b</sup>
GST	211,9 ± 9,92 <sup>a</sup>	202,3 ± 10,14 <sup>a</sup>	205,0 ± 11,26 <sup>a</sup>
TBARS	14,3 ± 2,02 <sup>a</sup>	22,7 ± 2,16 <sup>b</sup>	23,2 ± 2,50 <sup>b</sup>

Pri analýze vitellogenínu u všetkých triploidných jedincov dánia pruhovaného (*Danio rerio*) boli koncentrácie v homogenátoch tiel pod detekčným limitom (100 ng/g). Rovnako u samcov diploidných jedincov nebola odpoveď exponovaných rýb výrazná a medzi exponovanými skupinami neboli zaznamenané významné rozdiely (kontrola - 100 % vzoriek pod detekčným limitom; exponovaná skupina 10 µg/kg krmiva - 81.82 % pod detekčným limitom, pri 2 vzorkách detegovaný vitellogenín v koncentráciách 6083, resp. 27137 ng/g; exponovaná skupina 1000 µg/kg krmiva - 91.67 % vzoriek pod detekčným limitom, v jednej vzorke detegované 21343 ng/g vitellogenínu). Funkčnosť metodiky bola overená analýzou obsahu vitellogenínu v homogenátoch tiel samičích jedincov diploidných rýb, kde boli podľa očakávania zaznamenané hodnoty v



rozmedzí státisícov až miliónov ng/g. V súčasnej dobe postupne vykonávame sľúbene analýzy, zároveň prebieha kompletizácia získaných dát a ich ďalšie štatistické spracovanie.

### **Zoznam literatúry:**

Catenza, C. J., Farooq, A., Shubear, N. S., Donkor, K. K. 2021. A targeted review on fate, occurrence, risk and health implications of bisphenol analogues. *Chemosphere* 268: 129273.

Lai, K., Zhang, L., Xu, J. 2024. Evaluation of the chronic toxicity of bisphenol A and bisphenol AF to sea cucumber *Apostichopus japonicus* after long-term single and combined exposure at environmental relevant concentration. *Environmental Research* 251: 118748.

Li, R., Liu, S., Qui, W., Yang, F., Zheng, Y., Xiong, Y., Li, G., Zheng, C. 2020. Transcriptomic analysis of bisphenol AF on early growth and development of zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Environmental Science and Ecotechnology* 4: 100054.

Mikula, P. 2023. Toxické účinky bisfenolu A a jeho strukturných analogů a jejich výskyt ve vodním prostředí. In: *Ochrana zvířat a welfare 2023*. FVHE VETUNI Brno, s. 368–378.

OECD 2000. Test No. 215: Fish, Juvenile Growth Test, OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris. Dostupné z: <https://doi.org/10.1787/9789264070202-en>. [vid. 26. 11. 2024].

Xing, J., Zhang, S., Zhang, M., Hou, J. 2022. A critical review of presence, removal and potential impacts of endocrine disruptors bisphenol A. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 254: 109275.

Yang, Y., Tang, T.-L., Chen, Y.-W., Tang, W.-H., Yang, F. 2020. The role of chorion around embryos in toxic effects of bisphenol AF exposure on embryonic zebrafish (*Danio rerio*) development. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 233: 106540.

Zhang, B., Wei, J., Wang, Z., Li, X., Liu, Y. 2024. Sample preparation and analytical methods for bisphenol endocrine disruptors from foods: State of the art and future perspectives. *Microchemical Journal* 204: 111033.

***Táto práca bola financovaná grantom IGA VETUNI 220/2024/FVHE.***

# Transkontinentálny prenos enterobaktérií rezistentných k meropenemu prostredníctvom haje tmavej

Lucia Zelinová<sup>1</sup>, Jarmila Laušová<sup>1</sup>, Iveta Suchá<sup>1</sup>, Iva Sukkar<sup>2</sup>, Ivo Papoušek<sup>1</sup>, Ivan Literák<sup>1,2</sup>,  
Alejandro Onrubia<sup>3</sup>, Rachid El Khamlichi<sup>4</sup>, David Kumprecht<sup>1</sup>, Monika Dolejská<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, VETUNI, Brno, Česká republika

<sup>2</sup> CEITEC, Středoevropský technologický institut, VETUNI, Brno, Česká republika

<sup>3</sup> CIMA, Migres Foundation, Tarifa, Španělsko

<sup>4</sup> Association Marocaine de Protection des Oiseaux et de la Vie Sauvage (AMPROVIS), F'nideq, Maroko

