

Závěrečné zprávy projektů ITA
realizovaných v roce 2024
prostřednictvím
Interní tvůrčí agentury VETUNI



VETUNI 2024

Vážení kolegové,

v roce 2024 úspěšně pokračovala činnost Interní tvůrčí agentury VETUNI (ITA VETUNI), jako jednoho z pilířů strategie rozvojového plánu tvůrčí činnosti na univerzitě.

Agentura ITA je financována z prostředků MŠMT určených pro Dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace (DKRVO). Během šestého roku své existence financovala ITA celkem 14 projektů z obou fakult VETUNI a CEITEC VETUNI a umožnila tak vědeckým pracovníkům univerzity získat experimentální data a ověřovat vědecké hypotézy, které mohou být v budoucnosti rozpracovány do podoby projektů národních nebo mezinárodních grantových agentur.

Činnost Interní tvůrčí agentury VETUNI probíhá dle příslušné směrnice rektora VETUNI a je kontrolována komisí ITA VETUNI, složenou ze zástupců všech součástí univerzity. Tím je zaručena objektivita při rozdělování finančních prostředků na dlouhodobý koncepční rozvoj na VETUNI a jejich přidělování jednotlivým řešitelům.

Závěrečné hodnocení každého ročníku na konferenci ITA VETUNI je pak mechanismem kontroly správné realizace jednotlivých projektů ale také popularizace činnosti agentury v rámci univerzity. ITA VETUNI 2024 osvědčuje rozvoj vědecké a tvůrčí činnosti na univerzitě a je příkladem účelně investovaných finančních prostředků jako odpovědi univerzity na požadavek MŠMT o strategickém rozdělování prostředků určených na DKRVO.

Závěrem chci poděkovat všem členům Komise ITA VETUNI, sekretariátu VVZ a všem, kteří se zapojili do činnosti komise a úspěšné organizace letošní konference ITA VETUNI 2024.

prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.

prorektor pro vědu, výzkum a zahraniční vztahy

předseda Komise ITA VETUNI

Brno, leden 2025

Komise Interní tvůrčí agentury VETUNI

ITA VETUNI

prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.

předseda komise

prof. MVDr. Vladimír Večerek, CSc., MBA

místopředseda komise

Členové:

FVL doc. MVDr. Miša Škorič, Ph.D.

doc. MVDr. Markéta Sedlinská, Ph.D.

FVHE prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D.

doc. MVDr. Josef Kameník, CSc., MBA

CEITEC prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.

prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.

Externí člen prof. MUDr. Petr Gál, Ph.D., MBA

Seznam projektů

ITA VETUNI řešených v roce 2024

Číslo projektu	Název projektu	Řešitel
2024ITA11	Antibakteriální a antivirové látky dalších generací v terapii infekcí psa a kočky	prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.
2024ITA12	Léčba onemocnění zvířat zájmových chovů s využitím moderních mini-invazivních chirurgických zákroků a biomateriálů	doc. MVDr. Michal Crha, Ph.D.
2024ITA13	Diverzita a management parazitárních infekcí v oborových chovech zvěře	MVDr. Barbora Červená, Ph.D.
2024ITA14	Problematika chorob přežvýkavců a koní	doc. MVDr. Josef Illek, DrSc. Dipl. ECBH
2024ITA15	Vliv azitromycinu na morfologii srdce, srdeční funkci a mikrobiom u králíka a potkana	doc. MVDr. Vladimír Jekl, Ph.D., Dipl. ECZM
2024ITA16	Syndrom paroxysmální gluten-senzitivní dyskineze (PGSD) u borderteriérů – hledání možných genetických příčin	MVDr. Karla Stejskalová, Ph.D.
2024ITA21	Vybrané ukazatele bezpečnosti a kvality surovin a potravin živočišného původu a jejich rostlinných alternativ	doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.
2024ITA22	Zdravotní stav a produkční parametry vybraných druhů potravinových zvířat a kvalita surovin živočišného původu jako důsledek využití kvalitních krmiv, resp. jejich doplňků	doc. MVDr. Radka Dobšíková, Ph.D.
2024ITA23	Patogenní organismy a jejich hostitelé v přírodním prostředí	prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.
2024ITA24	Zoologická medicína: zdravotní problematika evropské fauny	prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D., dipl. ECZM

2024ITA25	Vedlejší produkty rostlinného původu jako součást nových biodegradabilních/jedlých produktů pro ochranu životního prostředí a mechanismus ochrany zdraví před alergenními složkami potravin	prof. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.
2024ITA26	Vliv vybraných faktorů na pohodu zvířat	prof. Ing. Eva Voslášková, Ph.D.
2024ITA31	One Health Concept, molekulární epidemiologie antibiotické rezistence bakterií izolovaných z volně žijících ptáků a drůbeže	prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.
2024ITA32	Geny chování ve vztahu k domestikaci u čeledi Equidae	Mgr. Martin Plášil, Ph.D.

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2024

Identifikační číslo projektu: 2024ITA11

Název projektu: Alternativní antivirové a antibakteriální látky dalších generací v terapii infekcí psa a kočky

Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.

Fakulta/celoškolské pracoviště: FVL, Ústav infekčních chorob a mikrobiologie

E-mail: celerv@vfu.cz

Telefon: 541562281

Řešitelský kolektiv:

složení řešitelského týmu: (akademičtí pracovníci a jejich příslušnost k ústavům nebo klinikám fakulty nebo výzkumným skupinám CEITEC, studenti DSP) a forma zapojení každého člena řešitelského týmu

Řešitelský kolektiv tvořili následující akademičtí pracovníci Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie:

Prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D., úvazek na FVL 1,0,

MVDr. Martina Masaříková, Ph.D., úvazek na projektu 1.0

MVDr. Dobromila Molinková, Ph.D., úvazek na projektu 1.0

MVDr. Dana Lobová, Ph.D., úvazek na projektu 1.0

Mgr. Miroslava Barančková, Ph.D. úvazek na projektu 1.0

MVDr. Dušan Haas, úvazek na projektu 1.0

Mgr. Věra Vaibarová (roz. Nováková): úvazek na projektu 0,5

Mgr. Aneta Papoušková, Ph.D.: úvazek na projektu 1,0

Mgr. Lucie Hrubá, úvazek na projektu 0,5

V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu:

Tento návrh je projektem pracovníků Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie Fakulty veterinárního lékařství. Do řešení projektu nejsou zapojeny další součásti VETUNI.

Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Navrhovaný projekt zapadá do rámce výzkumu VETUNI stanoveného prioritami soutěže na projekty podporované prostřednictvím ITA VETUNI pro rok 2024, tj. problematika původců infekčních onemocnění a nálezů zvířat. Zároveň projekt zapadá rámcově do výzkumné činnosti řešitelského týmu složeného z pracovníků Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie.

Cíle projektu:

Cílem projektu bylo studium antivirových a antibakteriálních látek s cílem stanovit jejich odpovídající antimikrobiální efekt nebo mechanismy přenosu.

Dílčí cíl 1 - Stanovení prevalence vankomycin rezistentních enterokoků v trávicím traktu zvířat chovaných v České republice

Dílčí cíl 2 - Antivirové účinky fytohormonů (KIN-THF a HM) na parvovirus masožravců

Popis a metodika řešení projektu:

Dílčí cíl 1

V letech 2019-2023 byly na našem ústavu založeny sbírky biologického materiálu původem od různých druhů zvířat zahrnujících také trus, který se bezprostředně po odebrání kultivoval v tekutých bakteriologických médiích pro pomnožení přítomných bakterií (peptonová voda), což umožňuje jejich dlouhodobé uchování při teplotách – 80 °C. Takto uchovávaný materiál byl vyšetřen v rámci aktuálního projektu, konkrétně šlo o 163 vzorků získaných od psů, 64 koček a 279 telat. Nově jsme v průběhu roku 2024 založili sbírku trusu, respektive pomnožených peptonových vod, odebraných od 101 koní hospitalizovaných na Klinice chorob koní VETUNI.

Po částečném rozmrazení byla pomnožená peptonová voda kultivována paralelně do tří zkumavek obsahujících selektivní pomnožovací bujón pro izolaci enterokoků (VRE broth, Oxoid, VB), přičemž každá ze zkumavek byla obohacena o jedno ze tří antibiotik (ampicilin, chloramfenikol, vankomycin), za účelem selekce enterokoků rezistentních k některému z těchto antimikrobik. Po 24 hodinové aerobní inkubaci při 37 °C následovala inokulace 10 µl antibiotického VRE bujónu na Slanetz-Bartley agar taktéž obohacený o ampicilin, chloramfenikol, nebo vankomycin. Konkrétně, pomnožený materiál z VRE bujónu s přídavkem ampicilinu byl inokulován na Slanetz-Bartley agar obohacený také o ampicilin, totéž platilo pro zbývající dvě antibiotika.

Bakterie s typickou morfologií kolonií jsme identifikovali metodou MALDI – TOF MS. U izolátů druhů *faecalis* a *faecium* jsme vyšetřili citlivost k vybraným antimikrobiálním látkám zahrnujícím ampicilin (Amp), chloramfenikol (C), ciprofloxacin (Cip), erytromycin (E), nitrofurantoin (F), gentamicin (Gn), linezolid (Lin), kvinupristin-dalfopristin (Q/D), streptomycin (S), tetracyklin (T), teikoplanin (Tec) a vankomycin (Van) diskovým difúzním testem. Vlastní provedení testu a interpretace výsledků včetně zahrnutí pozitivních kontrol proběhlo v souladu s dokumentem CLSI (2020) a Eucast (2024).

Vybrané kmeny s profilem rezistence k vankomycinu či jiným závažným fenotypem rezistence budou v prvních měsících roku 2025 analyzovány celogenomovým sekvenováním. Informace, které prostřednictvím WGS získáme, budou porovnány s daty uvedenými v databázích genomů významných druhů mikroorganismů. Prostřednictvím příslušných softwarových programů vyhodnotíme kromě ST typů, faktorů asociovaných s virulencí a genotypu rezistence především míru příbuznosti našich animálních izolátů s kmeny humánní proveniencí a tím posoudíme možnost sdílení fekálních enterokoků se závažným typem rezistence mezi člověkem a jím chovanými zvířaty.

Dílčí cíl 2

Studium antivirové aktivity testovaných látek bylo provedeno na modelu protoparvoviru masožravců izolovaného na území ČR, kultivovaného na buněčné kultuře Crandell-Rees Feline Kidney (CRFK) v minimálním esenciálním médiu obohaceném o 5% fetal bovine serum a v atmosféře s 5% CO₂.

V experimentu byl testován vliv fytofarmak KIN-THF (6-furfurylamino-9-tetrahydrofuran-2-yl-purin) a HM (N⁶-hydroxymethyladenin) (Katedra chemické biologie, Univerzita Palackého v Olomouci). Každá substance byla rozpuštěna v DMSO a poté naředěna na pracovní koncentraci v DMEM obohaceném o 2 % fetálního bovinního séra.

Abychom stanovili koncentraci, ve které testované látky ještě vykazovaly cytotoxický efekt na buněčnou kulturu, byly testovány jejich různé koncentrace (1–1000 µM) a srovnány s negativní kontrolou. Po 72 hodinách byla odečtena úroveň cytotoxicity pro každou testovanou koncentraci každé substance. Koncentrace látek, která již nebyla pro buněčnou kulturu cytotoxická byla použita jako výchozí pro testování antivirové aktivity. Obě fytofarmaka byla testována ve dvou koncentracích (100 µM a 200 µM), které byly odečtené jako bezpečné.

Testování antivirové aktivity bylo provedeno na 96 jamkové mikrotitrační destičce. Na monolayer CRFK buněk bylo aplikováno 90 µl testované látky rozpuštěné v DMEM. Takto ošetřený monolayer byl ponechán po dobu jedné hodiny v termostatu. Po uplynutí jednododinové kultivace bylo na buňky přidáno 10 µl virové suspenze (5,1 TCID₅₀). Následně byl virus kultivován po dobu 72 hodin a vzorek supernatantu (10 mikrol) pro stanovení koncentrace extracelulárního viru byl odebírán po 24 hodinách.

Kvantifikace viru byla provedena kvantitativním PCR testem (qPCR). Použité primery a sonda byly navrhnuty na Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie a dodány firmou Generi-Biotech (ČR).

Dosažené výsledky projektu:

Dílčí cíl 1

V rámci předkládané studie bylo vyšetřeno 163 rektálních výtěrů psů, 64 koček, 101 koní a 279 rektálních výtěrů telat, každý vzorek reprezentoval vždy jednoho jedince. Pozitivní záchyt rezistentních enterokoků druhů *faecalis* a/nebo *faecium* prostřednictvím selektivní kultivace na bakteriologických půdách s obsahem ampicilinu, chloramfenikolu, nebo vankomycinu, byl zaznamenán u 42 psů (26 %), 16 koček (25 %), 67 koní (66 %) a 151 telat (54 %). Vzhledem ke zvolenému postupu bakteriologické izolace, kdy byl jeden vzorek vždy kultivován paralelně na tři média obohacená třemi různými antimikrobiky, bylo možné od jednoho zvířete získat více než jeden izolát enterokoků druhů *faecalis* a/nebo *faecium*. Dohromady jsme z rektálních výtěrů psů izolovali 28 kmenů *Enterococcus faecalis* a 15 *E. faecium*, ze vzorků koček potom 16 izolátů *E. faecalis* a dva izoláty *E. faecium*. Z rektálních výtěrů koní bylo získáno 66 izolátů *E. faecalis* a 29 *E. faecium*, ze vzorků telat jsme izolovali 89 *E. faecalis* a 97 *E. faecium*.

Diskovým difúzním testem jsme identifikovali rezistenci alespoň k jednomu ze dvanácti testovaným antibiotikům u všech 43 izolátů pocházejících z 163 rektálních výtěrů stejného počtu psů. Mezi 28 izoláty *E. faecalis* se v nejvyšším procentu vyskytovala rezistence ke kvinupristin-dalfopristinu (86 %) izoláty *E. faecium* byly v nejčastěji rezistentní k ampicilinu a nitrofurantoinu (87 % a 73 %), rezistenci jsme nenalezli vůči vankomycinu. Fenotyp rezistence k rezervnímu antibiotiku vankomycinu byl identifikován pouze u šesti enterokoků druhu *faecalis*.

Kočičí izoláty *E. faecium* vykazaly fenotypy rezistence ke dvěma (erytromycin, kvinupristin-dalfopristin) a šesti antimikrobikům (ampicilin, erytromycin, nitrofurantoin, kvinupristin-dalfopristin, streptomycin a tetracyklin). Mezi 16 kočičími izoláty *E. faecalis* se v nejvyšším procentu vyskytovala rezistence

ke kvinupristin-dalfopristinu (94 %) následovaná rezistencí k tetracyklinu. Tři izoláty *E. faecalis* rezistentní k vankomycinu vykazaly fenotyp rezistence Q/D,T, Van (dva izoláty) a Q/D,S,T, Van (jeden izolát).

Ve skupině 66 koňských *E. faecalis* se nacházely izoláty rezistentní k jednomu až deseti vyšetřovaným antimikrobikům, u nejpočetnější skupiny izolátů rezistentních k šesti ze dvanácti testovaným antibiotikům jsme popsali dominující fenotyp, a to C,E,Gn,Q/D,S,T. Mezi 29 enterokoky druhu *faecium* jsme identifikovali dva izoláty, které byly citlivé ke všem dvanácti testovaným antibiotikům, u ostatních *E. faecium* byla identifikována rezistence k jednomu až sedmi antimikrobikům, přičemž

nejpočetnější byla rezistence k šesti látkám současně (u osmi *E. faecium*). Nejzastoupenější rezistenci mezi

66 koňskými *E. faecalis* byla se sta procenty rezistence ke kvinupristin-dalfopristinu, u *E. faecium* k tetracyklinu (86 %). Fenotyp rezistence k vankomycinu byl identifikován pouze u enterokoků druhu *faecalis* (21/66, 32 %), přičemž 19 z nich bylo rezistentních dokonce k 7 - 10 antibiotikům současně.

Z biologického materiálu původem od 279 telat jsme získali sbírku 186 enterokoků (89 *E. faecalis* a 97 *E. faecium*), při diagnostice citlivosti diskovým difúzním testem nebyl v celém souboru 186 enterokoků nalezen jediný plně citlivý izolát, všechny kmeny byly rezistentní minimálně k jednomu antibiotiku. V souboru 89 *E. faecalis* se v nejvyšším procentu vyskytovala rezistence k tetracyklinu

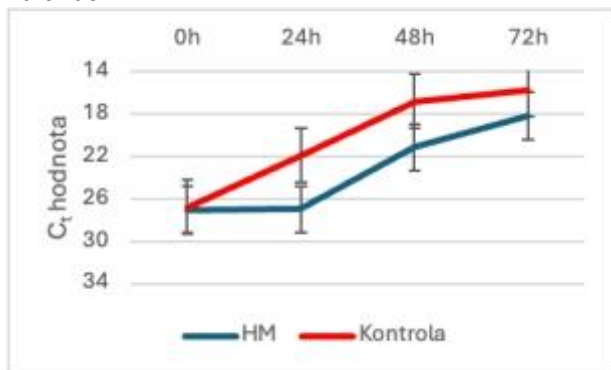
(88 %). Rezistenci k vankomycinu jsme identifikovali u 37 procent *E. faecalis*, kdy všechny tyto izoláty byly současně multirezistentní. Mezi 97 enterokoky druhu *faecium* byla nejčastěji přítomna rezistence k erytromycinu (90 %). Fenotyp rezistence k vankomycinu byl diagnostikován u 6 izolátů (6 %)

E. faecium, všechny jsme také určili jako multirezistentní s odolností současně vůči 4 – 8 testovaným antimikrobikům.

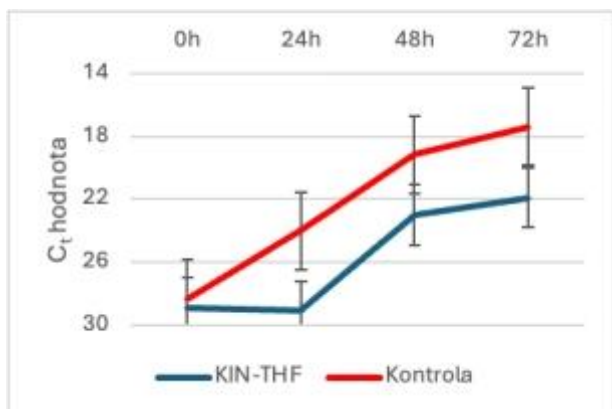
Dílčí cíl 2 Antivirové účinky fytofarmak na vybrané virové původce onemocnění psa a kočky

Cílem práce bylo stanovení vlivu testovaných látek na replikaci viru v *in vitro* kultivačním systému. V experimentu byl testován vliv fytofarmak KIN-THF a HM. Pro kvantifikaci antivirotického účinku látky byl proveden odběr média z každého zkoumaného vzorku v intervalu 24 hodin a následně byl vzorek podroben kvantitativnímu PCR testu – porovnání C_t hodnot s kontrolou. HM vykazoval zpomalení množení viru a lze předpokládat jeho případné využití k doplňkové terapii parvovirózy. KIN-THF vykazoval rovněž zpomalení virové replikace. Buněčný monolayer ošetřený tímto fytofarmakem

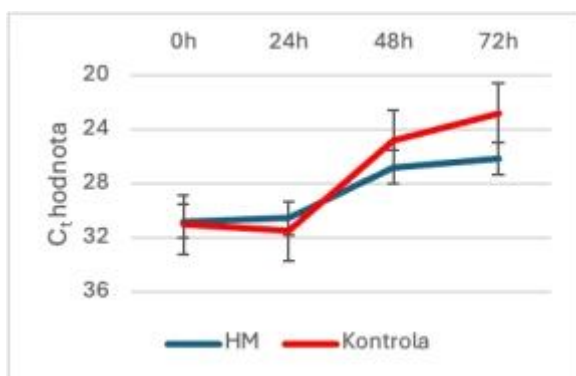
a infikovaný parvovirem, byl ale v porovnání s negativní kontrolou poškozený po uplynutí 72hodinové kultivaci.