## Úvod

Alarmujúca rastúca rezistencia baktérií k rezervoárovým antibiotikám, ktoré sú používané k liečbe život ohrozujúcich infekcií, sa stáva jednou z najväčších hrozieb súčasnosti. Medzi antibiotiká poslednej voľby radíme napríklad karbapenemy, na ktoré sme sa zamerali v našej štúdií. Vzhľadom na pohyblivosť a schopnosť prekonávať veľké vzdialenosti v krátkom čase sú z pohľadu šírenia najrizikovejšími živočíchmi migrujúce vtáky.<sup>1</sup> Haja tmavá (*Milvus migrans*) je jedným z najrozšírenejších dravcov, hniezdi v Európe a zimuje v subsaharskej Afrike. Jedná sa o druh, ktorý sa veľmi často živí na skládkach komunálnych odpadov, ktoré utvárajú prostredie vhodné pre bakteriálnu kolonizáciu vtákov.<sup>2</sup> V našej štúdií sme odobrali dve série vzoriek z jesennej a jarnej migrácie, z krajín s rozdielnymi postupmi v nakladaní s antibiotikami a rozdielnou úrovňou výskytu rezistentných baktérií. Umožnilo nám to porovnať prevalenciu nosičstva haje tmavej a identifikovať epidemiologickú identitu rezistentných baktérií.

## Materiál a metodika

Haje boli odchytené do špeciálnych klietok so sklápajúcimi dvierkami. Po označení krúžkom bol vykonaný kloakálny výter pomocou transportnej súpravy AMIES. Pri jesennej migrácii na španielskej strane Gibraltáru sme získali 469 vzoriek, pri jarnej migrácii na marockej strane Gibraltáru sme získali 15 vzoriek.

Zamrazené kultúry boli zaočkované do PPV a následne inokulované na komerčné selektívne médium (Brilliance CRE) s prídavkom meropenemu v neznámom množstve a nami pripravené MacConkey médium s prídavkom meropenemu 0,125mg/l pre získanie enterobaktérií so zníženou citlivosťou ku karbapenemom. Po inkubácii sa narastené kultúry ďalej prečisťovali na MacConkey agare s prídavkom meropenemu, čistú kultúru sme preočkovali na mäsopeptonový agar a druho

určili pomocou hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics). Ďalej sa pracovalo len s izolátmi, ktoré patrili do čeľade *Enterobacteriaceae*. Izoláty sme následne podrobili PCR screeningu na gény kódujúce produkciu karbapenemáz *bla<sub>GES</sub>*, *bla<sub>IMI</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>* a *bla<sub>VIM</sub>*. Pre fenotypové zhodnotenie bol použitý test MASTDISCS® Combi Carba, ktorý detekuje produkciu karbapenemáz. Taktiež sme použili komerčnú súpravu určenú pre stanovenie citlivosti k 24 antibiotikám u Gram negatívnych baktérií na základe determinácie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC).

Na základe výsledkov predošlého testovania boli vybrané izoláty poslané na ďalšiu analýzu pomocou celogenomového sekvenovania krátkych čítaní. Celogenomová DNA bola z izolátov extrahovaná kitom NucleoSpin® Tissue a sekvenovanie prebehlo na platforme HiSeq (Illumina). Kvalitatívna kontrola získaných dát bola prevedená softwarom Trimmomatic, v ktorom sa orezali adaptované sekvencie a odfiltrovali sa sekvencie s nižšou kvalitou. Upravené dáta boli asemblované v programe SPAdes a podrobené ďalším analýzám s využitím verejne dostupných programov na <https://www.genomicepidemiology.org/>. Pomocou nástroja MLST bol určený sekvenčný typ testovaných izolátov. Sekvenčné dáta izolátov sa potom charakterizovali v programe PlasmidFinder, cez ktorý sme identifikovali plazmidmi nesené izoláty a zaradili ich do príslušných inkompatibilných skupín. S využitím databázy ResFinder boli detekované gény kódujúce rezistenciu k antibiotikám. V rámci ďalšieho projektu bude u vybraných izolátov vykonané celogenomové sekvenovanie technológiou dlhých čítaní (MinION, Oxford Nanopore Technologies) s cieľom získať kompletne súvislé nukleotidové sekvencie po ich kombinácií s krátkymi čítaniami z Illumina sekvenovania.

## Výsledky

Z 469 vzoriek odobraných na španielskej strane Gibraltáru sme získali 3 izoláty *E. coli*, u ktorých sa potvrdil gén kódujúci produkciu karbapenemáz. Z 15 vzoriek z Afriky sa nepotvrdil ani jeden izolát nesúci tento gén. Fenotypová produkcia metalo-beta-laktamáz, ktoré sú spojené s génmi *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* a *bla<sub>IMP</sub>*, bola potvrdená u dvoch izolátov, u tretieho izolátu bol výsledok testu MASTDISCS® Combi Carba nepriekazný. Na základe výsledkov testu citlivosti podľa determinácie MIC sme podľa metodík EUCAST 2024 stanovili, že všetky izoláty vykazujú rezistenciu k trom alebo viacerým triedam antibiotík, čo ich klasifikuje ako multirezistentné.