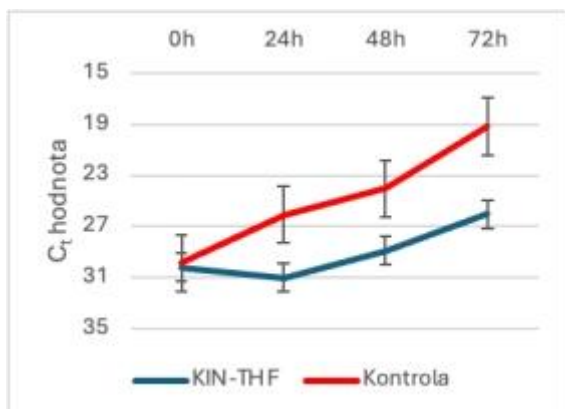
Graf č. 1: Porovnání C_t hodnot 100 μ M HM s pozitivní kontrolou



Graf č. 2: Porovnání C_t hodnot 100 μ M KIN-THF s pozitivní kontrolou



Graf č. 3: Porovnání C_t hodnot 200 μ M HM s pozitivní kontrolou



Graf č. 4: Porovnání C_t hodnot 200 μ M KIN-THF s pozitivní kontrolou

Přínos projektu:

Studie potvrdila význam enterokoků jako rezervoáru antibiotické rezistence v různých druzích zvířat a riziko jejich přenosu na člověka v rámci konceptu "One Health". Tyto výsledky zdůrazňují potřebu monitoringu antimikrobiální rezistence nejen u hospodářských, ale také společenských zvířat. Získané poznatky mohou přispět k optimalizaci správné antibiotické praxe ve veterinární medicíně a zvýšení povědomí o riziku šíření rezistentních bakterií.

Podařilo se nám prokázat antivirové účinky fytofarmaka HM na replikaci protoparvoviru masožravců, který statisticky významně inhiboval jeho replikaci na buněčné kultuře CRFK. Replikace viru byla

snížena o řád u obou koncentrací a přetrvávala do konce sledovaného období (72 hodin). Podobnou inhibici viru jsme pozorovali i u KIN-THF, ale vzhledem k destruktivnímu vlivu na buněčný monolayer i přes použití bezpečné koncentrace látky, nelze předpokládat využití tohoto fytofarmaka v praxi.

Využití výsledků:

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

- Hrubá J. L., Celer, V. Testing of antiviral effects of selected substances on carnivore parvovirus replication, Res Vet Sci,
- Isolation of vancomycin-resistant *E. faecalis* and *E. faecium* from farm and pet animals breeding in Czech Republic. Veterinary microbiology, IF = 3.246, Q1

Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	954 700,00	954 700,00
Služby	100 000,00	96 679,03
Cestovné	120 000,00	120 000,00
Další provozní náklady	201 060,00	204 380,97
Doplňkové náklady	206 364,00	206 364,00
Celkem	1 582 124,00	1 582 124,00

Zdůvodnění nákladů:

(komentář k čerpání finančních prostředků na řešení projektu – slovní popis v členění jednotlivých položek nákladů a konkrétní výčet, na co byly prostředky využity, komentář a zdůvodnění případných změn a rozdílů oproti schválenému rozpočtu projektu)

Osobní náklady:

Osobní náklady byly čerpány na složky mzdy a odměny členů řešitelského týmu z řad akademických pracovníků. Osobní náklady byly čerpány dle návrhu projektu.

Cestovné:

Částka určená na cestovné 120 000,00 Kč byla čerpána ve výši 120 000,- Kč. **Cestovní náklady** ve výšce 120 000 Kč byly využity k uhrazení nákladů za ubytování a konferenční poplatky konference 10th international scientific meeting „Days of veterinary medicine“ and 2th European conference on veterinary and medical education“ v Ohridu, Severní Makedonii, kde řešitelé prezentovali dosažené výsledky formou posterů s názvy Identification of *E. coli* resistant to beta-lactam antibiotic isolated from czech dairy calves“ a „Comparative genomic analysis of ESBL/AmpC betalactamase-producing *E. coli* from Czech dairy calves“ a dále na konferenci „Seminars in Virology“ konané v říjnu 2024 na University Bologna, Bertinoro, Itálie.

Další provozní náklady:

Provozní náklady (201 060,- Kč) byly využity na nákup spotřebního materiálu a chemikálií. Konkrétně na zakoupení materiálu k odběru a transportu vzorků (sterilní tampóny, odběrové soupravy s transportními půdami), k bakteriologické kultivaci, druhové identifikaci izolátů, vyšetření antimikrobiální rezistence a uchování izolátů (média pro přípravu univerzálních a selektivních médií –

Columbia agar, McConkey agar, kryoprotektivní média, antibiotické substance pro suplementaci půd, MALDI matrice). Dále náklady na pořízení laboratorního plastu a pomůcek zajišťujících běžný chod laboratoře (Petriho misky, bakteriologické kličky a hokejky, sterilní špičky s filtrem, zkumavky, kryozkumavky, plast pro kryokonzervaci, dezinfekce, rukavice).

Náklady na služby, 100 000,- Kč, byly použity na pronájem láhví se stlačeným CO₂. sekvenaci vzorků, servisu laboratorních přístrojů a zařízení a zhotovení posteru na konferenci.

Doplňkové náklady:

Doplňkové náklady byly čerpány v souladu s návrhem projektu.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě doložte výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2024 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VETUNI bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu: prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2024 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu **odpovědného za čerpání prostředků:** prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.

Přednosta ústavu nebo kliniky, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu nebo klinice, respektive celoškolském pracovišti, které řídí.

Datum, jméno a podpis

přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:

Ing. Vladimír Kohoutek

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Doc. MVDr. Michal Crha, Ph.D.

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2024

Identifikační číslo projektu: 2024ITA12

Název projektu: Léčba onemocnění zvířat zájmových chovů s využitím moderních mini-invazivních chirurgických zákroků a biomateriálů

Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: doc. MVDr. Michal Crha, Ph.D.

Fakulta/celoškolské pracoviště: FVL, KCHPK

E-mail: crham@vfu.cz

Telefon: +420 541 562 582

Zástupce řešitele: MVDr. Andrea Nečasová, Ph.D.

Řešitelský kolektiv:

Složení řešitelského týmu: (akademičtí pracovníci a jejich příslušnost k ústavům nebo klinikám fakulty nebo výzkumným skupinám CEITEC, studenti DSP) a forma zapojení každého člena řešitelského týmu

Doc. MVDr. Michal Crha, Ph.D. (KCHPK, FVL, 1,0) – řešitel, koordinace projektu, podíl na publikačních výstupech a analýze výsledků projektu. H index = 9, Q1 a Q2 celkem 2 za poslední 3 roky.

MVDr. Andrea Nečasová, Ph.D. (KCHPK, FVL, 1,0) – zástupce řešitele, shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů. H index = 2, Q1 a Q2 celkem 2 za poslední 3 roky

Prof. MVDr. Alois Nečas, Ph.D., MBA (KCHPK, FVL, 1,0) – spoluřešitel, analýza a zpracování výsledků, podíl na publikačních výsledcích. H index = 19, Q1 a Q2 celkem 4 za poslední 3 roky

MVDr. Lucie Urbanová, Ph.D. (KCHPK, FVL, 1,0) – shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů. H index = 7, Q1 a Q2 celkem 1 za poslední 3 roky

MVDr. Jana Lorenzová, Ph.D. (KCHPK, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů. H index = 6, Q1 a Q2 celkem 4 za poslední 3 roky

MVDr. Pavel Proks, Ph.D. (KCHPK, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů. H index = 7, Q1 a Q2 celkem 2 za poslední 3 roky

MVDr. Alena Šabatová (DSP student prezenční, 3. ročník) - zapojení do shromažďování a zpracování výsledků, klinická i laboratorní práce v rámci řešení projektu. H index = 0

V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu:

Není společným projektem více součástí VETUNI.

Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Předmět řešení projektu je v souladu s výzvou Interní tvůrčí agentury (ITA) VETUNI a strategií výzkumu na Fakultě veterinárního lékařství VETUNI, kdy mezi současné a perspektivní směry výzkumu, kromě jiného, patří ověřování nových diagnostických a mini-invazivních léčebných postupů v diagnostice a chirurgické léčbě onemocnění zvířat zájmových chovů. Cílem projektu je rozvíjet a uvádět do rutinní praxe nejnovější diagnostické a léčebné postupy využívající moderní miniinvazivní zákroky, biomateriály a biotechnologie, jejichž použití je indikováno v souvislosti s léčbou vrozených či vývojových onemocnění zvířat zájmových chovů.

Cíle projektu:

Projekt má dva dílčí cíle, a to: 1) Zhodnocení přínosu mini-invazivní transuretrální cystoskopie při diagnostice, respektive léčbě ektopických ureterů (EU) uroendoskopicky asistovanou laserovou ablací (UALA). 2) Zhodnotit vliv histopatologických změn jaterního parenchymu u psů s vrozeným portosystémovým zkratem léčených chirurgicky za použití ameroidního konstriktoru na prognózu onemocnění.

Popis a metodika řešení projektu:

Cíl 1: Zhodnocení přínosu transuretrální cystoskopie v diagnostice abnormalit urogenitálního traktu fen a vyhodnocení bezpečnosti léčby intramurálních EU s využitím mini-invazivní UALA

V rámci retrospektivní klinické studie byly vyhodnocena data shromážděná ze zdravotních záznamů pacientů souboru 30 fen chirurgicky léčených pro ektopický ureter v letech 2010-2024 (A=15 otevřený; B=15 endoskopický přístup). Předmětem analýzy bylo posouzení anamnézy, výsledků klinického

a paraklinického vyšetření (hematologické a biochemické vyšetření krve, analýzy moči, nálezů ze zobrazovací diagnostiky a provedené uroendoskopie, výskytu dalších morfologických abnormalit, případně komplikací a nutnosti pooperačního podávání léčiv pro posílení funkce uretrálního sfinkteru). Analyzovány byly také data z anesteziologických protokolů a videozáznamy z provedených uroendoskopií. Byl vytvořen dotazník (stanovující skóre kontinence) pro získání zpětné vazby od majitelů s cílem získání informace o úspěšnosti léčby a zhodnocení výsledku jednotlivých metod ošetření.

Cíl 2: Zhodnocení výsledků histopatologického vyšetření jater s ohledem na klinické výsledky chirurgické léčby a pooperační prognózu pacientů s portosystémovým zkratem

Byl hodnocen soubor psů, kteří byli ošetřeni na oddělení Chirurgie a ortopedie KCHPK, FVL VETUNI, u kterých byla diagnostikována vrozená forma portosystémového zkratu (PSS, intra- nebo extrahepatálního), a kteří byli následně léčeni chirurgicky s použitím ameroidního konstriktoru a u kterých byla během chirurgického zákroku provedena excizní biopsie jater a jeho histologické vyšetření. Pacienti byli na základě míry histologického poškození jaterní tkáně zařazeni do jedné z následujících skupin:

1. mírné poškození jaterního parenchymu – intaktní parenchym nebo zachovalá trabekulární struktura jaterní tkáně, avšak s přítomností fokální dystrofie;

2. těžké poškození jaterního parenchymu – absence trabekulární organizace jaterní tkáně nebo přítomnost celoplošné dystrofie.

Samostatně pak byla hodnocena přítomnost velkokapénkové steatózy v jaterním parenchymu. V době >6 měsíců od provedené atenuace PSS ameroidním konstriktorem byl na základě komunikace s majitelem hodnocen klinický výsledek pacientů po operaci a podle získaných informací byl každý pacient zařazen do jedné z následujících 3 skupin:

1. pacient s výborným klinickým výsledkem po operaci = pacient je klinicky bez obtíží, nepotřebuje přijímat speciální dietu ani léky;

2. pacient s dobrým klinickým výsledkem po operaci = pacient je klinicky bez obtíží, ale přijímá speciální dietu nebo léky;

3. pacient se špatným klinickým výsledkem po operaci = u pacienta přetrvávají klinické příznaky PSS nebo pacient zemřel v souvislosti s PSS (kdykoliv v době sledování).

Následně byl statisticky hodnocen vliv stupně histologického poškození na vybrané klinické a laboratorní parametry u psů s PSS.

Dosažené výsledky projektu:

Cíl 1: Zhodnocení přínosu transureterální cystoskopie v diagnostice abnormalit urogenitálního traktu fen a vyhodnocení bezpečnosti léčby intramurálních EU s využitím mini-invazivní UALA.

Do souboru byla zařazeno 30 fen chirurgicky ošetřených na KCHPK pro ektopický ureter v letech 2010-2024 z toho 15 pacientů ošetřených UALA, resp. 15 ošetřených otevřeným přístupem. Transuretrální cystoskopie poskytovala detailní zobrazení struktur urogenitálního aparátu a spolehlivě odhalila přítomnost EU včetně dalších vrozených abnormalit (tj. dvojí ústí ektopického ureteru, přítomnost vaginálního septa, vaginálního pruhu, perzistentní urachus aj.). Byly stanoveny ablační protokoly pro laserovou korekci intramurálního EU diodovým (vlákno 600 μ m, energie 12W), resp. holmiovým laserem (vlákno 365 μ m, frekvence 10Hz, energie 10W)). Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v délce chirurgického ošetření při použití diodového či holmiového laseru ($p=0,075$), taktéž nebyl zjištěn rozdíl v podobě výskytu perioperačních a pooperačních komplikací. Při použití holmiového laseru docházelo subjektivně k menšímu kolaterálnímu poškození tkání provázené minimálním krvácením bez nutnosti dalšího ošetření. Chirurgická korekce EU otevřeným přístupem trvala déle v porovnání s mini-invazivní UALA ($p=0,005$) a byla provázena delší dobou rekonvalescence. Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl ve skóre pooperační kontinence mezi skupinou pacientek ošetřených otevřeným a méně invazivním endoskopickým chirurgickým zákorkem ($p=0,065$).

Cíl 2: Zhodnocení výsledků histopatologického vyšetření jater s ohledem na klinické výsledky chirurgické léčby a pooperační prognózu pacientů s portosystémovým zkratem

Do souboru bylo zařazeno celkem 44 psů s PSS. Větší stupeň poškození jaterního parenchymu nezávisí na stáří psa ani na typu PSS, zároveň nemá vliv na úhyn pacienta nebo klinický výsledek pacienta

po operaci PSS. Pouze u psů s PSS s neurologickými příznaky byly pozorovány mírnější změny v histologickém obraze jaterního parenchymu ($p=0,045$), u gastrointestinálních ani urologických

klinických příznaků tento vztah nebyl pozorován. U psů s PSS s mírným poškozením jaterního parenchymu byla pozorována vyšší koncentrace močoviny ($P=0,048$) v krevní plazmě před operací a vyšší plazmatické hodnoty aktivity PC ($P=0,003$) 8 týdnů po operaci porovnání s hodnotami u psů s PSS s těžkým poškozením jaterního parenchymu, což poukazuje na snazší obnovu funkcí jaterní tkáně po operaci PSS u psů s mírným poškozením jaterního parenchymu. Psi s PSS, u nichž byla zjištěna velkokapénková steatóza jaterního parenchymu, byli statisticky významně starší ve srovnání se psy s PSS, u nichž velkokapénková steatóza diagnostikována nebyla ($p=0,002$). Výskyt velkokapénkové steatózy v jaterním parenchymu u psů s PSS neměl vliv na úhyn psů po operaci PSS ($p=0,088$) ani na klinický výsledek léčby u těchto pacientů ($p=0,096$). Výsledky této studie ukázaly, že nepříznivý nález zjištěný při histologickém vyšetření jaterní tkáně, nebo průkaz velkokapénkové steatózy, nezhoršuje u psů s PSS prognózu jejich chirurgické léčby s použitím ameroidního konstriktoru.

Přínos projektu:

Projekt významně podpořil rozvoj nových terapeutických postupů využívajících pokročilou biotechnologii a minimálně invazivní chirurgické přístupy v souvislosti s léčbou vrozených onemocnění zvířat zájmových chovů. Úspěšné řešení projektu přispělo k zavedení nových miniinvazivních diagnostických a léčebných postupů do rutinní klinické praxe VETUNI, která tak upevnila své jedinečné postavení moderního výukového a klinického pracoviště poskytujícího veterinární odbornou péči na nejvyšší úrovni.

Využití výsledků:

Získané výsledky budou prezentovány odborné společnosti prostřednictvím recenzovaných publikací a budou také využity při výuce studentů. Hlavním přínosem projektu je transfer získaných výsledků do veterinární klinické praxe.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

Outcomes of 30 female dogs treated for ectopic ureters by open surgery or cystoscopic-guided laser ablation (Clin Tech Small Anim Pract/Front Vet Sci)

Evaluation of histopathological changes in the liver parenchyma in dogs with congenital portosystemic shunt (Vet Med)

Staňková L, Srnec R, Nečasová A, Urbanová L, Proks P, Nečas A. Relationship between the severity of neurological signs in dogs with thoracolumbar intervertebral disc disease and the magnitude of spinal cord compression by disc extrusion as assessed by computed tomography. ACTA VET BRNO 2024, 93: 169–181; <https://doi.org/10.2754/avb202493020169>.

Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	1 053 500,00	1 053 500,00
Služby	100 000,00	109 408,52

Cestovné	0,00	0,00
Další provozní náklady	600 000,00	590 591,48
Doplňkové náklady	263 025,00	263 025,00
Celkem	2 016 525,00	2 016 525,00

Zdůvodnění nákladů:

Osobní náklady:

Celková výše osobních nákladů byla 1 053 500,00 Kč. Z této sumy tvořily mzdové prostředky (os. příplatky, příp. odměny) pro členy řešitelského týmu 1 003 500,00 Kč včetně zákonných odvodů a dále stipendium, které tvořilo 50 000,00 Kč.

Služby:

Služby (max. 10 % celkových nákladů projektu) byly čerpány ve výši 109 408,52 na opravu a údržbu přístrojů, pronájem tlakových lahví, servis, statistická analýza, editace a úprava textů pro publikační výstup.

Cestovné:

Mobility nebyly plánovány.

Další provozní náklady:

Provozní náklady ve výši 590 591,48 Kč tvořily: náklady na šicí, spotřební chirurgický materiál; náklady na zdravotní spotřební materiál; operační oblečení a ochranné pomůcky; náklady na laboratorní materiál; drobný hmotný majetek; náklady na tonery a kancelářský spotřební materiál.

Doplňkové náklady:

Doplňkové náklady (režijní náklady - 15% z mezisoučtu přímých nákladů) v celkové výši 263 025,00 Kč.

Přesuny prostředků: V souladu se směrnicí bylo převedeno 9 408,52 Kč z ostatních provozních nákladů do služeb.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě doložte výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2024 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude odkazovat na podporu ITA VETUNI. Výhradní odkaz na projekt ITA VETUNI (bez odkazů na podporu z dalších grantů, projektů a jim obdobných finančních zdrojů) musí obsahovat vždy nejméně jedna publikace s impakt faktorem na každých 1,5 milionu korun způsobilých nákladů projektu, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu:

doc. MVDr. Michal Crha, Ph.D.

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2024 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu **odpovědného za čerpání prostředků:**

doc. MVDr. Michal Crha, Ph.D.

Přednosta ústavu nebo kliniky, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu nebo klinice, respektive celoškolském pracovišti, které řídí.

Datum, jméno a podpis

přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

prof. MVDr. Alois Nečas, Ph.D., MBA

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:

Ing. Vladimír Kohoutek

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

doc. MVDr. Michal Crha, Ph.D.

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2024

Identifikační číslo projektu: 2024ITA13

Název projektu: Diverzita a management parazitárních infekcí v oborových chovech zvěře

Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: MVDr. Barbora Červená, Ph.D.

Fakulta/celoškolské pracoviště: Ústav patologické morfologie a parazitologie, Fakulta veterinárního lékařství

E-mail: cervenaba@vfu.cz

Telefon: +420 541 56 2473; +420 724 507 426

Řešitelský kolektiv:

složení řešitelského týmu: (akademičtí pracovníci a jejich příslušnost k ústavům nebo klinikám fakulty nebo výzkumným skupinám CEITEC, studenti DSP) a forma zapojení každého člena řešitelského týmu

Akademičtí pracovníci:

MVDr. Barbora Červená, Ph.D.

Ústav patologické morfologie a parazitologie, FVL

Role: management projektu a jeho financování, diagnostika parazitárních infekcí, morfologická a genetická charakteristika zachycených parazitů, analýza dat, psaní publikací

MVDr. Jana Juránková, Ph.D.

Ústav patologické morfologie a parazitologie, FVL

Role: management odběru vzorků, diagnostika parazitárních infekcí, kvantifikace parazitárních stadií, morfologická a genetická charakteristika zachycených parazitů, analýza dat, psaní publikací

Mgr. Helena Stříbrná, Ph.D.

Ústav patologické morfologie a parazitologie, FVL

Role: komunikace a logistika při získávání vzorků, diagnostika parazitárních stadií pomocí koproskopických technik se zaměřením na kvantifikaci, analýza dat, příprava publikací

Studenti DSP:

MVDr. Jana Kačmaříková

Ústav patologické morfologie a parazitologie, FVL

Role: diagnostika a kvantifikace parazitárních infekcí, genetická charakteristika zachycených parazitů, analýza dat, evidence výsledků, příprava publikací

V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu:

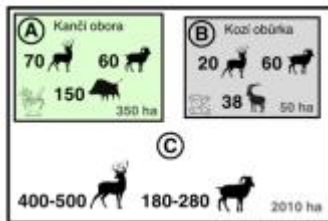
Obsah projektu

Projekt byl financován s více než 50% redukcí rozpočtu, což vedlo ke změnám obsahu projektu.

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Cíle projektu:

Projekt měl za cíl popsat spektrum parazitů zažívacího a respiračního traktu vyskytujících se v oboře obývané několika druhy zvěře včetně kvantifikace stádií. Následným cílem bylo provést pilotní studii účinnosti přírodní bylinné krmné směsi proti vybraným endoparazitům zvěře. Posledním cílem bylo provést genetickou charakterizaci vybraných zachycených endoparazitů zvěře.



Popis a metodika řešení projektu:

Studijní lokalitou byla oboře (2410 ha) v polesí Moravský Krumlov, která je dále členěna do tří oddělených výběhů o odlišné velikosti a s jinými druhy zvěře (viz obrázek). Vzorky čerstvého trusu zvěře byly pracovníky obory sbírány neinvazivně, většinou v okolí krmišť, zchlazeny a transportovány na Ústav patologické morfologie a parazitologie, kde byly následně zpracovány koproskopickými metodami zahrnujícími flotaci, sedimentaci, larvoskopii a kvantifikaci dle McMastera. Vzorky pro studii bylinné krmné směsi byly sbírány od jelenů dle předem domluveného schématu tak, aby byl zaznamenán stav před aplikací bylinné směsi, která byla podávána po 4 týdny, přičemž v posledním týdnu byl proveden odběr vzorků (T0) a následně byly odběry provedeny v týdnech 1, 2, 3, 5, 9, 14 a 18 po terapii krmnou bylinnou směsí. Vzorky byly odebírány ve všech třech částech obory, přičemž v Kančí oboře (A, 30-36 vzorků) byla podávána bylinná krmná směs, v Kozí obůrce (B, 10 vzorků) byla podávána stejná krmná směs, ale bez přídavku bylin a zvířata ve Velké oboře (C, 30–36 vzorků) byla kontrolní skupinou, kde nebyl podáván žádný příkrm. Vyhodnocována byla prevalence jednotlivých parazitů a intenzita infekce – průměrné, maximální a medián hodnot.

Vybrané pozitivní vzorky trusu byly nakonec použity pro extrakci DNA a amplifikaci nukleových kyselin s následnou sekvenací.

Dosažené výsledky projektu:

Během projektu (od května do října) bylo během 9 vzorkování sesbíráno celkem 709 vzorků trusu, které byly vyšetřeny minimálně dvěma koproskopickými metodami, tudíž vyšetřeno bylo přes 1400 vzorků. U jelenů byly nejčastějšími parazity plicnivky, strongylidní hlístice zažívacího traktu a kokcidie, ojediněle se vyskytovaly hlístice rodů *Capillaria*, *Trichuris* a *Strongyloides*, u koz bezoarových byla situace obdobná, nicméně GIT strongylida, kokcidie a plicnivky byly přítomny u všech vyšetřených zvířat. U prasat byly v době vyšetření zachyceny spiruridní hlístice, plicnivky *Metastrongylus* a hlístice rodu *Capillaria*. Vliv bylinného preparátu byl posuzován na GIT strongylidní hlístice, plicnivky a kokcidie, přičemž pro prevalenci těchto parazitů nebyl odhalen jasný vliv bylinného preparátu, neboť prevalence kolísala v průběhu vzorkování, což mohlo být ovlivněno tím, že nebylo možné odebírat identifikované vzorky. Intenzita infekce GIT strongylidy byla nižší ve skupinách s bylinami i s pouhým příkrmem, ačkoliv i výchozí intenzita byla v kontrolní skupině vyšší. U plicnivek došlo v týdně T0 ve skupině s bylinami k poklesu intenzity infekce, která však následně v T1 vzrostla a zase klesla. Ve skupině s příkrmem byl po skončení příkrmu pozorován průběžný nárůst intenzity infekce, ale celkově v této skupině byla intenzita nejnižší. Kolísání bylo pozorováno i v kontrolní skupině. U kokcidií nebyly pozorovány velké rozdíly mezi sledovanými skupinami. Zdá se tedy, že byliny i samotný příkrm mají pozitivní vliv na strongylidy GIT. Nicméně je nutné podotknout, že období studie bylo velmi suché, s minimem srážek, což obecně není příznivé pro vývoj parazitů i jejich mezipřenositelů, kterými jsou v případě plicnivek plži. Jelikož se jednalo o pilotní studii, nebyly environmentální faktory vyhodnocovány. Bylo by taktéž vhodné studii provést v období zimy, kdy by bylo vyšší riziko oslabení zvířat následkem nedostatku potravy a vliv příkrmu včetně přídavku bylin by mohl být výraznější. DNA byla amplifikována u subsetu vzorků plicnivek.

Přínos projektu:

Byla zjištěna druhová diverzita a intenzita infekce endoparazity u různých druhů zvěře chované v jedné oboře, což umožňuje optimalizaci managementu těchto populací pro udržování optimální kondice zvířat. Použití bylinného preparátu se jeví jako slibné řešení pro management infekcí hlísticemi a je vhodnou alternativou syntetických antiparazitik. Sekvenční data přispějí k rozvoji veřejně dostupných databází.

Využití výsledků:

Výsledky projektu budou využity zejména při managementu obory k udržení vysoké kvality chované zvěře a mohou být inspirací i pro další podobná zařízení. Další obdobná zařízení se pak mohou inspirovat a aplikovat podobné metody managementu parazitárních infekcí.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

Připravujeme publikaci Management of parasitic infections in a game forest reserve using herbal medicine. *Journal of Wildlife Management* (IF 2023 1,9; Q1 Ecology; Ecology, Evolution, Behavior and Systematics; Nature and Landscape Conservation)

Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	431 400,00	431 400,00
Služby	100 000,00	100 000,00
Cestovné	5 000,00	0,00
Další provozní náklady	163 002,00	168 002,00
Doplňkové náklady	104 910,00	104 910,00
Celkem	804 312,00	804 312,00

Zdůvodnění nákladů:

Osobní náklady: Osobní náklady byly použity na stipendium 30 tis Kč pro dr. Janu Kačmaříkovou, zbytek byl rozdělen mezi doktorky Červenou, Juránkovou a Stříbrnou.

Služby: Náklady na služby zahrnovaly kompenzaci nákladů spojenou se sběrem a logistikou vzorků z obory do laboratoře a sekvenování.

Cestovné: Bylo požadováno, ale nakonec nebylo čerpáno. Prostředky byly v souladu se směrnicí převedeny do dalších provozních nákladů.

Další provozní náklady: Zakoupeno bylo krmivo včetně bylinného preparátu (5 tun), sáčky na sběr vzorků, magnetická míchačka, spotřební materiál do koproskopické i molekulární laboratoře (např. dřevěné špachtle, gáza, rukavice, zkumavky, kádinky, reagentie).

Doplňkové náklady: Režijní náklady byly čerpány v souladu se schváleným rozpočtem projektu.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě doložte výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2024 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude odkazovat na podporu ITA VETUNI. Výhradní odkaz na projekt ITA VETUNI (bez odkazů na podporu z dalších grantů, projektů a jim obdobných finančních zdrojů) musí obsahovat vždy nejméně jedna publikace s impakt faktorem na každých 1,5 milionu korun způsobilých nákladů projektu, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu: 8. 1. 2024, MVDr. Barbora Červená, Ph.D.

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2024 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu **odpovědného za čerpání prostředků:**

8. 1. 2024, MVDr. Barbora Červená, Ph.D.

Přednosta ústavu nebo kliniky, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu nebo klinice, respektive celoškolském pracovišti, které řídí.

Datum, jméno a podpis

přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Razítko

Závěrečná zpráva projektu ITA VETUNI na rok 2024

Identifikační číslo projektu 2024 ITA 14

Název projektu: Problematika chorob přežvýkavců a koní

- A) Sledování výskytu steatózy jater u dojnic a jejich prevence.
- B) Vyhodnocení dvou systémů faremní kultivace původců mastitid dojnic vyráběných a používaných v ČR.
- C) Hodnocení střevní slizniční imunity a produkce sekrečních IgA u koní s kolikou

Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: doc. MVDr. Josef Illek, DrSc. Dipl. ECBHM

Sekce chorob velkých zvířat, KLVZ

E-mail: illekj@vfu.cz

Telefon: +420 541 562 43; + 420 731 512 909

Řešitelský kolektiv

Složení řešitelského týmu: Akademičtí pracovníci a jejich příslušnost k ústavům nebo klinikám a forma zapojení každého člen řešitelského týmu

doc. MVDr. Josef Illek, DrSc. Dipl. ECBH. KLVZ, Plánování a koordinace experimentů, kontrola zdravotního stavu zvířat, kontrola a analýza dat, příprava publikačních výstupů

MVDr. Romana Kadek, Ph.D. KLVZ. Koordinace experimentů v chovech, výběr zvířat, klinické vyšetření, odběr vzorků krve

Mgr. Andrea Staffa, Ph.D. KLVZ. Kontrola výsledků laboratorního vyšetření, analýza dat, příprava publikačních výstupů,

MVDr. Zdenka Bezděková, Ph.D. KCHPP. Kontrola zdravotního stavu zvířat, odběr biologického materiálu

doc. MVDr. Michal Škorič, Ph.D. Ústav patologické morfologie. Hodnocení výsledků histologického vyšetření jaterní tkáně.

prof. MVDr. Jiří Smola, CSc. KCHPP. Hodnocení výsledků vyšetření

MVDr. Josef Prášek, Ph.D. KCHPP. Odběr vzorků mléka, stájová kultivace

MVDr. Zuzana Drábková, Ph.D., DECEIM, KCHK Vytvoření metodiky projektu, organizace sběru vzorků a jejich doprava do laboratoře, koordinace laboratorních analýz a tvorba závěrečné publikace.

MVDr. Olga Dobešová, Ph.D. KCHK Příjem a klinické vyšetření pacientů, sběr vzorků při příjmu a rozřazení pacientů do jednotlivých skupin dle metodiky projektu.

MVDr. Petr Jahn, CSc., KCHK. Příjem a klinické vyšetření pacientů, sběr vzorků při příjmu a rozřazení pacientů do jednotlivých skupin dle metodiky projektu.

MVDr. Štěpán Bodeček, Ph.D. KCHK. Příjem a klinické vyšetření pacientů, sběr vzorků při příjmu a rozřazení pacientů do jednotlivých skupin dle metodiky projektu.

V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu: Nejedná se o společný projekt více součástí VETUNI. Projekt je řešen v rámci sekce velkých zvířat

Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Projekt plně zapadá do rámce výzkumu VETUNI.

Cíle projektu:

Cíl A)

- 1) Cílem projektu je zjistit prevalenci steatózy jater u dojnic v průběhu tranzitního období na základě sledování metabolického profilu.
- 2) Vyhodnotit vliv zkrmování Ostropestřce mariánského na prevenci steatózy jater.

Cíl B)

Zhodnotit dva komerční systémy určené pro kultivační průkaz původců mastitid při vyšetření čtvrtí vzorků odebraných z případů klinických a subklinických mastitid a vzorků odebraných ze čtvrtí dojnic hodnocených jako rizikových při zaprahování. Hodnocena bude řada parametrů včetně specifity a senzitivity systémů při kultivačním průkazu G+ původců kontagiózních a environmentálních mastitid a G-původců mastitid, zejména E. coli. Výsledky hodnocení budou prezentovány formou článku v časopise s IF a dále v odborném časopise Veterinářství. Cílem není porovnávat tyto systémy s metodami používanými v profesionálních veterinárních laboratořích s akreditací pro takovou činnost.

Cíl C)

- 1) Zjistit změny v koncentraci SIgA ve stolici a IgA v séru u koní s kolikovými příznaky různé intenzity, léčených konzervativními nebo chirurgickými metodami a porovnat koncentraci SIgA s klinickými pacienty netrpícími kolikovým onemocněním a se zdravými koňmi
- 2) Zjistit dynamiku změn SIgA v průběhu procesu hojení/rekonvalescence u koní s kolikou
- 3) Dát získané výsledky do souvislosti s rutinně používanými klinickými a klinicko-patologickými markery hodnotícími závažnost systémového postižení u koní s kolikou.

Popis a metodika řešení projektu A

- 1) V chovu dojnic plemene H s užitkovostí 11 236 kg mléka za normovanou laktaci byl sledován zdravotní stav, úroveň výživy, hmotnost krav a metabolický profil se zaměřením na koncentraci

BHB, NEFA, AST, GMT a haptoglobinu v krevním séru, v průběhu první fáze laktace. Celkem bylo v průběhu sledování vyšetřeno 152 dojnic. Krev byla odebírána z ocasní žíly, v 7. a 28. den laktace. Biochemické analýzy byly prováděny na automatickém biochemickém analyzátoru v KLVZ. Hmotnost krav byla stanovena v 7. a 28. dnu laktace v průběhu robotického dojení. Získané výsledky byly statisticky zpracovány a vyhodnoceny.

- 2) V chovu dojnic plemene H s užitkovostí 14 863 kg mléka o tučnosti 3,72 % a koncentraci bílkovin 3,40 % byl sledován vliv zkrmování Ostropestřce mariánského na prevenci steatózy jater. Kravám pokusné skupiny (N 8) byl v období přípravy na porod do krmné dávky zařazen Ostropestřec mariánský v dávce 150 g. na kus a den. Metabolický profil zaměřený na diagnostiku steatózy jater byl proveden 2 až 4 dny před porodem, dále v 10 až 20. dnu laktace a v 60. až 80. dnu laktace. Ve stejných intervalech byl sledován metabolický profil u krav kontrolní skupiny (N 8).

Dosažené výsledky projektu A

V průběhu sledovaného období mezi 7. a 28. dnem laktace došlo ke snížení hmotnosti dojnic o 10,48 kg. V sedmém dnu laktace byla na základě metabolického vyšetření diagnostikována steatóza jater stupně u 17,11 % dojnic. Ve 28. dnu laktace byla steatóza jater diagnostikována u 42 % dojnic. U dojnic s koncentrací BHB v krevním séru do 0,8 mmol/l nebyly zjištěny významné změny v metabolickém profilu, u dojnic s koncentrací BHB v rozmezí 0,81 až 2 mmol/l byla zjištěna zvýšená koncentrace NEMK a haptoglobinu a zvýšená aktivita AST. U 2 % krav, které jevíly klinické příznaky onemocnění, činila koncentrace BHB v krevním séru 3,56 ± 1,62 mmol/l, aktivita AST 1,78 ± 0,12 Ukat/l aktivita GMT 0,59 ± 0,11 Ukat/l a koncentrace haptoglobinu 0,95 ± 1,07 mmol/l.

Zkrmování 150 g. Ostropestřce mariánského v období přípravy na porod mělo pozitivní vliv na prevenci steatózy jater a metabolický profil u krav před porodem (2-4 dny), a v období rozdoje (10-20 dnů laktace) U krav pokusné skupiny byl průběh puerperia fyziologický, u krav kontrolní skupiny byla diagnostikována metritida u 2 kusů a zadržaná placenta u 1 kusu.

Přínos projektu A

Výsledky řešeného projektu prokázaly značný výskyt steatózy jater u dojnic v první fázi laktace a změny v metabolickém profilu, které lze využít pro preklinickou diagnostiku tohoto onemocnění. Za významné parametry pro diagnostiku jaterní steatózy lze považovat koncentrace BHB, NEMK, a aktivita AST a GMT v krevním séru. Steatóza jater má negativní vliv na produkci a reprodukci. Není-li včas diagnostikována, způsobuje další zdravotní problémy a předčasné vyřazení krav z chovu. Dále byl prokázán pozitivní efekt zkrmování semene Ostropestřce mariánského v dávce 150 g na kus a den v předporodním období na prevenci steatózy jater. V předporodním období i v průběhu první fáze laktace byla koncentrace BHB a aktivita AST významně nižší než u krav kontrolní skupiny.

Využití výsledků:

Výsledky budou využity ve vědecké publikaci v časopise s IF a v odborných časopisech Veterinářství a Náš chov. Dále budou prezentovány na vědeckých konferencích v zahraničí (WBC) a odborných konferencích a seminářích pro chovatele.

Název článku a název vědeckého nebo odborného časopisu, v němž se předpokládá publikace dosažených výsledků:

- 1) Incidence of hepatic steatosis in high-producing dairy cows. Acta Veterinaria Brno
- 2) Problematika diagnostiky negativní energetické bilance a steatózy jater u dojnic *Veterinářství*

3) Prevence steatózy jater a subklinické ketózy dojnic. *Náš chov*

Popis a metodika řešení projektu B

Ve studii bylo vyšetřeno celkem 197 vzorků sekretu odebraných ze čtvrtí mléčné žlázy postižených klinickou a subklinickou mastitidou a dále ze čtvrtí dojnic vyhodnocených v kategorii vysokého rizika podle použitého algoritmu v době před zaprahnutím. Všechny vzorky odebrané proškoleným personálem farem byly očkované současně na agarová média (jsou tři na jedné misce) každého ze dvou komerčních setů (MicroMast™ a ClearMilk Test) proškolenou osobou. Po inokulaci byly misky s agary inkubovány aerobně po dobu 18–24 hodin při teplotě 36° - 37 ve stejném inkubátoru. Odečítání výsledků kultivace byla provedena jinou trénovaná osoba (terénní veterinární lékař) podle návodu výrobce příslušného setu. Pokud nedošlo k růstu kolonií na žádném z použitých médiích, bylo vyšetření interpretováno jako „bez kultivačního nálezu“. Pokud byl ze vzorku izolován větší počet původců, než dva vzorek byl označen za „kontaminovaný“. Nález dvou původců byly zaznamenán jako „smíšený“. Zaznamenána byla vždy izolace skupin bakterií (Gram pozitivní nebo negativní), druhů bakterií *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *E. coli* a dalších), případně skupin bakterií (jako jsou non aureus stafylokoky - NAS, tj. koaguláza negativní stafylokoky nebo environmentální streptokoky, tj. *S. uberis*, *S. dysgalactiae* a enterokoky). U obou systémů faremní kultivace bylo také provedeno semi kvantitativní stanovení původce, podle počtu kolonie tvořících jednotek (CFU) v přepočtu na 1 ml sekretu mléčné žlázy.

Ve studii byl hodnocen systém MicroMast™, který používá na misce rozdělené do tří segmentů (triplate) kromě dvou selektivních i jedno neselektivní médium, tj. krevní agar. Krevní agar je standardním médiem používaným v medicíně pro izolaci bakterií, protože kromě dobrých růstových podmínek bez selekce umožňuje průkaz hemolytické aktivity G+ původců infekčních mastitid. Kromě jiného umožňuje dále průkaz kontaminace vzorku, tedy kontrolu kvality odběru. Druhým hodnoceným systémem byl ClearMilk Test výrobce LabMediaServis s.r.o., který používá rovněž triplate, kde jsou 3 různá selektivní média založená na principu chrom agaru za účelem snadnějšího odčítání výsledků kultivace.

V hodnocení byly stanoveny základní parametry jako je senzitivita (Se), specifita (Sp), pozitivní (PPH) a negativní prediktivní hodnota (NPH) a celková přesnost. Tyto parametry byly vztaženy k nálezu na krevním agaru. K statistickému vyhodnocení v publikaci bude použit nepárový dvoj výběrový t-test pro porovnání průměrů. Statistická významnost p bude vyhodnocována na základě výsledku t-testu.

Dosažené výsledky projektu B

Ze 197 vyšetřených vzorků mléka systémem MicroMast™ bylo 133 nálezů Gram+, 32 nálezů Gram-, 41 bez kultivačního nálezu a v 6 vzorcích byly izolovány kvasinky, přičemž 31 vzorků bylo smíšených a 16 kontaminovaných. *S. agalactiae* nebyl zachycen žádný. *S. aureus* byl zachycen pouze jednou. NAS byl zaznamenán v 76 případech, environmentální streptokoky v 39 a *E. coli* v 6 případech. Dále byli identifikováni shodně po 8 případech *Bacillus* spp. a *Corynebacterium* spp.

V případě ClearMilk (CM) testu bylo zaznamenáno na úrovni skupiny G+ 103 nálezů, přičemž 16 z nich bylo falešně pozitivních a dalších 33 falešně negativních. Senzitivita CM testu na této úrovni byla 0,73 a pozitivní prediktivní hodnota 0,84. Gram – nálezů bylo 23, z toho 6 falešně pozitivních a dalších 6 falešně negativních. Se u G- bakterií byla 0,74 a PPH 0,74. Bez kultivačního nálezu bylo 41 nálezů, z toho 6 falešně. Naopak falešně negativních bylo dalších 18 nálezů. Specificita CM testu měla hodnotu 0,85 a negativní prediktivní hodnota 0,66. *S. agalactiae* byl na CM testu vyhodnocen falešně pozitivně 2krát a *S. aureus* též falešně pozitivně v 9 případech a v 1 případě falešně negativně. Vzhledem k 100% chybovosti je tak identifikace hlavních kontagiózních původců významným limitem v přesnosti CM testu. V případě skupiny environmentálních streptokoků bylo zachyceno 31 nálezů, z toho 2 falešně pozitivní a 5 falešně negativních. Hodnota Se byla 0,85 a PPH 0,94. Výhodou CM je možnost identifikace jednotlivých druhů streptokoků např. *S. uberis*, *S. dysgalactiae* aj. Přesnost jejich rozlišení je však problematická s rizikem záměny s vysoce kontagiózním *S. agalactiae*.