Celogenomové sekvenovanie potvrdilo u izolátu BKE63m prítomnosť génu *bla<sub>NDM-1</sub>*, ktorý bol začlenený v mobilnom transpozóne Tn125-like na plazmide IncX3. Plazmid IncX3 je radený medzi vysoko mobilné plazmidy a často sa spája práve s týmto génom. Prítomnosť tohto plazmidu prispieva k šíreniu rezistencie ku karbapenemovým antibiotikám medzi rôznymi druhmi baktérií

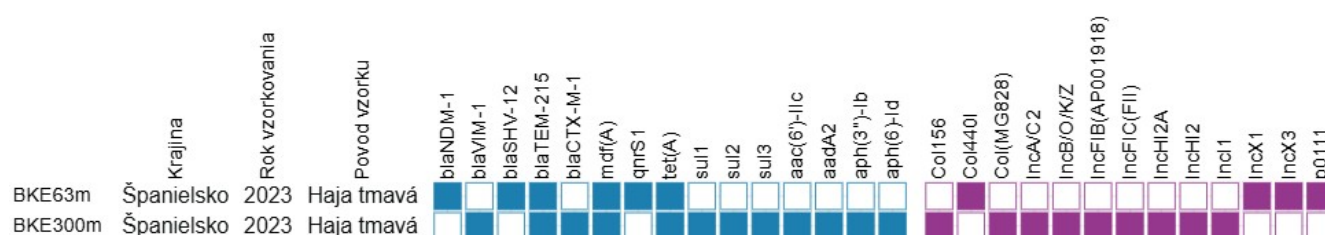
v rôznych prostrediach. Okrem tohto génu niesol izolát BKE63m gény kodujúce produkciu ESBL a gény rezistencie k fluorochinolonom a tetracyklinom (viz. Obrázok 1). U izolátu bolo detekovaných 45 faktorov virulencie.

Druhý izolát BKE300m niesol gén *bla<sub>VIM-1</sub>* lokalizovaný na plazmide IncA/C2. Mobilný úsek s génom *bla<sub>VIM-1</sub>* bol ohraničený integrázou 1 v oblasti nad génom a inzerčnou sekvenciou IS4321 v oblasti pod génom. Gén *bla<sub>VIM-1</sub>* bol prvou kazetou integrónu triedy 1, nasledovaný kazetou s génom rezistencie k aminoglykosidom [*aac(6')-IIc*], sulfonamidom (*sul1*) a konzervatívnou oblasťou kódujúcou rezistenciu ku kvartérnym amóniovým soliam (*qacEΔ1*). V rámci mobilného elementu bol ďalej detekovaný operon kódujúci rezistenciu k ortuti (*merE,D,B,A,P,T,R*). U izolátu sa taktiež potvrdili gény kódujúce produkciu ESBL, úplný výčet génov rezistencie a plazmidových replikónov je znázornený na Obrázku č.1. Analýzou Virulencefinder bolo detekovaných 79 faktorov virulencie.

U tretieho izolátu bola nedostatočná kvalita dát a sekvenovanie bude potrebné zopakovať.

Pomocou MLST analýzy bol k izolátu BKE63m priradený sekvenčný typ ST2563 a k izolátu BKE300m ST10958. V databáze Enterobase bol sekvenční typ ST2563 dokumentovaný iba u 4 humánných kmeňov z Japonska a Spojených štátov. V Spojených štátoch bol tento sekvenčný typ identifikovaný ako uropatogénny, čo môže nasvedčovať o jeho prípadnej patogenite. Fylogenetická analýza nepreukázala príbuznosť týchto izolátov s našim izolátom. Sekvenčný typ ST10958 bol tiež už raz detekovaný v Spojených štátoch u čajky striebritej (*Larus argentatus*) v roku 1993.

Obrázok č.1 Prehľad génov rezistencie a plazmidových replikónov u izolátov *E. coli* BKE63m a BKE300m získaných v štúdií.



## Záver

Z jesenného vzorkovania sa nám podarilo získať dostatočný súbor izolátov, s ktorými budeme môcť naďalej pracovať a porovnať výsledky s našou kolekciou izolátov získaných z minulých rokov a verejne dostupnými databázami. Detekovali sme dva významné multirezistentné izoláty, ktoré nesú rezistenciu voči antibiotikám poslednej voľby s potenciálom šíriť sa medzi rôznymi druhmi baktérií v rôznych prostrediach. Možný prenos tejto rezistencie môže spôsobiť problémy pri terapii

infekčných ochorení spôsobených druhmi grampozitívnych a gramnegatívnych baktérií. Výsledky zdôrazňujú význam migrujúcich vtákov ako nositeľov multirezistentných baktérií a potvrdzujú potrebu lepšieho monitorovania rezistencie v rôznych geografických oblastiach. Identifikácia génov rezistencie na kritické antibiotiká, ako sú karbapenemy, poukazuje na naliehavú potrebu globálnych opatrení na kontrolu šírenia rezistentných baktérií a na zlepšenie postupov v nakladaní s odpadmi. Plánované zlepšenie metodiky a zabezpečenie vyššieho počtu vzoriek v ďalších sezónach umožní presnejšiu analýzu a rozšírenie poznatkov o šírení rezistentných baktérií medzi kontinentami.

### **Seznam literatury:**

<sup>1</sup> DOLEJSKA, Monika a LITERAK, Ivan. *Wildlife Is Overlooked in the Epidemiology of Medically Important Antibiotic-Resistant Bacteria*. Online. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2019, roč. 63, č. 8, s. e01167-19. ISSN 0066-4804. <https://doi.org/10.1128/AAC.01167-19>. [citováno 2024-04-11].

<sup>2</sup> TARABAI, Hassan; KREJCI, Simon; KARYAKIN, Igor; BITAR, Ibrahim; LITERAK, Ivan et al. *Clinically relevant antibiotic resistance in Escherichia coli from black kites in southwestern Siberia: a genetic and phenotypic investigation*. Online. *MSphere*. 2023, roč. 8, č. 4, s. e00099-23. ISSN 2379-5042. <https://doi.org/10.1128/msphere.00099-23>. [citováno 2024-04-11].

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 222/2024/FVHE***

# **Gastrointestinální trakt drůbeže jako rezervoár antibiotické rezistence - sekvenování s dlouhým čtením pro studium rezistomu a plazmidomu**

Markéta Ryšavá<sup>1,2</sup>, Jana Palkovičová<sup>2</sup>, Monika Dolejská<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno,* <sup>2</sup>*CEITEC, Veterinární univerzita Brno*

## **Úvod**

Střevo zvířat představuje neprozkoumaný rezervoár genů rezistence, ze kterého se může rezistence šířit dále do prostředí cestou odpadů nebo ke člověku skrze kontaminované maso. Příkladem prostředí s takovým zoonotickým potenciálem jsou chovy kuřat. Intenzivní produkce kuřecího masa v posledních letech vedla k nárůstu spotřeby antibiotik, což vedlo ke změnám ve střevním mikrobiomu kuřat, zvyšování množství patogenů a genů pro rezistenci k antibiotikům. Kuřecí gastrointestinální trakt poskytuje díky častému použití antibiotik vhodné prostředí pro horizontální přenos genů rezistence zejména prostřednictvím plazmidů.

Zkoumání mikrobiomu trávicího traktu zvířat včetně drůbeže je poměrně náročné a většina aktuálně používaných metod je závislá na kultivaci. Tím se snižuje úspěšnost zachytu některých obtížně kultivovatelných či anaerobních bakterií, případně narůstá cena experimentů s různými podmínkami kultivace. Je tedy vhodné volit jiný přístup, například izolaci metagenomové DNA z primárních biologických vzorků a její přímé sekvenování. Metagenomika byla nedávno použita k detekci a kvantifikaci genů antimikrobiální rezistence v různých rezervoárech včetně odpadních vod, lidských střev, pitné vody a střev hospodářských zvířat. Navzdory těmto technologickým pokrokům, informace o kontextu genů rezistence a jejich spojení s mobilními genetickými elementy (MGE) je obtížné získat při využití sekvenování krátkých čtení například technologií Illumina. Naproti tomu sekvenační platformy třetí generace, např. MinION (Nanopore), nabízí schopnost generovat dlouhá čtení, a poskytují tak výjimečnou příležitost k získání kompletní plazmidové sekvence z metagenomických vzorků. Kombinace sekvenování krátkých a dlouhých čtení jako navrhovaný přístup v tomto projektu poskytuje příležitost přiřadit geny rezistence ke specifickým MGE, a blíže tak studovat procesy šíření antimikrobiální rezistence.

## **Materiál a metodika**

V rámci jiného projektu řešeného na ústavu bylo sesbíráno 12 vzorků trusu z drůbeží farmy Lukov v České republice. Vzorky byly odebrány ve třech různých halách, přičemž v každé hale byly získány vzorky ze čtyř časových bodů věku drůbeže (den 7, 14, 21, 28). Byly sesbírány informace o

použití antibiotik během výkrmu kuřat. Pro stanovení celkového obrazu obsahu plazmidomu a rezistomu byl v rámci tohoto projektu využit sekvenační přístup bez kultivace. Ze získaných vzorků byla extrahována celková plazmidová DNA pomocí QIAGEN Plasmid Midi Kit pro získání velkých plazmidů o velikosti desítek až stovek kilobází a QIAGEN Plasmid Mini Kit pro izolaci malých plazmidů o velikosti jednotek kilobází. Extrahovaná DNA jednotlivých vzorků získaná oběma kity byla následně smíchána pro snížení nákladů na sekvenování. Směsné vzorky byly inkubovány s Plasmid-Safe ATP-Dependent DNase (Biosearch Technologies) na odstranění kontaminant z prostředí a bakteriální chromozomální DNA. Následně byla DNA kruhových plazmidů amplifikována pomocí NxGen phi29 DNA Polymerase (Biosearch Technologies). Z plazmidové DNA byla připravena DNA knihovna pomocí ligačního kitu SQK-LSK114 (Oxford Nanopore Technologies, ONT). Ta byla podrobena sekvenování dlouhých čtení na platformě MinION Mk1c (ONT) s konverzí signálů sekvenátoru do sekvence surových dat a následným filtrováním kvality ( $Q \geq 9$ ). Ze získaných surových dat získaných technologií dlouhého čtení byly odstraněny sekvence adaptérů pomocí nástroje Porechop (ONT). Získaná data z krátkého Illumina čtení byla po počítačové úpravě (*basecalling* a ořezání konců) poskládána pomocí Flye. Upravené sekvence byly mapovány na geny rezistence, mobilní genetické elementy a plazmidy dostupné ve veřejných databázích (např. ResFinder, CARD, MGE finder, PLSDB) pomocí nástroje KMA. Pro získání porovnatelných výsledků mezi různými vzorky byly vypočítány relativní abundance jednotlivých genů a plazmidových replikonů pomocí hodnoty RPKM (*Reads Per Kilobase Million*). Získaná data byla vizualizována pomocí *Matplotlib* knihovny v Python.