Při odečítání bylo zaznamenáno i semikvantitativní hodnocení počtu CFU/1ml sekretu mléčné žlázy. Jak je částečně zřejmé z uvedených výsledků „bez kultivačního nálezu“ je schopnost zachytit na CM testu malou intenzitu infekce nízká a odpovídá v průměru 10^3 CFU/1ml. Tzn. o jeden řád vyšší, než vyplývá z definice intramamární infekce tj. 10^2 CFU/1ml. Při použití testu u subklinických infekcí a před zaprahnutím tak může dojít k situaci, že infekce není zachycena, což je riziko především u infekcí způsobených kontagiózními původci.

Přínos projektu B

Přesnost diagnostiky kultivačních systémů na farmě je klíčová pro jejich efektivní a ekonomicky výhodné použití. Zajištění kvality používání těchto systémů pravidelným monitorováním ze strany veterinárního lékaře nezbytné pro jejich trvalou udržitelnost v postupech strategických léčebných rozhodnutí v případech klinických mastitid a selektivního zaprahování. Veterinární lékaři musí mít dostatek informací, aby mohli argumentovat ve prospěch takové faremní diagnostiky, včetně podmínek jejich proveditelnosti.

Stanovení základních parametrů specifity a senzitivity každého ze dvou hodnocených systémů vyráběných v ČR, včetně porovnání nároků na provedení a interpretaci výsledků v podmínkách praxe bude přínosem pro použití těchto systémů podle faremně specifických původců a také pro další zjednodušení procesů rozhodování o léčebném používání antimikrobik s cílem trvalého snížení jejich spotřeby.

Využití výsledků:

Výsledky budou využity ve vědecké publikaci v časopise s IF, v odborném časopise a při zaškolování chovatelů dojnic.

Název článku a název vědeckého nebo odborného časopisu, v němž se předpokládá publikace dosažených výsledků:

1. Evaluation of two on-farm culture-based diagnostic systems for detection of mastitis pathogens. Acta Veterinaria Brno.
2. Hodnocení použitelnosti dvou systémů kultivace ve faremních podmínkách. Veterinářství

Popis a metodika řešení projektu C:

Materiál: Do studie byli zařazeni koně odesaní na Kliniku chorob koní VETUNI z důvodu příznaků koliky v období od srpna do prosince 2023 (celkem 52 koní). Každý kůň při příjmu podstoupil standardní diagnostiku, včetně klinického vyšetření, krevních testů, rektálního vyšetření, transabdominálního ultrazvuku, abdominocentézy a nasogastrické sondáže. Na základě výsledků vyšetření podstoupili koně buď k chirurgický zákrok (16 koní ve skupině „koliky chirurgické“), nebo konzervativní léčbu (36 koní ve skupině „koliky konzervativní“). Při přijetí byly odebrány vzorky trusu (rektální vzorek - D0) a následně byly odebírány ve 24hodinových intervalech po dobu šesti po sobě následujících dnů (D1, D2, D3, D4, D5, D6). Odběr byl ukončen dříve, pokud byl kůň propuštěn nebo utracen. Vzorky D1-D6 pocházely přímo z konečnicku nebo z podestýlky. Kontrolní skupinu „kontroly klinika“ tvořilo osm koní odeslaných na kliniku kvůli jiným než gastrointestinálním problémům (např. ovariektomie, kastrace, ošetření ran nebo ortopedické zákroky). V této skupině byla provedeno klinické a hematologické vyšetření. Kontrolní skupinu „kontroly stáj“ tvořilo deset zdravých koní, kteří byli v posledních třech měsících chováni ve stejných podmínkách v externí stáji a nebyli transportováni. U koní ze skupiny „kontroly stáj“ bylo provedeno pouze klinické vyšetření. U obou kontrolních skupin byly vzorky trusu získány vždy po spontánní defekaci během dnů D0-D6. Všechny vzorky byly skladovány při -20 °C. A po ukončení sběru vzorků odeslány ve zmraženém stavu do laboratoře na analýzu.

Laboratorní analýza: Analýza SIgA v trusu a sérového IgA byla provedena v sérologické laboratoři Ústavu imunologie, patofyziologie a veterinární preventivní medicíny na Univerzitě ve Vratislavi (WUELS) na základě nově publikované metodiky (Žak-Bochenek, A., Bajzert, J., Sambor, D., Siwińska, N., Szponar, B., Łaczmański, Ł., ... & Chełmońska-Soyta, A. (2022). Homeostasis of the Intestinal Mucosa in Healthy Horses—Correlation between the Fecal Microbiome, Secretory Immunoglobulin A and Fecal Egg Count. *Animals*, 12(22), 3094).

Statistická analýza: Výsledné hodnoty jednotlivých skupin (koliky konzervativní/chirurgické, kontrolní koně klinika/stáj) a změny výše IgA v průběhu hospitalizace byly statisticky vyhodnoceny (Mannův-Whitneyho U test, Kruskal-Wallisův test). Dále byla provedena korelace výše IgA (Spearmanova a Pearsonova korelace dle typu dat) se závažností systémového onemocnění zhodnoceného na základě klinických a klinicko-patologických parametrů.

Dosažené výsledky projektu C:

Cíl 1) Kruskalův-Wallisův test prokázal významné rozdíly v koncentracích SIgA v den D0 mezi skupinami ($H=16,74$, $p=0,0008$). Nejvyšší hladiny SIgA v den D0 byly přítomny u „koliky chirurgické“, následovaly „koliky konzervativní“, „kontroly klinika“ a nejnižší hodnoty byly naměřeny u „kontroly stáj“. Následné post hoc Mannovy-Whitneyho U testy zjistily významné rozdíly mezi „koliky chirurgické“ a „kontroly stáj“ ($p=0,0009$), „koliky chirurgické“ a „kontroly klinika“ ($p=0,0165$), „koliky konzervativní“ a „kontroly stáj“ ($p=0,0008$) a „kontroly stáj“ a „kontroly klinika“ ($p=0,0164$). Srovnání mezi „koliky konzervativní“ a „kontroly klinika“ bylo na hranici statistické významnosti ($U = 254,0$, $p=0,0503$).

Cíl 2) Ke zkoumání změn hladin SIgA ve stolici v průběhu času ve čtyřech různých skupinách koní byl použit lineární model se smíšenými efekty. Závislá proměnná, log₁₀-transformované koncentrace IgA, byla hodnocena longitudinálně (den 0 - den 6). Model zahrnoval vliv léčebných skupin a času jako kovariant, navíc s jejich interakcemi. Skupina „kontroly stáj“ byla označena jako referenční kategorie. Tento model hodnotil intercept (hodnoty v den 0) a sklon (rychlost změny v čase) pro každou skupinu

ve vztahu ke skupině „kontroly stáj“. Souhrnně model ukazuje, že zatímco skupina „kontroly stáj“ si udržovala konzistentní výchozí a stabilní hladiny SIgA v průběhu času, skupiny „kontroly klinika“, „koliky konzervativní“ a „koliky chirurgické“ vykazovaly významně zvýšené výchozí hladiny IgA. Jak u skupiny „koliky konzervativní“, tak u skupiny „koliky chirurgické“ došlo v průběhu času k významnému poklesu hladin $\log_{10}(\text{SIgA})$ ve srovnání se skupinou „kontroly stáj“, přičemž u skupiny „koliky chirurgické“ byl pokles nejvýraznější.

Cíl 3) Spearmanova a Pearsonova korelační analýza byla provedena za účelem vyhodnocení vztahu mezi „SIgA v den 0“ a několika parametry („počet leukocytů“, „celkový protein“, „celková koncentrace laktátu ve stolici“) v rámci dvou skupin: „koliky“ (koliky konzervativní + chirurgické) a „kontroly“ (kontroly klinika + stáj). V rámci skupiny „koliky“ byla použita Spearmanova korelace ke stanovení vztahu mezi SIgA v den 0 a D a sumou L-laktátu ve stolici, výsledkem byl Spearmanův korelační koeficient 0,421 s $p=0,00211$. Žádné další korelace nebyly pozorovány.

Přínos projektu:

Výsledky projektu poskytly významný a jedinečný vhled do dynamiky produkce SIgA v zažívacím traktu zdravých koní a koní s kolikovým onemocněním. Zvýšené hladiny SIgA u koní s kolikovým onemocněním, které je nutno řešit chirurgicky, naznačují možnost použití SIgA jako biomarkeru k odhadu další terapie a stanovení prognózy. Celkově data získaná v našem projektu rozšíří povědomí o imunologii zažívacího traktu u koní, která je zatím velmi neprobádaná.

Využití výsledků:

Výsledky budou využity ve vědecké publikaci v časopise s IF. Dále budou získaná data a výsledky součástí diplomové práce studentky magisterského programu Vaiva Sergedaite.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků: Fecal SIgA as a biomarker of mucosal immune dysfunction in equine colic; Journal of Veterinary Internal Medicine

Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	722 520,00	722 520,00
Služby	180 000,00	210 000,00
Cestovné	20 000,00	20 000,00
Další provozní náklady	370 296,00	334 296,00
Doplňkové náklady	193 962,00	193 962,00
Celkem	1 486 738,00	1 486 738,00

Zdůvodnění nákladů

Finanční prostředky byla čerpány dle plánu, pouze v položce služby bylo čerpání překročeno z důvodu opravy analyzátoru.

Osobní náklady sloužily jako odměny členům řešitelského kolektivu.

Služby – finanční prostředky byly použity k úhradě nákladů na imunologické vyšetření a opravy přístrojů.

Cestovné – sloužilo k úhradě nákladů spojených s návštěvou farem dojnic.

Provozní náklady – finanční prostředky byly použity pro nákup biochemických setů, chemikálií, kontrolních vzorků a laboratorního skla a spotřebního materiálu.

Doplňkové náklady jsou stanoveny předpisem

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

Etická komise nevyžaduje pro tento projekt schválení projektu pokusu.

Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště.

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2024 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV) a že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění do 18 měsíců od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude odkazovat na podporu ITA VETUNI. Výhradní odkaz na projekt ITA VETUNI (bez odkazů na podporu z dalších grantů, projektů a jim obdobných finančních zdrojů) musí obsahovat vždy nejméně jedna publikace s impakt faktorem na každých 1,5 milionu korun způsobilých nákladů projektu a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI

Datum, jméno a podpis 9.1. 2025 doc. MVDr. Josef Illek DrSc, Dipl. ECBHM

Řešitel projektu:

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2024 jsou pravdivé a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, dle Dalšíh pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu

Datum, jméno a podpis 9.1.2025 doc. MVDr. Josef Illek, DrSc. Dipl. ECBHM

Člena řešitelského týmu odpovědného za čerpání prostředků

doc. MVDr. Josef Illek DrSc, Dipl. ECBHM

– Podpis řešitele projektu

Titul, jméno a příjmení: doc. MVDr. Josef Illek, DrSc., Dipl. ECBHM

Vyjádření přednosty(ů) ústavu(ů) nebo klinik(y)

Titul, jméno a příjmení: prof. MVDr. Jiří Smola, CSc.

doc. MVDr. Markéta Sedlinská, Ph.D.

Vyjádření děkana fakulty nebo ředitele CEITEC

Titul, jméno a příjmení: doc. MVDr. Michal Crha, Ph.D.

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2024

Identifikační číslo projektu: 2024ITA15

Název projektu: Vliv azitromycinu na morfologii srdce, srdeční funkci a mikrobiom u králíka a potkana

Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: doc. MVDr. Vladimír Jekl, Ph.D., DipECZM (Small Mammal), evropsky uznávaný specialista v oboru nemoci a chirurgie drobných savců

Fakulta/celoškolské pracoviště: Ústav farmakologie a farmacie

Fakulta veterinárního lékařství

E-mail: jeklv@vfu.cz; VladimirJekl@gmail.com

Telefon: +420732615647

Řešitelský kolektiv:

Ústav farmakologie a farmacie

Doc. MVDr. Vladimír Jekl, Ph.D., DipECZM (Small Mammal)

- vedoucí experimentu, odpovídá za kooperaci jednotlivých týmů, odběry vzorků krve, zajištění echokardiografického EKG vyšetření externími odborníky

MVDr. Jan Chloupek, Ph.D., zástupce vedoucího experimentu, personální zvládnutí ustájení experimentálních zvířat, podílí se na obou dílčích částech experimentu

MVDr. Zuzana Tomiczková, DSP student - participace na odběrech a analýzách vzorků

Ústav fyziologie

MVDr. Martin Hostovský, Ph.D. participace na vyhodnocování výsledků projektu a kooperace při vyšetřování mikrobiomu a markerů srdečního poškození

Prof. MVDr. Jaroslav Doubek, CSc. - konzultant

MVDr. Jana Doležalová, Ph.D., zpracování vzorků pro hormonální, molekulární a imunoanalýzy, vyšetření a vyhodnocování výsledků mikrobiomu a markerů srdečního poškození

MVDr. Kristína Řeháková, Ph.D., zajištění hematologického a biochemického vyšetření krve

MVDr. Pavla Hamouzová, Ph.D., interpretace výsledků

Ústav anatomie, histologie a embryologie a Ústav patologické morfologie a parazitologie

Prof. MVDr. František Tichý, CSc. - postmortální vyšetření a makroskopická analýza orgánů

Doc. MVDr. Václav Páral, Ph.D.– postmortální vyšetření a makroskopická analýza orgánů

MVDr. Petr Čížek, Ph.D.– analýza histologických výsledků

MVDr. Martin Pyszko, Ph.D. – postmortální vyšetření a makroskopická analýza orgánů

doc. MVDr. Miša Škorič, Ph.D. - histopatologické vyšetření

V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu:

Společným jmenovatelem dílčích cílů je problematika vlivu azitromycinu na srdeční funkci a morfologii u králíků a potkanů. Dále byl hodnocen vliv azitromycinu na trávicí trakt, a to jak z hlediska histologické stavby, tak z hlediska mikrobiomu. Projekt byl koncipován tak, aby se jednotlivá témata mohla řešit paralelně s aktivním zapojením všech pracovníků participujících na projektu. Kooperace týmů byla realizována zejména na úrovni odběru vzorků, sdílení metod, výsledků a přístrojového vybavení

a diskuze nad jednotlivými částmi projektu.

Pracovníci z Ústavu farmakologie a farmacie byli zodpovědní za vedení projektu a kooperaci jednotlivých týmů, odběr\ vzorků, vyšetření dutiny hrudní a srdce, a za vyhodnocení výsledků. Pracovníci z Ústavu fyziologie byly zodpovědní za vyšetření mikrobiomu u králíků a z a stanovení markerů srdečního poškození a jejich vyhodnocení. Pracovníci z Ústavu anatomie, histologie a embryologie a Ústavu patologické morfologie a parazitologie provedli postmortální vyšetření potkanů a králíků a dále prováděli histopatologické vyšetření odebraných vzorků gastrointestinálního traktu a srdce.

Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Hlavním předmětem řešení projektu bylo stanovení vlivu azitromycinu na srdeční funkci a histomorfologii u králíků a potkanů po jeho perorální aplikaci. Zároveň byl řešen vliv azitromycinu na trávicí trakt králíka, a to včetně změn v mikrobiomu. Téma projektu je v souladu s dlouhodobým zaměřením výzkumu všech ústavů v rámci sekce. Projektové cíle byly založeny na publikovaných výsledcích zúčastněných pracovišť a nejaktuálnějších (dosud nepublikovaných) poznatcích. Jednotlivé části projektu budou součástí 2 disertačních prací, a tím je také zajištěna motivace studentů pro osvojení vědecké práce a publikace článků. Dále práce na projektu významně přispěla k dalšímu vzdělávání všech členů projektu, a to nejen v oblasti vědy a výzkumu, ale také v rámci aplikace získaných poznatků do klinické veterinární praxe. Výsledky výzkumu jsou součástí primárního výzkumu FVL VETUNI Brno, a to konkrétně v rámci využití a vlivu antibiotik na králíka a potkana nejen jako zvířete chovaného ze záliby, ale i experimentálně chovaného zvířete. Výsledky výzkumu budou zařazeny

do výuky studentů FVL VETUNI Brno v rámci předmětů týkajících se problematiky farmakologie a laboratorní diagnostiky chorob králíků.

Cíle projektu:

Projekt byl rozdělen na tyto dílčí cíle: 1. Stanovení vlivu azitromycinu na morfologii a fyziologii srdeční funkce u králíků po jeho perorální aplikaci; 2. Posouzení vlivu perorální aplikace azitromycinu na mikrobiom střeva a histomorfologii trávicího traktu králíka; 3. Stanovení vlivu azitromycinu na morfologii a fyziologii srdeční funkce u potkanů po jeho perorální aplikaci. V rámci zaměření

projektu byl v jeho průběhu přidán další cíl, a to 4. Antimikrobiální vnímavost a rezistence k antibiotikům u pet králíků.

Popis a metodika řešení projektu:

Stanovení vlivu azitromycinu na morfologii a fyziologii srdeční funkce u králíků po jeho perorální aplikaci po dobu 14 dnů, Posouzení vlivu perorální aplikace azitromycinu na mikrobiom střeva a histomorfologii trávicího traktu králíka. V první fázi bylo použito 14 králíků rozdělených do 2 skupin. Skupina

A: 7 králíků, kterým byl aplikován perorálně azitromycin v dávce 30 mg/kg a Skupina B: 7 králíků, kterým byl aplikován perorálně fyziologický roztok. V průběhu experimentu byl sledován vliv azitromycinu na vybrané hematologické a biochemické parametry, bylo provedeno opakovaně echokardiografické a EKG vyšetření a byly stanoveny krevní markery poškození srdečního svalu, a to LDH a CK, cTnI a SOD. Krev pro analýzy byla odebrána 2 dny před aplikací azitromycinu a v průběhu experimentu 48 h po aplikaci, 7. den a 14. den po aplikaci. Po 14 dnech byla provedena eutanázie a bylo provedeno patoanatomické vyšetření včetně odběru vzorků žaludku, tenkého střeva, céka a kolonu (z každé části GIT min. 2 vzorky), parenchymatózních orgánů (játra, ledviny) a srdce na histologické vyšetření. Vzorky trusu byly opakovaně odebírány a ze získaných vzorků střevního obsahu (céka) a trusu byl stanoven: 1) střevní mikrobiom včetně detekce případného výskytu patogenních bakterií; a 2) fekální kalprotektin odrážející zánětlivou odpověď ve střevě.

Stanovení vlivu azitromycinu na morfologii a fyziologii srdeční funkce u potkanů po jeho perorální aplikaci po dobu 14 dnů. V druhé fázi bylo použito 16 potkanů rozdělených do 2 skupin. Skupina A: 8 potkanů, kterým byl aplikován perorálně azitromycin v dávce 30 mg/kg p.o. 1x/den; Skupina B: 8 potkanů, kterým byl aplikován perorálně fyziologický roztok. Tato část dále probíhala podobně jako experiment u králíků. Na základě výsledků klinického vyšetření, vyhodnocení srdeční funkce, stanovení srdečních markerů, analýzy periferní krve, posouzení chování, produkce a charakteru trusu, mikrobiologického vyšetření trusu a histopatologického vyšetření orgánů byla stanovena bezpečnost použití tohoto přípravku pro králíka a potkana.

Antimikrobiální vnímavost a rezistence k antibiotikům u pet králíků. Do této studie byly zařazeny analýzy mikrobiologického vyšetření od 300 králíků v zájmových chovech léčených na soukromé veterinární klinice v České republice.

Dosažené výsledky projektu:

Stanovení vlivu azitromycinu na srdeční funkci a histomorfologii u králíků po jeho perorální aplikaci. Zjištění vlivu perorální aplikace azitromycinu na zdravotní stav králíka, vliv na mikrobiom střeva a histomorfologii trávicího traktu králíka. Aplikace azitromycinu (30 mg/kg PO po 14 dnů) neměla v porovnání s kontrolní skupinou vliv na hmotnosti a příjem potravy. Zjištěné snížení hmotnosti a snížení příjmu potravy souvisely u obou skupin pravděpodobně se stresem vyvolaným podání léčiva. U 2 králíků (2/7), kterým byl podáván azitromycin byla zjištěna kulatobuněčná (lymfoplasmocytární) zánětlivá reakce infiltruující intersticiem mezi kardiomyocyty. Dále byla u experimentální skupiny králíků zjištěna signifikantně vyšší incidence hydropické a granulární dystrofie jater. Nebyly zjištěny žádné histopatologické změny na trávicím traktu (tenké střevo, cékum, kolon). Echokardiografické vyšetření srdce a EKG neukázalo jasně zřetelné změny související s aplikací azitromycinu.

Stanovení vlivu azitromycinu na srdeční funkci a histomorfologii u potkanů po jeho perorální aplikaci. Aplikace azitromycinu (30 mg/kg PO po 14 dnů) neměla v porovnání s kontrolní skupinou vliv na hmotnosti a příjem potravy. Echokardiografické vyšetření srdce a EKG neukázalo jasně zřetelné

změny související s aplikací azitromycinu. U kontrolní skupiny potkanů se hodnoty BNP pohybovali v rozmezí 0,22-0,55 pg/ml (průměr±SD 0,30±0,051 pg/ml) a v experimentální skupině 0,48-0,92 pg/ml (0,68±0,062 pg/ml).

Celkem bylo od potkanů a králíků v rámci stanovení mikrobiomu/NGS izolováno 240 vzorků DNA, vlastní určení bakterií probíhá. Další výsledky budou následovat po zpracování získaných vzorků.

Antimikrobiální vnímavost a rezistence k antibiotikům u pet králíků. V této studii byla analyzována mikrobiologická zjištění od 300 králíků v zájmových chovech. Vzorky byly získány především z faciálních abscesů odontogenního původu, nosních dutin a uší (zejm. středoušní dutiny) a jiných lokací. Nejčastějšími izoláty byly *Fusobacterium nucleatum*, *Trueperella pyogenes*, MRSA a *Pasteurella multocida*. Významná AMR byly pozorována zejména u izolátů MRSA, které vykazovaly rezistenci

na většinu testovaných antibiotik. Rezistence vůči běžně používaným antibiotikům, včetně enrofloxacinu, gentamicinu a klindamycinu, byla zjištěna u několika bakteriálních druhů.

- Publikace získaných informací ve vědeckém časopise (některá data stále ve stádiu zpracování) a zařazení nových informací do výuky studentů VETUNI Brno.
- Vypracování odborné práce: Mačinová A. Antimicrobial susceptibility and resistance profiles in pet rabbits. VETUNI Brno, 2024:78.

Přínos projektu:

Předpokládaným přínosem projektu bylo a je získání původních vědeckých výsledků, které byly a budou prezentovány na zahraničních a tuzemských konferencích a publikovány ve vědeckých časopisech. Dalším přínosem projektu také kooperace víceoborového týmu se začleněním mladých vědeckých pracovníků, kteří rozšířili své znalosti a metodické dovednosti. Nemalým přínosem projektu je také pokračování a integrace vědecko-výzkumné činnosti v rámci sekce a VETUNI Brno.

Využití výsledků:

Výsledky projektu byly a budou prezentovány na zahraničních a tuzemských konferencích. Získaná data budou začleněna do výsledků v disertačních pracích doktorandů dr. Tomiczkové, a dr. Piskovské a již byla začleněna do odborné práce MVC . Mačinové. Navíc výsledky projektu poslouží pro informování veterinární veřejnosti o možnosti využití azitromycinu při terapii infekčních onemocnění u králíků a potkanů a/nebo o jejich toxicitě. Výsledky budou zařazeny do výuky studentů VETUNI Brno.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

- Odborné články, ve WOS, bez impakt faktoru

Jekl V., Modry D. Gastroenterology in rodents. *Veterianry CLINICS of North America: Exotic Animal Practice*, 2025, in press (SJR 2023 0.37; Q2)

Jekl V. Adrenal Disease in Small Mammals. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2025;28(1):87-106. (SJR 2023 0.37; Q2)

- Odborná práce

Mačinová A. Antimicrobial susceptibility and resistance profiles in pet rabbits. *FVL VETUNI Brno*, 2024:78.

- Plánované publikace

Effect of oral azithromycin administration on cardiac morphology and function in rabbits. Veterinary Journal

Effect of oral azithromycin administration on cardiac morphology and function in rats. Laboratory Animals (UK)

Effect of oral azithromycin administration on clinical health, intestinal pathomorphology and intestinal microbiota of rabbits. Veterinary Microbiology

Antimicrobial susceptibility and resistance profiles in pet rabbits. Veterinary Microbiology

Antibiotic therapy of pet rats with respiratory disorders – update. Journal of Exotic Pet Medicine

Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	1 132 442,00	1 132 442,00
Služby	150 000,00	75 207,76
Cestovné	60 000,00	34 766,64
Další provozní náklady	500 128,00	600 153,60
Doplňkové náklady	276 386,00	276 386,00
Celkem	2 118 956,00	2 118 956,00

Zdůvodnění nákladů:

Osobní náklady byly vypočteny na základě doporučení ze strany FVL VETUNI Brno. Z celkové je na stipendia vyhrazeno 50. 000,- Kč. Výše materiálových nákladů vychází z projektového designu, použitých metod a počtu vzorků.

Provozní náklady zahrnovaly nákup králíků a potkanů z akreditovaného chovu, vybavení klecí, materiál pro histopatologické vyšetření, náklady na spotřební materiál (ELISA kity, kity na extrakci DNA, reagentie pro hematologické a biochemické vyšetření krve, pro stanovení markerů srdečního postižení, odběrový materiál, zkumavky, dezinfekce, materiál pro EKG a echokardiografické vyšetření apod.).

Cestovní náklady zahrnovaly část nákladů na účast na mezinárodní konferenci zaměřené na onemocnění drobných savců - 2024 ICARE Conference (Internation Conference on Avian, Herpetological, Exotic Mammal, Zoo and Wildlife Medicine, Ghent, Belgie-

Náklady na služby zahrnovali náklady na vyšetření mikrobiomu střeva králíků a na statistické zpracování získaných dat.

Náklady na drobný hmotný majetek na pořízení kancelářských potřeb apod.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě doložte výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2024 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude odkazovat na podporu ITA VETUNI. Výhradní odkaz na projekt ITA VETUNI (bez odkazů na podporu z dalších grantů, projektů a jim obdobných finančních zdrojů) musí obsahovat vždy nejméně jedna publikace s impakt faktorem na každých 1,5 milionu korun způsobilých nákladů projektu, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu:

doc. MVDr. Vladimír Jekl, Ph.D., DipECZM

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2024 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

MVDr. Jan Chloupek, Ph.D.

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:

Ing. Vladimír Kohoutek

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

doc. MVDr. Michal Crha, Ph.D.

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2024

Identifikační číslo projektu: 2024ITA16

Název projektu: Syndrom paroxysmální gluten-senzitivní dyskinézy (PGSD) u borderteriérů – hledání možných genetických příčin

Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: MVDr. Karla Stejskalová, Ph.D.

Fakulta/celoškolské pracoviště: Ústav genetiky FVL VETUNI

E-mail: stejskalovak@vfu.cz

Telefon: +420541562297

Řešitelský kolektiv:

složení řešitelského týmu: (akademičtí pracovníci a jejich příslušnost k ústavům nebo klinikám fakulty nebo výzkumným skupinám CEITEC, studenti DSP) a forma zapojení každého člena řešitelského týmu

Projekt byl řešen v rámci Ústavu genetiky FVL VETUNI.

MVDr. Karla Stejskalová, PhD.: 1,0 FTE, design projektu, analýza rodokmenů, zpracování vzorků, analýza dat

Prof. MVDr. RNDr. Petr Hořín, CSc.: 1,0 FTE, design a koordinace projektu, analýza dat

Ing. Leona Vychodilová, PhD.: 0,65 FTE, zpracování vzorků, analýza dat

MVDr. April Jelinek, DSP studentka, zpracování vzorků, analýza dat

Celkový FTE pro FVL: 2,65

V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu:

Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Téma projektu reflektuje priority Vyhlášení soutěže na projekty Institucionálního výzkumu podporované prostřednictvím ITA VETUNI pro rok 2024, zejména problematiku veterinární molekulární biologie, problematiku chorob psů, koček a dalších zájmových zvířat a problematiku patomorfologického, patofyziologického a dalšího preklinického výzkumu ve veterinárním lékařství.

Cíle projektu:

Vzhledem ke vzrůstajícímu výskytu PGSD v české populaci borderteriérů bylo cílem projektu hledat možnou genetickou příčinu tohoto onemocnění, navrhnout možný způsob dědičnosti a umožnit formulovat vhodná chovatelská opatření. Použité nástroje zahrnovaly analýzu rodokmenů; dále analýzu kandidátních genů, celogenomové sekvenování, genotypování pomocí HD-SNP microarray a bioinformatickou analýzu variabilních míst genomu v souvislosti s PGSD.

Popis a metodika řešení projektu:

Odběry a diagnostika PGSD proběhly na základě externí spolupráce s MVDr. Kateřinou Zouharovou (Jedovnice u Brna) doplněné o sérologické vyšetření pro stanovení protilátek proti gliadinu a TG2 (Laboklin Czech) a anamnestický dotazník pro chovatele. Byla provedena analýza rodokmenů všech jedinců a sledována segregace onemocnění. Jako kandidátní geny byly zvoleny geny MHC tř. II : DLA-DRB1, DQA1, DQB1, gen pro tkáňovou transglutaminázu TG6 a gen kódující etanolamin fosfát transferázu PIGN. Kompletní sekvence těchto genů nebo jejich vybrané úseky byly po PCR amplifikaci sekvenovány na našem ústavu na platformě Illumina MiSeq. Pro celogenomové sekvenování byli vybráni 2 PGSD pozitivní jedinci. Příprava sekvenační knihovny a následné sekvenování bylo řešeno formou zakázky (Novogene, Cambridge, UK) na platformě Illumina NovaSeq6000, coverage 125 GB (50x). Pro genotypování pomocí HD-SNP microarray bylo vybráno 12 jedinců (pozitivní a negativní zastoupení stejnoměrně). Příprava knihovny a genotypování na Illumina Canine HD Beadchip bylo řešeno formou zakázky (Neogen, USA). Bionformatická analýza variabilních míst genomu identifikovaných pomocí HD-SNP microarray se stanovením tzv. runs of homozygosity (ROH) v kombinaci s daty z celogenomového sekvenování a porovnání s databází existujících genomů psů (projekt DBVDC) umožnila vytipovat oblasti genomu vhodné k bližšímu zkoumání a rozšířit okruh kandidátních genů.

Dosažené výsledky projektu:

Celkem bylo k dispozici 22 vzorků krve od PGSD pozitivních psů a 39 negativních. Analýza rodokmenů ukázala řadu společných předků - důsledek relativně úzké původní chovatelské základny – a podpořila možnost autosomálně recesivní dědičnosti s neúplnou penetrancí. U všech vzorků byly sekvenovány zvolené kandidátní geny. Analýza takto získaných dat probíhá. Proběhlo celogenomové sekvenování 2 pozitivních vzorků (2x 128Gb, Q30>92%, coverage 30x, resp. 35x, mapping rate 99,37 a 99,53%) a genotypování pomocí HD-SNP čipu u šesti vybraných pozitivních a šesti negativních vzorků (otypováno 220853 SNP, 98,4% úspěšnost). Získaná data ukázala výskyt jediné chromosomální oblasti o délce přibližně 1,3Mbp, kde všechny pozitivní vzorky byly homozygotní pro určitou alelu, zatímco negativní vzorky měly genotyp heterozygotní nebo homozygotní pro druhou alelu. Tato oblast se nachází na chromosomu 12 a v současné době probíhá analýza nového kandidátního genu v této oblasti – ADGRB3. Porovnání variant nalezených celogenomovým sekvenováním dvou pozitivních vzorků s databází známých variant genomů psů (projekt DBVDC) stále probíhá; v dané oblasti chromosomu 12 je u těchto vzorků 215 homozygotních variabilních míst ve srovnání s referenční sekvencí.

Přínos projektu:

Projekt hodnotí výskyt PGSD v populaci českých borderteriérů (BT) a umožňuje formulovat vhodná chovatelská opatření, přináší prioritní data o variabilitě genů MHC tř. II a dalších u tohoto plemene a ověřuje jejich souvislost s PGSD. Projekt dále přináší informace o struktuře, sekvenci a organizaci genomu borderteriérů a o vztahu mezi variantami genomu testovaných zvířat a PGSD, a umožňuje identifikovat nové kandidátní geny pro toto onemocnění.

Využití výsledků:

Projekt umožní porozumět segregaci PGSD v chovech BT a možnému způsobu dědičnosti. Přinese prvotní data o polymorfismech genů MHC tř. II : DLA-DRB1, DQA1, DQB1, genu TG6 u borderteriérů, a prověřuje případný výskyt kauzální mutace pro paroxysmální dyskinezi v genu PIGN, známé

u příbuzného plemene psů. Dále umožňuje hledat výskyt homozygotních variant genomu jedinečných pro PGSD pozitivní psy a porovnat organizaci genomu těchto jedinců s existujícími databázemi.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

Genomic approach to molecular dissection of Paroxysmal Gluten-Sensitive Dyskinesia in Border Terriers; Animal Genetics

Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	335 416,00	335 416,00
Služby	127 000,00	126 577,60
Cestovné	0,00	0,00
Další provozní náklady	319 072,00	319 494,40
Doplňkové náklady	117 223,00	117 223,00
Celkem	898 711,00	898 711,00

Zdůvodnění nákladů:

Přesun prostředků: V souladu se směrnicí došlo k přesunu prostředků ve výši 422,40 ze služeb do ostatních provozních nákladů

Osobní náklady:

Byly použity v souladu s plánem řešení ve formě odměn pro pracovníky na projektu. Odměny byly vyplaceny v polovině řešení projektu a na jeho konci. Studentce DSP bylo v souladu s plánem řešení vyplaceno stipendium.

Služby:

Byly čerpány na zakázkové sekvenování, genotypování a přidružené bioinformatičké služby (celkem 105479 Kč, zaokrouhleno). U vybraných vzorků bylo provedeno sérologické vyšetření (21013 Kč).

Cestovné: Nebylo plánováno ani čerpáno.

Další provozní náklady:

Reagenční kity pro NGS (224697 Kč), izolační DNA kit (10108 Kč), ostatní reagentie (38720 Kč), laboratorní sklo a plasty (21829 Kč), PC komponenty (22674 Kč), suchý led (1464 Kč).

Doplňkové náklady:

Byly čerpány v souladu s plánem projektu.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě doložte výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2024 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude odkazovat na podporu ITA VETUNI. Výhradní odkaz na projekt ITA VETUNI (bez odkazů na podporu z dalších grantů, projektů a jim obdobných finančních zdrojů) musí obsahovat vždy nejméně jedna publikace s impakt faktorem na každých 1,5 milionu korun způsobilých nákladů projektu, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu:

8.1.2025 MVDr. Karla Stejskalová, PhD.

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2024 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu **odpovědného za čerpání prostředků:**

8.1.2025 MVDr. Karla Stejskalová, PhD.

Přednosta ústavu nebo kliniky, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu nebo klinice, respektive celoškolském pracovišti, které řídí.

Datum, jméno a podpis

přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

8.1.2025 prof. MVDr. RNDr. Petr Hořín, CSc.

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:

8.1.2025 Ing. Vladimír Kohoutek

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

8.1.2025 doc. MVDr. Michal Crha, Ph.D.

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2024

Identifikační číslo projektu: 2024ITA21

Název projektu: Vybrané ukazatele bezpečnosti a kvality surovin a potravin živočišného původu a jejich rostlinných alternativ

Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

Fakulta/celoškolské pracoviště: Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie VETUNI

E-mail: bursovas@vfu.cz

Telefon: 541 562 710, 720 053 850

Řešitelský kolektiv:

složení řešitelského týmu: (akademičtí pracovníci a jejich příslušnost k ústavům nebo klinikám fakulty nebo výzkumným skupinám CEITEC, studenti DSP) a forma zapojení každého člena řešitelského týmu

doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; hlavní řešitelka – koncepce a koordinace projektu a dílčích aktivit, kontrola splnění požadavků schváleného návrhu projektu, odpovědnost za čerpání finančních prostředků, vypracování Závěrečné zprávy projektu o řešení projektu a účast na obhajobě projektu v rámci obhajob projektů ITA VETUNI, dále podíl na koordinaci a praktické realizaci projektové metodiky, podíl na realizaci publikace (Aktivita 2)

doc. MVDr. Josef Kameník, CSc., MBA, akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitel – zástupce řešitele, koncepce a koordinace Aktivita 1, odpovědnost za čerpání finančních prostředků, podíl na praktické realizaci projektové metodiky, podíl na realizaci publikace (Aktivita 1)

Ing. Fouad Ali Abdullah Abdullah, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitel – podíl na praktické realizaci projektové metodiky (chemické analýzy), podíl na realizaci publikace (Aktivita 1)

Ing. Klára Bartáková, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitelka – koncepce a koordinace Aktivita 3, odpovědnost za čerpání finančních prostředků, podíl na praktické realizaci projektové metodiky, analýza a statistické hodnocení získaných výsledků, podíl na realizaci publikace (Aktivita 3)

MVDr. Jiří Bednář, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, akademický pracovník, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitel – podíl na praktické realizaci projektové metodiky, podíl na realizaci publikace (Aktivita 3)

MVDr. Sandra Dluhošová, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitelka – podíl na praktické realizaci projektové metodiky, podíl na realizaci publikace (Aktivita 3)

Ing. Jana Doležalová, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitelka – podíl na praktické realizaci projektové metodiky, podíl na realizaci publikace (Aktivita 3)

Mgr. Marta Dušková, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitelka – koordinace dílčích úkolů, podíl na praktické realizaci projektové metodiky, podíl na realizaci publikace (Aktivita 1)

Ing. František Ježek, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitel – koordinace dílčích úkolů, podíl na praktické realizaci projektové metodiky, analýza a statistické hodnocení získaných výsledků, podíl na realizaci publikace (Aktivita 3)

MVDr. Michaela Králová, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 0,75; spoluřešitelka – podíl na praktické realizaci projektové metodiky, podíl na realizaci publikace (Aktivita 3)

Ing. Blanka Macharáčková, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitelka – koordinace dílčích úkolů, podíl na praktické realizaci projektové metodiky, podíl na realizaci publikace (Aktivita 3)

MVDr. Pavlína Navrátilová, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek: 1,0; spoluřešitelka – koordinace dílčích úkolů, podíl na praktické realizaci projektové metodiky, podíl na realizaci publikace (Aktivita 1)

doc. MVDr. Lenka Necedová, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek: 1,0; spoluřešitelka – koncepce a koordinace Aktivita 2, odpovědnost za čerpání finančních prostředků, podíl na praktické realizaci projektové metodiky, podíl na realizaci publikace (Aktivita 2)

Mgr. Jan Pospíšil, akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitel – podíl na praktické realizaci projektové metodiky, podíl na realizaci publikace (Aktivita 3)

MVDr. Helena Veselá, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek: 1,0; spoluřešitelka – koordinace dílčích úkolů, odpovědnost za čerpání finančních prostředků, podíl na praktické realizaci projektové metodiky, podíl na realizaci publikace (Aktivita 1)

Mgr. Alena Zouharová, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek: 0,5; spoluřešitelka – koordinace dílčích úkolů, podíl na praktické realizaci projektové metodiky, podíl na realizaci publikace (Aktivita 2)

Studenti DSP

Ing. Simona Ondruchová, aktuálně studentka 2. ročníku DSP, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE; spoluřešitelka – podíl na praktické realizaci projektové metodiky (odběr vzorků), podíl na realizaci publikace (Aktivita 1)

Ing. Bc. Kateřina Stojanová, aktuálně studentka 2. ročníku DSP, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE; spoluřešitelka – podíl na praktické realizaci projektové metodiky, upracování a statistická analýza výsledků, podíl na realizaci publikace (Aktivita 2)

V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu: Projekt byl řešen na Ústavu hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie Fakulty veterinární hygieny a ekologie Veterinární univerzity Brno.

Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Předmětem řešení projektu byla problematika bezpečnosti a kvality surovin a potravin živočišného původu a jejich rostlinných alternativ, která je stále vysoce aktuálním tématem spojeným nejen se změnami životního stylu obyvatel, změnami ve stravovacích návycích a způsobech stravování, ale také s globalizací potravinového řetězce. Náplň projektu plně odpovídala výzkumnému zaměření Ústavu hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie a naplnila jednu ze stanovených priorit soutěže – problematika zdravotní nezávadnosti, hygieny a technologie potravin.

Projekt byl plně v souladu s výzkumným zaměřením Sekce hygieny a technologie potravin FVHE VETUNI a se strategií výzkumu FVHE VETUNI v oblasti Hygieny a technologie potravin, který je zaměřen mimo jiné na výzkum patogenních agens (původců alimentárních onemocnění) v potravinách a dále kontrolu a dozor nad potravinami. Projekt navázal na výzkumné aktivity zahájené v rámci projektu 2022ITA24 a 2023ITA24. Výzkum byl také plně v souladu s národními prioritami orientovaného výzkumu, které identifikují oblast bezpečnosti potravin jako jednu z klíčových priorit výzkumu EU a ČR.