## Výsledky

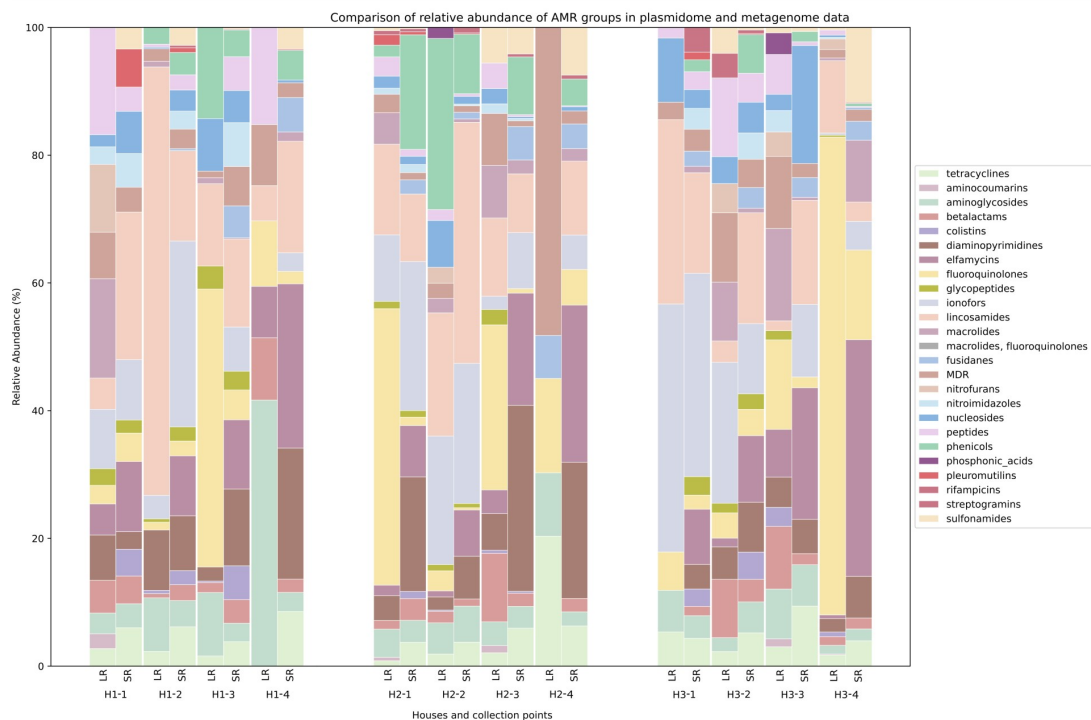
Analýza 12 vzorků plazmidomu z trusu kuřecí farmy ukázala široké spektrum MGE a genů rezistence. V obsahu a množství genů rezistence byly pozorovány změny v čase a rozdíly byly zjištěny i mezi různými halami. Nejčastější geny rezistence i typy plazmidů se lišily v různých halách a ve většině případů i v časových bodech v rámci jednotlivých hal. Nejčastěji byly nalezeny geny *qnr* pro rezistenci k fluorochinolonům (Obr. 1). Gen *qnrB36*-like, který se rozšířil v hale 3, byl nesen malým kolicinovým plazmidem typu MOBP, který je podobný plazmidu dříve popsanému u druhu *Salmonella enterica*. Kuřata ve všech halách byla po vylíhnutí přeléčena enrofloxacinem, čímž došlo k selekci a následnému rozšíření plazmidů kódujících geny pro rezistenci k fluorochinolonům. Navzdory tomu, že byla kuřata v hale 2 v důsledku velkého úhynu přeléčena kombinací sulfamethoxazol/trimethoprim, nebyla pozorovaná vyšší abundance genů pro rezistenci k sulfonamidům a diaminopyrimidinům. Porovnání plazmidomu ze sekvenování dlouhých čtení a metagenomu ze sekvenování krátkých čtení ukázalo rozdíly v zastoupení genů rezistence (Obr. 2).

V metagenomických datech byly více zastoupeny geny pro rezistenci k elfamycinům, které byly pravděpodobně kódovány na chromozomu. Relativní abundance genů pro rezistenci k fluorochinolonům byla v metagenomu mnohem nižší než v plazmidomu, a tedy tento typ rezistence považujeme za kódovaný plazmidy. Navzdory nižšímu zastoupení představují tyto plazmidy nesené geny riziko z důvodu možného šíření horizontální cestou mezi různými bakteriemi.