Cíle projektu:

Mikrobiologické analýzy byly zaměřeny na výskyt shigatoxin-produkujících *Escherichia coli* (STEC) na jatečně upravených tělech prasat, ve střevním obsahu jatečných prasat a ve vzorcích mletého masa z tržní sítě. Současně byl za využití prediktivních modelů hodnocen vliv teploty na dynamiku růstu STEC v mletém vepřovém mase. Dále byly porovnány fyzikálně-chemické a senzorické parametry sýrů a jejich rostlinných alternativ dostupných v tržní síti České republiky.

Popis a metodika řešení projektu:

Aktivita 1: Výskyt STEC u jatečných prasat a ve vepřovém mase

Na 4 jatečných provozech (včetně VETUNI) bylo odebráno celkem 327 vzorků stěrů z povrchu vepřových JUT, 268 vzorků trusu získaných z konečnicků poražených prasat a po 9 vzorcích střevního obsahu z dílčích úseků tenkého a tlustého střeva (pouze VETUNI), z JUT byly provedeny výtěry dutin nosní na přítomnost methicilin rezistentních *S. aureus* (MRSA). Dále bylo analyzováno 14 vzorků mletého masa bezprostředně po nákupu a po 7 dnech skladování v chladírenských teplotách. V doposud 440 ze všech odebraných vzorků byly metodou PCR sledovány geny *stx*, *hly* a *eae*, ve všech odebraných vzorcích proběhlo kultivační vyšetření na průkaz salmonel, *Listeria monocytogenes* a MRSA (165 vzorků). Vepřové mleté maso a masné polotovary charakteru mletého masa byly vyšetřeno v souladu s nařízením (ES) 2073/2005, dále byly zjišťovány fyzikálně-chemické parametry (pH, a_w).

Aktivita 2: Modelování růstu STEC v mletém vepřovém mase

V mletém vepřovém mase byla sledována dynamika růstu STEC při různých teplotách skladování (od 2 °C do 48 °C; intervaly 2–3 °C). K zaočkování masa byla použita směsná suspenze 4 sbírkových kmenů STEC séro skupin O146, O156, O153 a O91 v poměru 1:1:1:1. Doba skladování se lišila v závislosti

na použité teplotě (48 hodin až 14 dní). Individuální vzorky pro stanovení počtu STEC byly odebírány a vyšetřeny ihned po inokulaci (0 h) a potom v pravidelných časových intervalech po celou dobu uchovávání vzorků. Počet STEC byl stanoven plotnovou metodou za využití TBX agaru (aerobně, 44 °C/24 h). Současně byla sledována hodnota pH a aktivita vody. Experiment byl proveden ve 3 paralelách + kontrola, a to pro každou sledovanou teplotu. Získaná data byla statisticky zpracována za využití matematických modelů. Byl hodnocen vliv teploty na kinetické parametry růstu STEC

v mletém vepřovém mase (délka lag fáze, maximální růstová rychlost), predikci minimální a maximální teploty růstu STEC a odhad možného rizika pro konzumenty (stanovení doby potřebné k dosažení předpokládané infekční dávky).

Aktivita 3: Fyzikálně-chemická a senzorická analýza rostlinných alternativ sýrů

V rámci této aktivity bylo analyzováno celkem 42 různých vzorků, přičemž 27 vzorků představovaly rostlinné alternativy sýrů, určené k přímé konzumaci i k tepelné úpravě, zakoupené v tržní síti tak, aby bylo postihnuto celé spektrum těchto výrobků dostupných na trhu v ČR. Další 15 vzorků pak byly tradiční sýry živočišného původu sloužící k porovnání stanovených parametrů. Analýzy byly zaměřeny na základní složení (obsah tuku, bílkovin, soli), na parametry ovlivňující údržnost potravin (pH, aktivita vody), na nutričně významné parametry (profil mastných kyselin, obsah makroprvků a mikroprvků, vybraných vitamínů a rostlinných a živočišných sterolů). U vybraných výrobků byl stanoven obsah akrylamidu. V rámci senzorického hodnocení bylo s pomocí panelu proškolených hodnotitelů provedeno srovnání vnímání vzhledu, vůně, chuti a textury rostlinných alternativ s tradičními sýry. Součástí senzorického hodnocení bylo také instrumentální hodnocení barvy a textury k vyhodnocení rozdílů u rostlinných alternativ a tradičních sýrů.

Dosažené výsledky projektu:

Aktivita 1: Výskyt STEC u jatečných prasat a ve vepřovém mase

Ze všech odebraných vzorků bylo dosud vyšetřeno 244 vzorků trusu na přítomnost genů virulence STEC, z toho byly pozitivní 3 vzorky (*stx2*). Ze 196 vzorků kůže na povrchu JUT byl pozitivní 1 vzorek (*eae*). Z 277 vzorků trusu odebraných z konečníku poražených prasat byly na salmonely pozitivní 3 vzorky, ve všech případech z jatek Skalice nad Svitavou. Ve dvou vzorcích odebraných ve stejný den a z prasat z 1 farmy byl potvrzený sérovar monofazická *S. Typhimurium*, z 1 vzorku získaného v jiný den a z jiné farmy to byl sérovar *S. Enteritidis*. Čtvrtý pozitivní vzorek (rovněž monofazická *S. Typhimurium*) byl získán z povrchu JUT na jatkách VETUNI. Ten den byla na fakultních jatkách poražena 3 prasata, trus byl ve všech třech vzorcích negativní a pozitivní bylo poslední JUT. Všechny odebrané vzorky byly negativní na přítomnost *L. monocytogenes*. Na jatkách ve Skalici nad Svitavou bylo odebráno 165 nosních výtěrů, na MRSA bylo pozitivních 19 vzorků. Z ostatních jatek nebyly žádné pozitivní vzorky na MRSA.

Vzorky mletých mas byly prosté salmonel. Hodnoty CPM kolísaly od 3,18 po 6,85 log KTJ/g v den nákupu a mezi 3,85-9,08 log KTJ/g po 7 dnech skladování. V tomto případě byly analyzované vzorky 2-6 dnů po datu spotřeby. Počet *E. coli* byl ve všech vzorcích pod mezí detekce (<1,70 log KTJ/g).

Aktivita 2: Modelování růstu STEC v mletém vepřovém mase

Pro jednotlivé skladovací teploty mletého vepřového masa byly vytvořeny růstové křivky shigatogenních *E. coli*, k modelování růstu byl primárně zvolen Baranyi-Robertsův model. Rychlost růstu STEC byla ovlivněna teplotou. Bakterie se množily při teplotách od 12 °C. Při teplotě 2 až 8 °C nebyl růst bakterií zaznamenán, naopak došlo k jejich odumírání. Z vytvořených růstových křivek je patrné, že nejdelší doba lag-fáze byla zaznamenána při teplotě 12 °C, a to 10 h 38 min 35 s ± 2 h 28 min 26 s. Naopak nejkratší doba lag-fáze, a to 1 h 34 min 26 s ± 44 min 42 s byla zaznamenána při 36 °C. S narůstající teplotou skladování se zvyšovala také rychlost růstu. Nejvyšší rychlost růstu byla zaznamenána při teplotě 36 °C, a to $81,981 \pm 9,671 \ln \text{KTJ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, nejnižší pak při teplotě 12 °C ($4,521 \pm 0,270 \ln \text{KTJ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). V další fázi statistického zpracování výsledků budou testovány ještě další primární modely (např. Gompertzův, Buchananův) a následně také modely sekundární za účelem stanovení vlivu teploty a hraničních teplot růstu.

Ze studie vyplynulo, že pro zajištění bezpečnosti je zcela zásadní respektovat teplotu uchovávání mletého masa max. 2 °C, jak vyplývá z požadavků legislativy (Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004). Nicméně ani při teplotě 8 °C k množení shigatogenních *E. coli* nedošlo. Naopak zcela nevhodné je uchovávat mleté vepřové maso při pokojové teplotě (24 °C) a vyšší, kdy se výrazně snižuje délka lag-fáze a může docházet k množení bakterií STEC již za méně než 2 hodiny.

Aktivita 3: Fyzikálně-chemická a senzorická analýza rostlinných alternativ sýrů

Při analýze údajů na obalech rostlinných alternativ sýrů bylo zjištěno, že výrobky dostupné na trhu je možné rozdělit do dvou hlavních skupin dle surovin použitých při výrobě, a to na výrobky na bázi ořechů (zejména kešu a mandle) a na výrobky obsahující jako hlavní suroviny kokosový olej a škrob. Při porovnávání výsledků jednotlivých stanovených parametrů byly zjištěny zásadní rozdíly v zastoupení bílkovin a také vápníku, což jsou dva hlavní nutrienty, jejichž vysoký obsah se u tradičních sýrů očekává. Co se týče obsahu bílkovin, u tradičních sýrů se pohybuje v rozmezí 15,3 – 32,6 %, zatímco z rostlinných alternativ pouze dva vzorky obsahovaly vyšší množství bílkovin (18,7 a 27,4 %), u ostatních vzorků bylo rozmezí obsahu bílkovin 0,04 – 5,48 %. Obsah vápníku činí v tradičních sýrech $7\ 001 \pm 3\ 001 \text{ mg/kg}$, zatímco v rostlinných alternativách pouze $1\ 231 \pm 1\ 786 \text{ mg/kg}$, což je statisticky významně nižší množství ($p < 0,05$). Statisticky významný rozdíl byl zjištěn také v obsahu zinku, kdy tradiční sýry obsahují $35,9 \pm 9,3 \text{ mg/kg}$, zatímco rostlinné alternativy pouze $2,23 \pm 2,99 \text{ mg/kg}$ s výjimkou dvou vzorků (89,6 a 33,1 mg/kg). Z uvedených rozdílů vyplývá, že označení rostlinné analogy nebo alternativy sýrů není příliš vhodné, protože tyto rostlinné výrobky neobsahují v dostatečně vysokém zastoupení ty nutrienty, které jsou u tradičních sýrů očekávány. Rozdíly byly zaznamenány i z hlediska senzorického hodnocení, kdy podobnost rostlinných výrobků s tradičními sýry byla zaznamenána pouze z hlediska vnímání vzhledu, ovšem z hlediska vnímání vůně a chuti se rostlinné výrobky od tradičních sýrů liší. Byl zjištěn jeden statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) směřující ve prospěch rostlinných výrobků, a to obsah cholesterolu, který v tradičních sýrech činí $41,2 \pm 17,9 \text{ mg/100 g}$, zatímco v rostlinných alternativách pouze $9,86 \pm 9,92 \text{ mg/100 g}$.

Přínos projektu:

Byly potvrzeny literární údaje o nízkém výskytu STEC na vepřových JUT. V případě salmonel odpovídá podíl pozitivních vzorků rovněž dřívějším výsledkům a poukazuje na důležitou „bariérovou“ funkci jatek v prevenci přenosu salmonel z trávicího traktu na maso. Byly rozšířeny informace o dynamice růstu STEC v mletém vepřovém maso v závislosti na skladovacích podmínkách. Dále byly získány informace o rozdílech v nutričních i senzorických vlastnostech tradičních sýrů a jejich rostlinných alternativ.

Využití výsledků:

Předpokládá se prezentace výsledků ve vědeckých časopisech s IF i v odborném časopise. Část výsledků již byla prezentována na vědeckých konferencích *Hygiena Alimentorum XLIV, LIII. Lenfeldovy a Höklovy dny* a *38th EFFoST International Conference*:

BARTÁKOVÁ, K., KAMENÍK, J., JEŽEK, F., BURSOVÁ, Š. Porovnání obsahu akrylamidu v tepelně upravených výrobcích živočišného původu a jejich rostlinných analogích. (Comparison of acrylamide content in heat-treated products of animal origin and their plant analogues). In: *Hygiena Alimentorum XLIV*, Košice: Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, 2024, pp. 168–173.

NECIDOVÁ, L., BURSOVÁ, Š., STOJANOVÁ, K., BARTÁKOVÁ, K., ZOUHAROVÁ, A. Modeling of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* growth in minced pork meat. In *38th EFFoST International Conference 2024 Abstract Book*. Bruges, Belgium, 2024, p. P2.3.016.

STOJANOVÁ, K., BURSOVÁ, Š., NECIDOVÁ, L., ZOUHAROVÁ, A. modelování růstu shigatoxigeních *E. coli* (STEC) v mletém vepřovém mase. (Modelling the growth of shigatoxigenic *E. coli* (STEC) in minced pork). In: *Hygiena a technologie potravin LIII. Lenfeldovy a Höklovy dny*, Brno: Veterinární univerzita Brno, 2024, pp. 260–265.

Současně již byla realizována publikace v časopise s IF (viz dále).

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

Aktivita 1: STEC occurrence on carcasses and in the digestive tract of slaughter pigs (*Veterinary Microbiology*; Q1)

Aktivita 2: Predictive modeling of STEC growth dynamics in pork minced meat (*Food Control*; Q2)

Aktivita 3: Are plant-based cheese alternatives also similar in composition or just in appearance and texture? (*LWT – Food Science and Technology*; Q2)

Současně již byla v rámci *Aktivity 1* realizována publikace v časopise s IF:

VESELÁ, H., DUŠKOVÁ, M., KAMENÍK, J. Does pork pose a higher risk of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* compared to meat of other ungulates? A review. *Acta Veterinaria Brno*. 2024, vol. 93, no. 4, s. 447-459. ISSN 0001-7213 (printed), ISSN 1801-7576 (electronic). DOI: <https://doi.org/10.2754/avb202493040447>.

Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	1 170 400	1 170 400
Služby	265 000	265 000
Cestovné	24 383	24 383
Další provozní náklady	575 000	575 000
Doplňkové náklady	305 217	305 217

Celkem	2 340 000	2 340 000
---------------	------------------	------------------

Zdůvodnění nákladů:

Přidělené finanční prostředky byly čerpány v plné výši, tj. **2 340 000,00 Kč**.

Osobní náklady:

Celkové čerpání položky činilo 1 070 400,00 Kč. Osobní náklady byly čerpány v rámci odměn pro zapojené akademické pracovníky (popis míry zapojení je uveden v části 4 Řešitelský kolektiv), a to jako: odměny – 800 001,00 Kč; zdravotní pojištění 71 998, 00 Kč a sociální pojištění 198 401,00 Kč. Plánované prostředky byly beze zbytku vyčerpány.

Služby:

Finanční prostředky z položky *Služby* v celkové výši 265 000, 00 Kč byly využity na nutný servis kapalinového a plynového chromatografu, k financování stanovení obsahu akrylamidu (provedeno na SVÚ Jihlava), k uhrazení vložného na zahraniční konferenci k prezentaci výsledků (Hygiena Alimentorum XLIV, Slovensko; 38th EFFoST International Conference 2024, Belgie), tisk posterů a jazykovou korekturu příspěvků. Plánované prostředky byly beze zbytku vyčerpány.

Cestovné:

V rámci této položky bylo vyčerpáno 24 383,00 Kč jako cestovné (ubytovací a cestovní náklady) řešitelů na zahraniční služební cesty v rámci konferencí Hygiena Alimentorum XLIV (Slovensko) a 38th EFFoST International Conference 2024 (Belgie). Plánované prostředky byly beze zbytku vyčerpány.

Další provozní náklady:

V položce *Další provozní náklady* byly čerpány finanční prostředky v celkové výši 575 000,00 Kč. Plánované prostředky byly beze zbytku vyčerpány.

Finanční prostředky byly využity na nákup vzorků masa, vzorků sýrů a jejich rostlinných alternativ, potravin pro přípravu vzorků před analýzou akrylamidu a senzorickým hodnocením (např. strouhanka, vejce, olej, rohlíky) a vybavení pro homogenizaci vzorků před jejich zpracováním (sekáček a tyčový mixer). Rovněž bylo nakoupeno bílé pečivo jako degustační sousto (nutné k realizaci senzorického hodnocení).

Pořízen byl dále materiál nezbytný pro mikrobiologickou analýzu vzorků – kultivační média, konfirmační testovací soupravy (Latex *Salmonella*), jednorázový plastový spotřební materiál (zejména Petriho misky, špičky k automatickým pipetám, mikroskopické kumavky, archivační kryozkumavky, centrifugační zkumavky), dále homogenizační sáčky s filtrem, abrazivní houbičky, komponenty pro metody PCR (primery) a další pomůcky (alobal, zkumavky s víčkem aj.).

V souvislosti s realizací chemických analýz byly pořízeny tlakové lahve s plyny pro stanovení pomocí GC a AAS, standardy pro kalibraci aw-metru a pH metru, chemikálie pro analýzu na HPLC (acetonitril) a GC (standardy mastných kyselin) a další spotřební materiál – kolony, ferule a stříkačkové filtry pro analýzu na HPLC a GC, laboratorní sklo a další vybavení jako odměrné baňky, kádinky, filtrační papíry, zátky, nálevky, chladiče, hadice k chladičům, stopky, fixy na sklo a nezbytné kancelářské potřeby.

V rámci této položky bylo pořízeno i laboratorní vybavení pro přípravu vzorků a následným analýzám – vodní lázeň a magnetické míchačky.

Doplňkové náklady:

Doplňkové náklady byly čerpány ve výši 305 217,00 Kč (15 % režie VETUNI).

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě doložte výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2024 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude odkazovat na podporu ITA VETUNI. Výhradní odkaz na projekt ITA VETUNI (bez odkazů na podporu z dalších grantů, projektů a jim obdobných finančních zdrojů) musí obsahovat vždy nejméně jedna publikace s impakt faktorem na každých 1,5 milionu korun způsobilých nákladů projektu, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu:

6. 1. 2025 doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2024 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu odpovědného za čerpání prostředků:

6. 1. 2025 doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

Přednosta ústavu nebo kliniky, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu nebo klinice, respektive celoškolském pracovišti, které řídí.

Datum, jméno a podpis

přednosty ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

6. 1. 2025 doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:

7. 1. 2025 Ing. Josef Kupčík

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

7. 1. 2025 doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2024

Identifikační číslo projektu: 2024ITA22

Název projektu: Zdravotní stav a produkční parametry vybraných druhů potravinových zvířat a kvalita surovin živočišného původu jako důsledek využití kvalitních krmiv, resp. jejich doplňků

Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: doc. MVDr. Radka Dobšíková, Ph.D.

Fakulta/celoškolské pracoviště: FVHE, Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie

E-mail: dobsikovar@vfucz.cz

Telefon: 541 562 784

Řešitelský kolektiv:

složení řešitelského týmu: (akademičtí pracovníci a jejich příslušnost k ústavům nebo klinikám fakulty nebo výzkumným skupinám CEITEC, studenti DSP) a forma zapojení každého člena řešitelského týmu

doc. MVDr. Radka Dobšíková, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), akademický pracovník, úvazek 1,0; hlavní řešitel a řešitel dílčího projektu 1– vedení projektu a koordinace činností řešitelského kolektivu, koordinace dílčích úkolů a částí projektu, odběr biologických vzorků, zajištění stanovení a vyhodnocení imunologických ukazatelů, parazitologického vyšetření, hodnocení ukazatelů masa kuřat, disekce porážených kuřat, analýza výsledků, statistické zpracování a vyhodnocení dat, příprava publikačních výstupů.

prof. Ing. David Zapletal, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), akademický pracovník, úvazek 1,0; spoluřešitel – koordinace dílčích úkolů, vypracování metodiky a management pokusu s kuřaty, sestavení pokusných diet, zjišťování výkrmnosti, odběr biologických vzorků, disekce porážených kuřat, analýza výsledků, statistické zpracování a vyhodnocení dat, příprava publikačních výstupů.

MVDr. Vlastimil Šimek, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), akademický pracovník, úvazek 1,0; spoluřešitel – zajištění výroby pokusných diet pro kuřata, dohled nad realizací výkrmového pokusu, zjišťování hmotnosti kuřat a spotřeby krmiv, odběr biologických vzorků, analýza výsledků, statistické zpracování a vyhodnocení dat, příprava publikačních výstupů.

Ing. Martina Kostůková, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), akademický pracovník, úvazek 1,0; spoluřešitel – zjišťování výkrmnosti a jatečné hodnoty kuřat, odběr vzorků trusu, odběr a příprava vzorků k analýzám, disekce porážených kuřat, odběr vzorků masa, rešeršní činnost k řešení problematice, statistické zpracování a vyhodnocení dat, příprava publikačních výstupů.

MVDr. Lenka Rozsypalová, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), akademický pracovník, úvazek 1,0; spoluřešitel – zjišťování hmotnosti a jatečné hodnoty kuřat, odběr a příprava vzorků k analýzám, stanovení hmotnosti vybraných orgánů, disekce porážených kuřat a odběr vzorků masa, analýza výsledků, rešeršní činnost k řešení problematice, statistické zpracování a vyhodnocení dat, příprava publikačních výstupů.

Mgr. Veronika Šimková, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), úvazek 0,5; spoluřešitel – odběr biologických vzorků, stanovení biochemických ukazatelů, aktivity enzymů a dalších hodnocených ukazatelů krve, analýza výsledků, vyhodnocení dat, příprava publikačních výstupů. Na projektu působila do srpna 2024. Od září 2024 byl do projektu začleněn nový akademický pracovník, MVDr. Jana Uříčářová.

MVDr. Jana Uříčářová – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, AP, úvazek 1,0; spoluřešitel – odběr a příprava vzorků k analýzám, stanovení biochemických ukazatelů, aktivity enzymů a dalších ukazatelů krve, analýza výsledků, vyhodnocení dat, příprava publikačních výstupů.

prof. Ing. Eva Straková, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), AP, úvazek 1,0; projektové aktivity v rámci ústavu – řešitel dílčího projektu 2: koordinace projektových aktivit dílčího projektu, metodické zpracování a vedení dílčího projektu, vyhodnocení analytické činnosti, tvorba databází výsledků, statistické zpracování výsledků, práce s literárními databázemi, rešeršní činnost k řešené problematice, publikační činnost, sepsání závěrečné zprávy za dílčí projekt.

V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu:

-

Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Tematicky je projekt ITA 2024 plně v souladu s vědeckými a výzkumnými aktivitami definovanými v rámci Institucionálního výzkumu na Veterinární univerzitě Brno, konkrétně s prioritou zaměřenou na problematiku ochrany zvířat, welfare a etologie včetně působení stresorů a toxinů na zvířata a současně zcela souvisí s aktivitami Ústavu chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, který se mj. zabývá problematikou výživy potravinových zvířat, resp. studiem dietárních faktorů a jejich vlivu na zdraví, parametry vnitřního prostředí a užitkovosti zvířat s přesahem do oblasti kvality a zdravotní nezávadnosti produkce surovin a potravin živočišného původu. Výzkumné aktivity Ústavu jsou rovněž směřovány do oblasti využití netradičních a alternativních krmiv pro výživu potravinových zvířat a vyhodnocení jejich vlivu na vybrané indikátory zdravotního stavu, užitkovosti a finální kvality živočišných produktů. Navrhovaný dílčí projekt je plně v souladu s vědeckovýzkumnými aktivitami FVHE VETUNI.

Cíle projektu:

Cílem výzkumného projektu ITA 2024 Ústavu chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie bylo zhodnocení dietárního vlivu začlenění podílu kondenzovaných taninů z kebračovniku (*Schinopsis lorentzii*) na výkrmnost, fyziologii, imunologii, morfologii střeva, celkový zdravotní stav, jatečnou hodnotu a kvalitu masa vykrmovaných brojlerů experimentálně infikovaných parazitem *Eimeria* sp. (dílčí projekt 1), resp. posouzení nutriční hodnoty zelené hmoty lupiny bílé v průběhu vegetačního období pro její možné uplatnění ve výživě přežvýkavců (z hlediska optimální stravitelnosti a využitelnosti živin) včetně konsekvencí následné konzervace tohoto typu krmiva (dílčí projekt 2).

Popis a metodika řešení projektu:

Dílčí projekt 1 byl zaměřen na vyhodnocení vlivu přídatku bylinného aditiva kebračovníku na níže uvedené parametry zdraví, užitkovosti a kvality vytěžených surovin živočišného původu. V pokusu byli využiti kohoutci brojlerových kuřat hybridní kombinace Ross 308 (n = 192), byl využit 2fázový systém výživy. Byly sledovány 4 dietární skupiny, a to pozitivní kontrola krmená standardními směsmi BR s obsahem antikokcidika robenidin (33 mg/kg) ve směsi BR2; negativní kontrola krmená směsmi BR bez přídatku antikokcidika či kondenzovaných taninů (CT); skupiny CT1 a CT 2 krmené směsmi BR2 a BR3 s přídatkem kondenzovaných taninů z kebračovníku v dávce 10 g/kg diety, resp. 20 g/kg diety. Byly realizovány 4 opakování v rámci každé hodnocené diety. Podmínky pokusu respektovaly doporučení technologického návodu pro chov dané hybridní kombinace. Experimentální infekce atenuovanou vakcínou proti kokcidióze proběhla ve 3. týdnu jejich věku brojlerů. V průběhu experimentu byla hodnocena výkrmnost brojlerů, jejich zdravotní stav, resp. mortalita. V průběhu experimentu byl realizován odběr vzorků trusu za účelem parazitologického vyšetření. V průběhu pokusu byly provedeny intravitální odběry krve pro vyšetření hematologických, biochemických (vč. ukazatelů antioxidačního statutu) a imunologických ukazatelů, postmortální odběry vzorků jejuny ke stanovení aktivity vybraných trávicích enzymů a odběry obsahu tráveniny céka k vyšetření obsahu koncentrace mastných kyselin s krátkým řetězcem a současně odběry tří oddílů tenkého střeva pro histomorfologické vyšetření. Finálně bylo u vybraných jedinců provedeno postmortální vyhodnocení hmotnosti sleziny, thymu a Bursy Fabricii. Zjištěné výsledky byly zpracovány a statisticky vyhodnoceny. Hypotézou projektu bylo zlepšení zdravotního stavu jedinců krměných přídatkem kebračovníku v souvislosti s inokulací vakcíny s kokcidiemi.

Dílčí projekt 2 se zabýval nutriční hodnotou a kvalitou proteinu zelené hmoty lupiny bílé (*Lupinus albus*) v průběhu vegetačního období. Byly zvoleny tři odběry zelené hmoty porostu lupiny bílé z plochy 1 m² v 9., 15. a 18. týdnu stáří porostu. Z důvodu zachování stejného počtu odebraných vzorků v 9., 15. i 18. týdnu stáří porostu bylo z plochy 1 m² odebráno pro chemickou analýzu 8 vzorků oproti plánovaným 10 vzorkům (problematické by bylo zejména období 9. týdne stáří porostu). Pro sledování byla vybrána tuzemská odrůda lupiny bílé Zulika, která se vyznačuje dobrými pěstebními vlastnostmi a je přizpůsobena k pěstování v klimatických a půdních podmínkách České republiky. Získané vzorky byly usušeny, homogenizovány a byla provedena základní chemická analýza na obsah sušiny, hrubého proteinu, aminokyselin, vlákniny, tuku a popelovin dle zaužívaných postupů v souladu s metodickými postupy ÚKZÚZ. Získané údaje byly statisticky vyhodnoceny. Hypotézou projektu byla očekávaná změna v nutriční hodnotě zelené hmoty lupiny bílé v souvislosti s vegetační fází porostu.

Dosažené výsledky projektu:

Dílčí projekt 1 byl zaměřen na objasnění vlivu dietárního začlenění bylinného aditiva kebračovníku obsahujícího kondenzované taniny na celkové zdraví, fyziologii, imunologii, antioxidační status, stav a funkčnost dílčích úseků trávicího traktu, dále na omezení výskytu kokcií a na užitkovost kuřecích brojlerů a finální kvalitu kuřecího masa. Z výsledků experimentu (a v souvislosti s výsledky již realizovaných obdobných dietárních studií) očekáváme metabolickou odezvu, alteraci biochemických ukazatelů krve, snížení počtu vylučovaných kokcií u infikovaných kuřat, resp. ovlivnění užitkovostních parametrů a ukazatelů kvality masa.

Dílčí projekt 2 se zaměřil na živinové změny lupiny bílé odrůdy Zulika, ke kterým dochází v porostu v průběhu vegetačního období od 9. do 18. týdne jeho stáří. Jedná se o období, ve kterém dochází k největším kvantitativním, ale i kvalitativním změnám, které se týkají jak růstu porostu, tak

chemického složení. Velmi intenzivní růst porostu byl zachycen od 9. do 15. týdne stáří porostu. V období od 15. do 18. týdne stáří porostu se růst výrazně snižoval. S růstem porostu lupiny bílé velmi úzce souvisí produkce zelené hmoty, vyjádřená v sušině hmoty, 9. týden 0,70 kg/m², 15. týden 5,43 kg/m², 18. týden 1,73 kg/m². V průběhu sledovaného období se zvyšoval obsah sušiny v zelené hmotě (9. týden 13,4 %), od 15. (16,4 %) do 18. (45,9 %) týdne stáří porostu, v rámci sledovaných fází vegetace (9., 15. a 18. týden stáří porostu) dochází i k významným změnám v základním živinovém složení sušiny zelené hmoty. Tyto změny byly charakterizovány poklesem hrubého proteinu (9. týden 203,5 g/kg; 15. týden 176,0 g/kg; 18. týden 162,0 g/kg) i poklesem celkového obsahu aminokyselin v období od 9. (150,7 g/kg) do 15. týdne stáří porostu (127,4 g/kg) a následným zvýšením v 18. týdně (146,2 g/kg). V 9. týdně stáří porostu byla nejvyšší průměrná hodnota prokázána u Thre (8,2 g/kg), Ser (8,2 g/kg), Pro (10,0 g/kg), Gly (9,4 g/kg), Ala (11,9 g/kg), Val (8,8 g/kg), Met (0,8 g/kg), Ile (7,5 g/kg), Leu (12,1 g/kg), His 4,4 g/kg a Lys (11,5 g/kg). V 15. týdně stáří porostu byla nejvyšší průměrná hodnota prokázána u Asp (36,1 g/kg) a Phe (6,6 g/kg) a v 18. týdně stáří porostu byla nejvyšší průměrná hodnota prokázána u Glu (28,8 g/kg), Tyr (6,1 g/kg) a Arg (16,0 g/kg). U obsahu tuku byl zaznamenán vysoce signifikantní pokles v 15. týdně stáří porostu a následné vysoce statisticky významné zvýšení jeho obsahu v 18. týdně stáří porostu (9. týden 33,5 g/kg; 15. týden 17,3 g/kg; 18. týden 42,9 g/kg). Obsah vlákniny se v průběhu sledovaného období zvyšoval (9. týden 183,0 g/kg; 15. týden 271,0 g/kg; 18. týden 308,0 g/kg); obdobně i sledované frakce vlákninového komplexu jako ADF (9. týden 258,0 g/kg; 15. týden 309,0 g/kg; 18. týden 366,0 g/kg), NDF (9. týden 390,0 g/kg; 15. týden 416,0 g/kg; 18. týden 433,0 g/kg) a ADL (9. týden 48,0 g/kg; 15. týden 48,0 g/kg; 18. týden 54,0 g/kg). U obsahu popelovin bylo v sušině zelené hmoty pozorováno postupné snižování, zejména pak v období od 9. do 15. týdne stáří porostu (9. týden 128,8 g/kg; 15. týden 71,5 g/kg; 18. týden 62,0 g/kg). Výsledky potvrdily výrazné rozdíly u sledovaných vybraných nutričních ukazatelů zelené hmoty lupiny bílé. Na základě dosažených výsledků je možné doporučit jako optimální fázi sklizně zelené hmoty lupiny bílé v souvislosti s následným využitím objemného krmiva pro přímé zkrmování do 15. týdne stáří porostu a pokud by byla zelená hmota využita pro konzervaci, za optimální se jeví období mezi 15. a 18. týdnem stáří porostu.

Přínos projektu:

Přínosem dílčího projektu 1 je rozšíření poznatků o účincích dietárně předkládaných kondenzovaných taninů z kebračovníku na fyziologii, imunitní odpověď, antioxidační status, histomorfologii střeva a na antikokcidiální účinek u kuřecího brojlera, resp. na jakostní ukazatele kuřecího masa. Potvrzením vlivu dietárně předkládaného fyto-genního aditiva lze vytvořit metodický postup k tvorbě nutriční strategie k udržení zdraví, welfare a užitkovosti brojlerů v kontextu ekonomicky přijatelné produkce bezpečného a kvalitního kuřecího masa. Přínosem dílčího projektu 2 je potvrzení hypotézy o významných rozdílech vybraných ukazatelů dle fáze vegetačního období. Praktickým přínosem je pak doporučení optimální fáze sklizně zelené hmoty pro maximální využití živin zvířaty v návaznosti na jejich stravitelnost, využitelnost a produkční potenciál s ohledem na to, že pro vysokou užitkovou potravinová zvířata je nutné zajistit vysoce kvalitní dietární protein, tj. mít k dispozici kvalitní bílkovinná krmiva s odpovídající optimální skladbou aminokyselin.

Využití výsledků:

Výsledky obou dílčích projektů výzkumného projektu ITA 2024 jsou využitelné pro přípravu návazných projektů základního, resp. aplikovaného výzkumu. Získané informace lze využít pro další studium týkající se využití alternativních a netradičních krmiv ve výživě zvířat. Očekává se uplatnění výsledků v chovatelské praxi a v rámci konzultační a poradenské činnosti, ve sféře vědecké, edukační

(uplatnění získaných poznatků ve výuce studentů VETUNI). Výsledky budou prezentovány formou vědeckého článku s IF, resp. odborné publikace a konferenčního sdělení.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

Dílčí projekt 1:

Effects of dietary inclusion of quebracho condensed tannins (*Schinopsis lorentzii*) on performance, biochemistry, intestine morphology, oocyst count, immune response, carcass composition and meat quality of *Eimeria* challenged broiler chickens.

Poultry Science, Q1 / *British Poultry Science*, Q2

Dílčí projekt 2:

Changes in the nutrient composition of white lupin green matter during the growing season.
Plant, Soil and Environment, Q2 nebo *Czech Journal of Animal Science*, Q3

Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	481.680,00	481.680,00
Služby	165.000,00	173.030,10
Cestovné	7.000,00	1.945,00
Další provozní náklady	215.886,00	212.910,90
Doplňkové náklady	130.434,00	130.434,00
Celkem	1,000.000,00	1,000.000,00

Zdůvodnění nákladů:

Osobní náklady celkem na projekt byly plánovány ve výši 481.680,00 Kč (včetně odvodů) a byly v souladu s projektem použity na vyplacení nákladů na mzdy-odměny pracovníkům řešitelských týmů (345.202,00 Kč), vyplacení nákladů na OPPP-dohody externistům (19.800,- Kč) a na odvody zdravotního a sociálního pojištění (31.068,00 Kč, resp. 85.610,00 Kč). Celková výše osobních nákladů vyplacených na projektu ITA 2024 byla v souladu s plánem, tj. 481.680,00 Kč, včetně odvodů (tj. celkem 55,39 % z přímých nákladů).

Služby celkem na projekt byly plánovány ve výši 165.000,00 Kč. Finanční prostředky byly využity na překladatelskou činnost, resp. za jazykovou korekturu a vydání IF publikace (46.466,10 Kč), dále na stanovení vybraného setu imunologických parametrů na VÚVeL (124.630,00 Kč) a na provedení DDD a úpravy boxových desek v experimentální stáji na budově č. 19 (1.934,00 Kč). V průběhu projektu bylo využito celkem 173.030,10 Kč (tj. 19,90 % z přímých nákladů).

Cestovné celkem na projekt bylo plánováno ve výši 7.000,- Kč. Finanční prostředky byly využity na pokrytí výdajů v souvislosti s odběrem vzorků zelené hmoty, s konzultační činností a setkáními

s výživářskými firmami v rámci mezinárodního agrosalonu Země živitelka 2024, resp. na jednáních a konferenci v rámci Vědeckého výboru výživy zvířat MZe ČR. V projektu bylo reálně využito celkem 1.945,00 Kč (tj. 0,20 % z přímých nákladů). Na položce Cestovné nevyčerpané finanční prostředky (tj. 5.055,00 Kč) byly využity v kapitole Služby.

Další provozní náklady byly plánovány v celkové výši 215.886,- Kč. V projektu bylo reálně využito celkem 212.910,90 Kč (tj. 24,50 % z přímých nákladů). Z této částky bylo 139.909,30 Kč využito na zakoupení spotřebního materiálu pro oba dílčí výzkumné projekty, jako např. chemikálií a standardů pro laboratorní analýzy, spotřebního laboratorního materiálu, jako např. filtračních sáčků pro analýzu vlákniny a vlákninových frakcí, samouzavíracích sáčků pro uchování biologického materiálu, špiček, dále pro zakoupení podestýlky, chovatelských pomůcek a drobného vybavení do experimentální stáje. Další finanční prostředky byly využity na zakoupení pokusných zvířat (12.040,00 Kč) a krmiva a testovaných bylin (60.961,60 Kč). Na položce Další provozní náklady nevyčerpané finanční prostředky (tj. 2.975,10 Kč) byly využity v kapitole Služby.

Doplňkové náklady na projekt byly ve výši 15 % z přímých nákladů, tj. celkem 130.434,00 Kč.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě doložte výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2024 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude odkazovat na podporu ITA VETUNI. Výhradní odkaz na projekt ITA VETUNI (bez odkazů na podporu z dalších grantů, projektů a jim obdobných finančních zdrojů) musí obsahovat vždy nejméně jedna publikace s impakt faktorem na každých 1,5 milionu korun způsobilých nákladů projektu, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis

7. ledna 2025 doc. MVDr. Radka Dobšíková, Ph.D.

řešitele projektu:

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2024 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis 7. ledna 2025 doc. MVDr. Radka Dobšíková, Ph.D.

člena řešitelského týmu **odpovědného za čerpání prostředků:**

Přednosta ústavu nebo kliniky, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu nebo klinice, respektive celoškolském pracovišti, které řídí.

Datum, jméno a podpis 7. ledna 2025 doc. MVDr. Radka Dobšíková, Ph.D.

přednosty ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Datum, jméno a podpis 8. ledna 2025 Ing. Josef Kupčík

správce rozpočtu:

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis 8. ledna 2025 doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2024

Identifikační číslo projektu: 2024ITA23

Název projektu: Patogenní organismy a jejich hostitelé v přírodním prostředí

Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: Prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.

Fakulta/celoškolské pracoviště: FVHE

E-mail: literaki@vfu.cz

Telefon: +420541562630

Řešitelský kolektiv:

složení řešitelského týmu: (akademičtí pracovníci a jejich příslušnost k ústavům nebo klinikám fakulty nebo výzkumným skupinám CEITEC, studenti DSP) a forma zapojení každého člena řešitelského týmu

Prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.	VETUNI, 1,0 (AP FVHE) Koordinace řešení projektu, plánování experimentů, koordinace terénních výzkumů, analýza cest šíření klinicky významných bakterií telemetrickým sledováním potenciálních ptačích vektorů, analýza dat, příprava publikačních výstupů.
Prof. MVDr. Pavel Široký, Ph.D.	VETUNI, 1,0 (AP FVHE) Koordinace řešení dílčího úkolu zaměřeného na krevní parazity plazů a obojživelníků, formulace hypotéz, vedení studentů a publikační finalizace výsledků laboratorních analýz.
Prof. RNDr. Oldřich Sychra, Ph.D.	VETUNI, 1,0 (AP FVHE) Koordinace řešení dílčího úkolu zaměřeného na studium ekologie parazito-hostitelských vztahů. Hodnocení potravních preferencí všenek, terénní sběr materiálu, analýza dat, příprava publikačních výstupů.
Doc. MVDr. Eva Bártová, Ph.D.	VETUNI, 1,0 (AP FVHE) Koordinace řešení dílčího úkolu, odchyt volně žijících hlodavců v okolí skládky komunálního odpadu Žabčice,

optimalizace PCR metody k druhové identifikaci myšic, detekce protilátek proti 12 agens u volně žijících bobrů evropských, analýza výsledků, příprava publikačních výstupů.

Mgr. Ivo Papoušek, Ph.D.	VETUNI, 1,0 (AP FVHE) Molekulárně genetická vyšetření vzorků napříč dílčími částmi projektu.
Mgr. Branka Bilbija, Ph.D.	VETUNI, 0,8 (AP FVHE) Molekulárně genetická vyšetření napříč dílčími částmi projektu, sekvenční analýzy.
Mgr. Marek Dostál, Ph.D.	VETUNI, 1,0 (AP FVHE) Studium migračních charakteristik ptačích vektorů patogenních bakterií.
MVDr. Michal Příbyl, Ph.D.	VETUNI, 1,0 (AP FVHE) Studium krevních parazitů plazů.
Studenti DSP	
Mgr. Jan Škrábal	DSP student VETUNI, prezenční forma, 2. ročník FVHE Analýza cest šíření klinicky významných bakterií telemetrickým sledováním potenciálních ptačích vektorů.
Mgr. Žaneta Živčicová	DSP student VETUNI, prezenční forma, 3. ročník FVHE Mikroskopie krevních nátěrů hostitelů, sekvenční analýzy izolátů krevních parazitů.
Mgr. Kristýna Opavská	DSP student VETUNI, prezenční forma, 1. ročník FVHE Izolace DNA, PCR k amplifikaci specifické parazitární DNA.
Mgr. Kristýna Plšková	DSP student VETUNI, prezenční forma, 1. ročník FVHE Analýza potravních preferencí všenek ptáků, příprava publikačních výstupů.
Mgr. Annabella Maria Schmiedová	DSP student VETUNI, prezenční forma, 1. ročník FVHE Morfometrická revize a hodnocení parazito-hostitelských vztahů luptoušů kolibříků, příprava publikačních výstupů.
Mgr. Marek Schneider	DSP student VETUNI, prezenční forma, 1. ročník FVHE

Morfometrická revize a hodnocení vztahů lupťoušů rodu *Myrsidea* u pěvců, příprava publikačních výstupů.