**Ob. 1:** Deset nejčastějších genů rezistence v plazmidomu kuřat





**Obr. 2:** Relativní abundance genů rezistence k různým skupinám antibiotik v plazmidomu a metagenomu.

### Závěr

Projekt poskytl nové a unikátní poznatky o dynamice a šíření mobilních genetických elementů a genů rezistence ve střevě drůbeže. Na základě získaných výsledků bylo možné stanovit rizika spojená s použitím antimikrobiálních látek na selekci a šíření plazmidů a determinant rezistence v konvenčních chovech. Byla optimalizovaná laboratorní metodika a bioinformatická pipeline pro studium plazmidomu a rezistomu v komplexních mikrobiálních populacích střeva hospodářských zvířat.

### Seznam literatury:

- [1] Van Boeckel T.P., Glennon E.E., Gilbert M., Robinson T.P., Grenfell B.T., Levin S.A., Bonhoeffer S., Laximnarayan R. Reducing antimicrobial use in food animals. *Science*, 2017, 357 (6358), doi: 10.1126/science.aao1495
- [2] Xie T., Fu L.-Y., Yang Q.-Y., Xiong H., Xu H., Ma B.-G., Zhang H.-Y. Spatial features for *Escherichia coli* genome organization. *BMC Genomics*, 2015, 16 (37), doi: 10.1186/s12864-015-1258-1
- [3] Sekirov I., Russell S.L., Antunes L.C.M., Finlay B.B. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*, 2010, 90(3):859-904, doi: 10.1152/physrev.00045.2009

**Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 223/2024/FVHE.**

## Prevalence filariální infekce v krvi a ektoparazitech netopýřů

Veronika Vévodová<sup>1</sup>, Monika Němcová<sup>1</sup>, Šárka Bednaříková<sup>1</sup>, Jiří Pikula<sup>1</sup>

*Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,  
Veterinární univerzita Brno<sup>1</sup>*

### Úvod

Netopýři jsou hostitelé široké škály virových, bakteriálních a mykotických patogenních agens, která jsou sledována s ohledem na jejich vysokou infekčnost, mortalitu nových hostitelů či potenciální riziko zoonóz. Filárie a jejich výskyt u netopýřů zatím nejsou důkladně prozkoumány. Do dnešní doby se však podařilo u různých druhů netopýřů identifikovat různé druhy filárií, zejména z rodu *Litomosa spp.*, například na území Mexika nebo Madagaskaru (Ramasindrazana et al., 2016; Rendón-Franco et al., 2019), případně jiných zaoceánských zemí. Díky těmto objevům se nám rozšiřují znalosti o jejich životním cyklu, interakci s hostiteli a dopadu na zdraví hostitele. Z území Evropy a Asie však existuje jen velmi malý vzorek záchytu těchto endoparazitů (Mészáros and Mas-Coma, 1980; Horvat et al., 2016), stále tak chybí ucelený přehled o jejich prevalenci u netopýřů na tomto území, což je hlavním cílem této studie.

Filárie osidlují především peritoneální dutinu, ale také mozek či srdeční komory a ovlivňují tak zdravotní stav a chování jejich hostitelů (Morand et al., 2006). Mezi zaznamenané klinické příznaky patří například slabost a respirační potíže a následné histopatologické nálezy na orgánech. Ne vždy se musí u všech jedinců určité klinické příznaky objevit (Rendón-Franco et al., 2019). Larvální formy mikrofilárií, byly zaznamenány také ve spermatu netopýřů, mohou tak ovlivnit jeho kvalitu a tím také ohrozit reprodukční úspěšnost netopýřů (Pikula et al., 2023).

Hlavní metoda pro záchyt filárií je detekce v krevním nátěru. V případě pozitivního nálezu jsou zvířata většinou usmrcena pro získání dospělých červů z tkání, aby mohli být pomocí morfologie druhově identifikováni. Při řešení tohoto projektu však byly druhy filárií zkoumány na základě pouze neletálně odebraných vzorků krve a neinvazivně odebraných vzorků krevsajících ektoparazitů netopýřů, kteří mají nejzásadnější roli v přenosu infekčních larválních stádií (infekční larva L3) z jednoho hostitele na druhého. Detekce mikrofilariální DNA v ektoparazitech tudíž může odrážet jejich přítomnost v krvi hostitelů, či přítomnost dospělých filárií v jejich tkáních. V naší studii je většina vzorků odebrána párově – tedy krev i ektoparazit z jednoho jedince. Z dostupných zdrojů pouze několik publikací sledovalo výskyt mikrofilárií v krevsajících ektoparazitech nebo identifikovalo ektoparazity jako kompetentní vektory filárií u netopýřů (Bain et al., 2002). Netopýři

jsou přítomni hostiteli široké škály těchto potenciálních vektorů, jako jsou roztoči, klíšťata, muchule nebo blechy. Zejména samice s mláďaty na letních koloniích jsou ektoparazity silně zatíženy, což podporuje potenciální přenos tzv. „vector-borne“ nemocí, včetně právě filarióz.

Cílem bylo získat informace o prevalenci a diverzitě filárií u netopýrů na eurasijském kontinentu a identifikovat potenciální vektory podílející se na přenosu mikrofilárií mezi hostiteli a zjistit druhovou příslušnost filárií pomocí sekvenace získané DNA.

## **Materiál a metodika**

### *Sběr vzorků*

Analýze byla podrobena kolekce 262 vzorků krví a 564 vzorků krevsajících ektoparazitů z 24 druhů netopýrů (*Rhinolophus ferrumequinum*, *Rhinolophus euryale*, *Rhinolophus blasii*, *Miniopterus schreibersii*, *Myotis blythii* a další), které měl náš Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryba a včel již k dispozici a zároveň byla tato kolekce doplněna o vzorky nasbírané během řešení projektu. Vzorky pocházely z oblastí České republiky, Bulharska, Arménie, Gruzie, Slovenska a Ruska. Ektoparaziti byli morfologicky určeni a uchovávaní ve zkumavkách se 70% etanolem až do následné analýzy.

### *Izolace DNA*

Ze vzorků ektoparazitů byla izolována DNA pomocí kitu NucleoSpin® TISSUE XS dle upraveného protokolu pro co nejvyšší výtěžnost DNA. Z krve byla DNA izolována pomocí kitu NucleoSpin® BLOOD (Macherey-Nagel, Německo). Koncentrace a kvalita získané DNA byla ověřena pomocí nano-spektrofotometru. Izolát DNA byl následně skladován při teplotě -20 °C.

### *Nested PCR*

Izolovaná DNA byla podrobena analýze pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). V tomto případě jsme použili vlastní metodu nested PCR pro detekci filárií (gen COX 1), vzniklou modifikací Casiraghi et al. (2021), která se vyznačuje vyšší citlivostí a specifičností. V prvním kole byly použity primery CF F3 (TTCTGTTTTDACTATRCATGG) a CF R5 (GCHACAACATAATAAGTATCATG), (934 bp). Ve druhém kole pak COI int F (TGATTGGTGGTTTTGGTAA) a COI int R (ATAAGTACGAGTATCAATATC), (689 bp). Reakční směs pro první kolo o objemu 20 µl obsahovala 10 µl Phusion Green Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix, 6 µl H<sub>2</sub>O, 1 µl každého z primerů a 2 µl izolované DNA. Podmínky reakce byly následující, 30 s při 98 °C, následovalo 35 cyklů 10 s při 98 °C, 20 s při 53 °C a 35 s při 72 °C. Po 35 opakováních probíhala reakce ještě dalších 5 min při 72 °C. Reakční směs pro druhé kolo o objemu 20 µl obsahovala 10 µl Phusion Green Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix, 7

μl H<sub>2</sub>O, 1 μl obou primerů a 1 μl směsi z prvního kola PCR. Podmínky reakce byly následující: 30 s při 98 °C, následovalo 40 cyklů 10 s při 98 °C, 20 s při 53 °C a 20 s při 72 °C a finální extenze 5 min při 72 °C.

#### *Gelová elektroforéza a sekvenace*

Pozitivní vzorky byly odhaleny pomocí gelové elektroforézy. Následně byly pozitivní vzorky podrobeny Sangerovu sekvenování (SeqMe s.r.o., Česká republika). Získané sekvence byly porovnány s dostupnými sekvencemi v GenBank pomocí MegaBLAST a editovány za použití Geneious Prime software (Biomatters Ltd., New Zealand).

### **Výsledky**

V rámci plnění tohoto projektu jsme otestovali celkem 262 vzorků krve a 564 vzorků ektoparazitů z různých druhů netopýrů z 6 zemí. V Bulharsku bylo odebráno a testováno 184, v Arménii 38 a v Gruzii bylo 40 vzorků krve. Celkem byl pozitivní záchyt filárií u 23 vzorků z celkového počtu 262, což činí průměrnou prevalenci filárií 8,8 % v krvi netopýrů. V Bulharsku je tato prevalence 4,9 % (pozitivních 9 ze 184), v Arménii 23,7 % (pozitivních 9 z 38) a v Gruzii 12,5 % (pozitivních 5 ze 40). Filárie v krvi byly zachyceny u druhu *Miniopterus schreibersii*, *Rhinolophus ferrumequinum*, *Myotis emarginatus* a *Myotis blythii*. Ektoparazité byli odebráni v Bulharsku (n=292), Arménii (n=74), Gruzii (n=92), Rusku (n=91), Česku (n=10) a na Slovensku (n=5). Celkem se jedná o 564 vzorků ektoparazitů. Výskyt filárií u odebraných parazitů byl zaznamenán ve 28 případech, a to v Bulharsku (12 pozitivních, prevalence 4,1 %), Arménii (4 pozitivní, prevalence 5,4 %), Gruzii (8 pozitivních, prevalence 8,7 %) a Rusku (4 pozitivní, prevalence 4,4 %) a celková prevalence filárií v ektoparazitech netopýrů tak činí 5 %. Druhové zastoupení pozitivních ektoparazitů bylo v širším spektru, jedná se o *Spinturnix psi* a *myoti*, *Ixodes simplex* a *vespertilionis*, *Penicillidia dufouri*, *Nycteribia latreillei*, *kolenatii* a *schmidli*, *Eyndhovenia euryalis*, *Steatonyssus spinosus* a *Phthiridium biarticulatum*. Tyto pozitivní vzorky ektoparazitů byly odebrány u druhu *Miniopterus schreibersii*, *Rhinolophus ferrumequinum*, *Myotis myotis*, *Myotis capaccinii*, *Rhinolophus hipposideros* a *Vespertilio murinus*. Sekvenací byly určeny druhy filárií rodu *Litomosa* sp., nový druh příbuzný *Litomosa chiropteroorum*, a dva nové druhy patřící do nového blíže neurčeného rodu čeledi Onchocercidae. Pozitivní vzorek krve i ektoparazita u jednoho jedince byl zaznamenán pouze v jednom případě v Bulharsku a ve třech případech v Arménii, kdy párové vzorky potvrdily stejný druh filárie, jak v krvi netopýra, tak v jejich ektoparazitech.

## Závěr

V této studii jsme se zaměřili na detekci filariální infekce u netopýrů a jejich ektoparazitů, jako na jednu z důležitých ale jen zdánlivě prozkoumaných oblastí v rámci infekční zátěže netopýrů. Celková prevalence filárií v krvi netopýrů činí 8,8 % a v jejich ektoparazitech 5 %. Detekovány byly filárie rodu *Litomosa* sp., Onchocercidae sp. ale také nové druhy příbuzné *Litomosa chiropterorum*, *Breinlia* sp. a naší Onchocercidae sp.

## Seznam literatury:

- Bain, O., Babayan, S., Gomes, J., Rojas, G., Guerrero, R. (2002). First account on the larval biology of a *Litomosoides* filaria, from a bat. *Parassitologia*, 44(1-2), 89-92.
- Casiraghi, M., Anderson, T.J.C., Bandi, C., Bazzocchi, C., Genchi, C. (2001). A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of Wolbachia endosymbionts. *Parasitology*.122(1):93-103. doi:10.1017/S0031182000007149.
- Horvat, Ž., Čabrilo, B., Paunović, M., Karapandža, B., Jovanović, J., Budinski, I., Bjelić Čabrilo, O. (2016). The helminth fauna of the greater horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*) (Chiroptera: Rhinolophidae) on the territory of Serbia. *Biologia Serbica*, 37(1-2).
- Mészáros, F., Mas-Coma, S. (1980). On some parasitic helminths from Spanish bats. *Parasitologia Hungarica*, 13, 59-64.
- Morand, S., Krasnov, B.R., Poulin, R. (Eds.). (2007). Micromammals and macroparasites: from evolutionary ecology to management. *Springer Science & Business Media*.
- Pikula, J., Piacek, V., Bandouchova, H., Bartlova, M., Bednarikova, S., Burianova, R., Danek, O., Jedlicka, P., Masova, S., Nemcova, M., Seidlova, V., Zupalova, K., Zupal, J. (2023). Case report: Filarial infection of a parti-coloured bat: *Litomosa* sp. adult worms in abdominal cavity and microfilariae in bat semen. *Frontiers in Veterinary Science*, 10. doi: 10.3389/fvets.2023.1284025
- Ramasindrazana, B., Dellagi, K., Lagadec, E., Randrianariveolosia, M., Goodman, S.M., Tortosa, P. (2016) Diversity, Host Specialization, and Geographic Structure of Filarial Nematodes Infecting Malagasy Bats. *PLoS ONE* 11(1): e0145709. doi: 10.1371/journal.pone.0145709.
- Rendón-Franco, E., López-Díaz, O., Martínez-Hernández, F., Villalobos, G., Muñoz-García C.I., Aréchiga-Ceballos, N., Alfonso-Toledo, J.A., García Flores, M.M., Setién A.A. (2019). *Litomosoides* sp. (*Filarioidea: Onchocercidae*) Infection in Frugivorous Bats (*Artibeus* spp.): Pathological Features, Molecular Evidence, and Prevalence. *Tropical Medicine and Infectious Disease* 4: 77. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4020077>.

**Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 224/2024/FVHE**

Editovali:	prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D. prof. MVDr. Alois Čížek, CSc. doc. MVDr. Miša Škorič, Ph.D. prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D., Dipl. ECZM doc. MVDr. Josef Kameník, CSc., MBA
Název:	Konference Interní grantové agentury VETUNI
Počet stran:	96
Vydání:	První
Vydavatel:	Veterinární univerzita Brno Brno 2024

**ISBN 978-80-7305-974-3**