Mgr. Edita Kozlíková

DSP student VETUNI, prezenční forma, 2. ročník FVHE

Odchyt volně žijících hlodavců v okolí skládky komunálního odpadu a optimalizace PCR metody k druhové identifikaci myšic, pitvy hlodavců.

Mgr. Hana Pavelková

DSP student VETUNI, prezenční forma, 1. ročník FVHE

Monitoring bakterií *A. phagocytophilum* a *Rickettsia* spp. u klíšťat ze 3 zoo, sběr klíšťat v terénu, práce v molekulární laboratoři.

V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu: Nejedná se o společný projekt více součástí VETUNI.

Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Projekt plně zapadá do rámce výzkumu na VETUNI i prioritních témat soutěže ITA VETUNI 2024 (problematika původců infekčních a parazitárních onemocnění a nálezů zvířat, problematika chorob volně žijících zvířat, problematika veterinární molekulární biologie). Migrace významných ptačích vektorů patogenních bakterií je studována v rámci Centra telemetrických studií Ústavu biologie a chorob volně žijících zvířat, parazito-hostitelské interakce mezi volně žijícími hostiteli a patogenními organismy jsou studovány v rámci Laboratoře monitoringu patogenů, Laboratoře chorob volně žijících zvířat a Entomologická laboratoře Ústavu biologie a chorob volně žijících zvířat FVHE. Na řešení projektu se podíleli studenti DSP a také pregraduální studenti VETUNI řešící své kvalifikační práce.

Cíle projektu:

Analýza migračního chování nekrofágních ptáků významných v přenosu patogenních bakterií.

Zhodnocení potravních preferencí (podíl hematofágie) ptačích všenek. Studium krevních parazitů ektotermních tetrapodů - haemogregarin, krvinkovek a hemokokcií. Monitoring bakterií *Anaplasma phagocytophilum* a *Rickettsia* spp. u klíšťat. Detekce protilátek proti původcům vybraných zoonotických onemocnění u volně žijících bobrů evropských.

Popis a metodika řešení projektu:

Na vyšetřované ptáky v terénu byly instalovány telemetrické vysílačky typu OT-20 (GPS/GSM, Ornitela, Litva). Data o poloze sledovaných jedinců byla analyzována pomocí programu ArcGIS 10.1 (Esri) a jeho extenzí HRT a ARCMET. Detailně byly charakterizovány časoprostorové aktivity

sledovaných

ptáků

ve vztahu k potenciálnímu šíření významných kmenů *Escherichia coli* a dalších bakterií.

U všenek (4587 ex.) byla sledována přítomnost peří a krve v trávicím traktu. Byly zhodnoceny rozdíly ve výskytu daného typu potravy mezi jednotlivými rody všenek, mezi samci a samicemi a mezi dospělci a nymfami daných druhů. Na základě dat z terénních odchytů byla také hodnocena schopnost přežívání luptoušů a péřovek mimo tělo hostitele. Dále byl determinován starší materiál všenek papoušků chovaných v zájmových chovech. Byla připravena databáze morfometrických znaků luptoušů rodu *Trochiliphagus* z kolibříků a vybraných druhů luptoušů rodu *Myrsidea*. Byly zhotoveny detailní ilustrace vybraných druhů. Data budou použita pro redeskripci těchto parazitů. Při terénním odchytu v Argentině byl metodou fumigation chamber method v kombinaci s podrobnou prohlídkou těla nasbírána nový materiál ektoparazitů z volně žijících ptáků.

Přítomnost krevních parazitů a jejich morfologie byla sledována vyšetřením krevních nátěrů. Parazitémie byla stanovena pod imerzí při zvětšení 1000×. Nalezení paraziti byli dále charakterizováni a popsáni po morfologické stránce. DNA byla izolována komerčním kitem, kvantifikována a následně skladována při – 20°C. Specifické primery na potvrzení přítomnosti hemosporidií amplifikovaly přibližně 1200bp dlouhý úsek genu pro cytochrom b. Přečištěné PCR produkty byly následně sekvenovány servisně specializovanou laboratoří (Macrogen, Nizozemsko). Fylogenetické analýzy získaných sekvencí byly provedeny s využitím Maximum likelihood a Bayesian inference.

V ZOO Brno, Ostrava a Jihlava byla v průběhu roku 2024 v měsíčních intervalech od jara do podzimu sbírána klíšťata metodou vlnkování. Klíšťata byla druhově určena. U klíšťat byla k detekci *A. phagocytophilum* využita nested PCR s amplifikací genu *groEL* a k detekci *Rickettsia* spp. byly využity primery amplifikující gen *gltA*. V blízkosti skládky komunálního odpadu v Žabčicích byli v roce 2024 odchytáváni volně žijící hlodavci. U myšic rodu *Apodemus* sp. byla k druhovému určení zavedena a optimalizována metoda AP-PCR. Při vyšetřování bobrů evropských z ČR byly k detekci protilátek proti *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella* spp., *Brucella abortus*, *Chlamydomydia abortus*, *Coxiella burnetti*, *Francisella tularensis*, *Leptospira* spp. a virům Aujeszkyho choroby, hepatitidy E, klíšťové encefalitidy a západonilské horečky použity komerčně vyráběné ELISA a aglutinační testy.

Dosažené výsledky projektu:

V návaznosti na dřívější nálezy patogenních bakterií u nekrofágních luňáků byla detailně analyzována časoprostorová migrační aktivita luňáků červených (*Milvus milvus*) pocházejících ze střední Evropy (Česko, Slovensko, Rakousko). Pomocí analýzy dat získaných z 19 telemetricky sledovaných jedinců byly dokumentovány migrační cesty ze střední Evropy na zimoviště v jižní Itálii a zpět. Byla odhalena unikátní tahová smyčka kolem Jaderského moře konzistentní se směrem převládajících větrů v této oblasti. Na podzim ptáci využívají kratší cestu přes Jaderské moře usnadněnou jihozápadním větry. Na jaře putují kontinentální cestou podél Jaderského moře na severovýchod.

Zatímco všenyk péřovky se striktně specializují na konzumaci peří, u 36 % vyšetřených luptoušů 14 rodů byla zaznamenána také hematofágie. U některých rodů je konzumace krve pouze příležitostná (*Amysidea*, *Austromenopon*, *Ciconiphilus*), jiné rody jsou téměř výlučně hematofágní (*Ricinus*, *Trochiliphagus*, *Trochiloecetes*). U některých rodů byly zjištěny i významné mezidruhové rozdíly. Hematofágie má zřejmě vliv na hostitelskou specifitu, hematofágní druhy mívají poměrně široké spektrum hostitelů, zatímco druhy živící se peřím jsou známy pouze z 1–2 hostitelů. Konzumace krve je častější u samic než u samců, u věkových kategorie byla krev pozorována častěji u nymf než u dospělců. Potrava má jako jeden z faktorů vliv také na rozdílné přežívání luptoušů a péřovek mimo hostitele. Zatímco luptouši přežívali maximálně 1–2 dny mimo hostitele, péřovky přežívaly 4–8 dní.

Bylo doplněno několik záznamů výskytu pěřovek rodu *Neopsittaconirmus* v chovech andulek vlnkovaných a korel chocholatých v Anglii, Austrálii, Brazílii, USA a na Réunionu. Byla připravena databáze 143 morfometrických znaků luptoušů rodu *Trochiliphagus* z kolibříků a s jejím využitím bylo zhodnoceno 162 luptoušů ze 48 druhů kolibříků. Pro rod *Myrsidea* byla připravena databáze 110 morfometrických znaků, které byly použity pro redescipci druhů *M. aegithali*, *M. flavida* a *M. franciscoi*.

Při terénním odchytu ptáků v Argentině bylo vyšetřeno celkem 101 ptáků 24 druhů. Celkem bylo nasbíráno 651 všenek 10 rodů (Amblycera: Menoponidae - *Machaerilaemus*, *Menacanthus*, *Myrsidea*; Ricinidae - *Ricinus*, *Trochiloecetes* a Ischnocera: Philopteridae: *Brueelia*, *Guimaraesiella*, *Rallicola*, *Sturnidoecus*, *Tyranniphilopterus*).

Byly nalezeny krvinkovky (Haemosporidia) v australských scincích *Egernia stokesii*, přičemž bylo provedeno rozsáhlé šetření a nalezena neshoda mezi morfologickou taxonomií a genetickými daty. Námi nalezení paraziti morfologicky odpovídají zástupcům rodu *Plasmodium*, konkrétně *P. mackerrasae*, ale genetická data je řadí do rodu *Haemocystidium*.

V průběhu roku 2024 bylo ve třech zoologických zahradách posbíráno metodou vlnkování celkem 1327 klíšťat (598 klíšťat v zoo Ostrava, 487 klíšťat v zoo Jihlava a 242 klíšťat v zoo Brno). Ve všech případech se jednalo o druh *Ixodes ricinus*. Byla izolovaná DNA ze všech klíšťat. Z prozatímních výsledků je patrné, že klíšťata v zoologických zahradách jsou vektory *Rickettsia* spp. (13 %) a *A. phagocytophilum* (0,8 %). V okolí skládky komunálního odpadu Žabčice bylo odchyceno 20 volně žijících hlodavců 5 druhů (*Apodemus sylvaticus*, *Apodemus uralensis*, *Crocidura suaveolens*, *Microtus arvalis*, *Sorex araneus*), u nichž byla provedena pitva k odběru tkání k následnému průkazu vybraných patogenů. Byla zavedena a optimalizována metoda AP-PCR (primer E8S) k rozlišování druhů rodu *Apodemus*. U volně žijících bobrů (n=76) byly detekovány protilátky proti *T. gondii* (18 %), *N. caninum* (8 %), *Leptospira* spp. (4 %), *F. tularensis* (3 %) a viru hepatitidy E (3 %). Protilátky proti dalším 7 agens nebyly prokázány.

Přínos projektu:

Byla odhalena migrační strategie luňáků červených ze střední Evropy. Byly významně rozšířeny znalosti o potravě všenek, zejména ve vztahu k jejich hematofágii, a o významu hematofágie pro druhovou specifitu všenek. Projekt také přispěl k rozšíření znalostí o krevních parazitických jednobuněčných eukaryotech volně žijících plazů. Byly rozšířeny znalosti o výskytu klíšťat a jimi přenášených patogenů v zoologických zahradách. Byla provedena prioritní epizootologická studie analyzující výskyt patogenů se zoonotickým potenciálem u volně žijících bobrů evropských v ČR.

Využití výsledků:

Výsledky studie budou publikovány ve vědeckých zahraničních časopisech s impakt faktorem. Výsledky budou prezentovány na mezinárodních konferencích. Genomová data budou vložena do veřejné databáze GenBank. Výsledky budou využity v doktorských pracích studentů DSP participujících na projektu.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

ŠKRÁBAL, J., RAAB, R., LITERÁK, I. Central-European Red Kites *Milvus milvus* perform a unique loop migration over the Adriatic Sea. *Ardeola*, 2025, vol. 72, no. 1, p. 151–162. <https://doi.org/10.13157/arla.72.1.2025.sc1>

IF 1.4 (2023)

ZECHMEISTEROVÁ, K., GARDNER, M.G., ŠIROKÝ, P. Unresolved haemosporidia of the Australian skink, *Egernia stokesii*. *Parasitology Research*, 2024, vol. 123, article number 206. <https://doi.org/10.1007/s00436-024-08230-0>

IF 1.8 (2023)

Přijato k uvěřejnění:

KOLENČIK, S., LOAIZA-MUÑOZ, M.A., LONDONO, G.A., ALLEN, J.M., PLSKOVA, K., SYCHRA, O. Understanding the life history characteristics of bird lice: *Amblycera* versus *Ischnocera*. *Ecological Entomology*.

IF 2 (2023)

ONIKI-WILLIS, Y., SYCHRA, O., PALMA, R.L. Additional records of *Neopsittaconirmus* lice (Insecta: Phthiraptera: Ischnocera) parasitizing captive parrots. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*.

IF 1,2 (2023)

Zasláno do redakce:

SEDLÁK, K., VODIČKA, R., BÁRTOVÁ, E., BUDÍKOVÁ, M., VOREL, A. Monitoring of antibodies to 12 infectious agents in free-ranging Eurasian Beaver (*Castor fiber* L.) from the Czech Republic (sdílená dedikace VaVMŽP ČR SP/2D4/52/07B, VETUNI ITA 2024ITA23).

Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports

Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	895 760	895 760
Služby	220 000	258 644,52
Cestovné	140 000	101 006,79
Další provozní náklady	268 336	268 684,69
Doplňkové náklady	228 615	228 615
Celkem	1 752 711	1 752 711

Zdůvodnění nákladů:**Osobní náklady:**

Osobní náklady zahrnovaly odměny řešitelům a stipendia studentů DSP, kteří se podíleli na řešení projektu.

Služby:

Konferenční poplatky KMINE (Pavelková, Kozlíková), Pečenkovy dny (Pavelková, Kozlíková), sekvenování Macrogen, revize AJ textů, zveřejnění publikace v JRR (Literák, Rozsypalová), licence Geneious (Papoušek).

Cestovné:

Domácí SC (Bártová, Literák, Široký), ZSC Literák (Kazachstán, Maroko, Slovensko), ZSC Sychra (Argentina).

Další provozní náklady:

Laboratorní plasty (stripy zkumavek, víčka, eppendorf zkumavky, kryokrabičky, špičky), laboratorní chemikálie (Master Mixy, DNeasy blood kit, EliDNA Assay Kit, proteináza, Tissue Genomic DNA Mini Kit, Gel PCR DNA Fragments Extraction Kit, laddery, primery), teflonová páska Ornitela, tonery, tiskárna.

Doplňkové náklady:

Pokrývaly režijní náklady ve výši 15 %.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě doložte výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2022 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude odkazovat na podporu ITA VETUNI. Výhradní odkaz na projekt ITA VETUNI (bez odkazů na podporu z dalších grantů, projektů a jim obdobných finančních zdrojů) musí obsahovat vždy nejméně jedna publikace s impakt faktorem na každých 1,5 milionu korun způsobilých nákladů projektu, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis 6.1.2025 prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.

řešitele projektu:

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2022 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis 6.1.2025 prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.

člena řešitelského týmu **odpovědného za čerpání prostředků:**

Přednosta ústavu nebo kliniky, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu nebo klinice, respektive celoškolském pracovišti, které řídí.

Datum, jméno a podpis 6.1.2025 prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.

přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Datum, jméno a podpis 6.1.2025 Ing. Josef Kupčík

správce rozpočtu:

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis 6.1.2025 doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2024

Identifikační číslo projektu: 2024ITA24

Název projektu: Zoologická medicína: zdravotní problematika evropské fauny

Řešitel projektu: prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D., dipl. ECZM

Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel

Fakulta veterinární hygieny a ekologie

E-mail: pikulaj@vfu.cz

Telefon: +420 541 562 655

Zástupce řešitele: prof. MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D.

Řešitelský kolektiv:

složení řešitelského týmu: (akademičtí pracovníci a jejich příslušnost k ústavům nebo klinikám fakulty nebo výzkumným skupinám CEITEC, studenti DSP) a forma zapojení každého člena řešitelského týmu

Akademičtí pracovníci Ústavu ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel

Mgr. Vojtech Baláž, Ph.D.	FVHE, 2190, AP 0.5
Mgr. Alena Balážová, Ph.D.	FVHE, 2190, AP 0.5
doc. MVDr. Hana Bandouchová, Ph.D., dipl. ECZM	FVHE, 2190, AP 1.0
prof. RNDr. Miroslava Beklová, CSc.	FVHE, 2190, AP 1.0
Mgr. Barbora Havelková, Ph.D.	FVHE, 2190, AP 1.0
MVDr. Ivana Mikulíková, Ph.D.	FVHE, 2190, AP 0.5+0,09 NAZV
MVDr. Hana Minářová, Ph.D.	FVHE, 2190, AP 0.5+0,09 NAZV
Mgr. Monika Němcová, Ph.D.	FVHE, 2190, AP 1.0
doc. MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D.	FVHE, 2190, AP 1.0
MVDr. Ivana Papežíková, Ph.D.	FVHE, 2190, AP 1.0
MVDr. Vladimír Piaček, Ph.D.	FVHE, 2190, AP 1.0
prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D., dipl. ECZM	FVHE, 2190, AP 1.0
Ing. Jana Sedláčková, Ph.D.	FVHE, 2190, AP 1.0
Ing. František Vitula, Ph.D.	FVHE, 2190, AP 1.0

Studenti DSP Ústavu ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel

Mgr. Ivona Toulová DSP VETUNI, prezenční forma, 3. roč.

Mgr. Veronika Vévodová (Turánková) DSP VETUNI, prezenční forma, 1. roč.

V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu:

Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Řešení projektu navazuje na dlouhodobé výzkumné aktivity Ústavu ekologie a chorob zoonozivních zvířat, zvěře, ryb a včel. Dílčí cíle jsou v souladu s prioritami výzkumu na VETUNI (choroby volně žijících zvířat, problematika infekčních onemocnění a nálezů zoonozivních zvířat, působení stresorů a toxinů na zvířata).

Cíle projektu:

Projekt má sedm hlavních výzkumných cílů: 1) Reakce netopýřích buněk na expozici patogenům, 2) Kombinované účinky neonikotinoidů na vývoj a reprodukci vodních organismů, 3) Experimentální challenge model s *Edwardsiella tarda* u sumečka afrického (*Clarias gariepinus*), 4) Zdravotní stav, hematologický, biochemický a imunitní profil invazních druhů sumečků rodu *Ameiurus*, 5) Zdravotní situace a odolnost populací užovky stromové v ČR, 6) Modulace složení střevního mikrobiomu ježků v záchranných stanicích a 7) Výskyt filárií u ptáků chovaných v zoo a v záchranných centrech. Společným cílem dílčích výzkumných úkolů je rozvoj zoologické medicíny se zaměřením na zdravotní problematiku evropské fauny, s přesahem do ochrany životního prostředí, ohrožených obratlovců a veřejného zdraví.

Popis a metodika řešení projektu:

1) Reakce netopýřích buněk na expozici patogenům

Na buněčných kulturách fibroblastů a makrofágů netopýra velkého (*Myotis myotis*) byla pomocí komerčně dostupných kitů za simulace teplotních podmínek hibernace (8 °C) a eutermie (36 °C) sledována míra buněk podléhajících buněčné smrti v důsledku expozice antigenům, a sice komerčně získaného lipopolysacharidu a homogenátu kultury plísně *Pseudogymnoascus destructans*. Dále byla stanovena míra vznikajících reaktivních kyslíkových forem jako jedna z možností poškození patogenního agens a signalizace jeho přítomnosti. Po pre-expozici a/nebo expozici antigenům po dobu 24-(24)-24 hodin byla také izolovaná celková RNA z exponovaných buněk, která byla následně podrobena qRT-PCR. Pomocí výpočtu metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livakova metoda) byla stanovena up-/down-regulace imunitních genů kódujících tvorbu vybraných cytokinů.

2) Kombinované účinky neonikotinoidů na vývoj a reprodukci vodních organismů

V roce 2024 jsme pokračovali ve studiu neonikotinoidů a jejich vlivu na reprodukci perloočky *Daphnia magna*. Pro hodnocení chronické toxicity neonikotinoidového insekticidu thiaclopridu bylo využito testu dle OECD 211 – Test reprodukce *Daphnia magna*. Při řešení projektu bylo postupováno podle standardních metodických postupů pro testy na organismech vodního prostředí (vodní korýš – perloočka *Daphnia magna*).

Perloočky byly vystaveny po dobu 21 dní účinku různých koncentrací testované látky rozpuštěné v ředící vodě. Současně byly testovací organismy nasazeny do ředící vody bez testované látky (kontrola). V intervalu 24 hodin byl sledován stav perlooček, v jednotlivých koncentracích a kontrole byl zaznamenán počet uhynulých, resp. imobilizovaných jedinců. Současně byli spočítáni a odloveni

nově narození jedinci. Na konci testu byl vyhodnocen celkový počet potomstva vyprodukovaného každým, na konci testu žijícím rodičovským jedincem. Potomstvo jedinců, kteří v průběhu testu uhynuli, nebylo započteno.

3) Experimentální challenge model s *Edwardsiella tarda* u sumečka afrického (*Clarias gariepinus*)

Ryby byly infikovány prostřednictvím imerzní koupele a intraperitoneální injekční aplikací bakteriemi *Edwardsiella tarda*.

Experiment probíhal ve třech fázích v akváriích s nainstalovanými vnitřními filtry a s topítky udržujícími teplotu 26 ± 2 °C. Před vlastními pokusy byly ryby 3 dny aklimatizovány.

1. Ryby byly rozděleny do 5 skupin po 10 kusech, tři skupiny byly infikovány imerzní koupelí po dobu jedné hodiny o koncentracích *E. tarda* 10^6 ml/l, 10^7 ml/l a 10^8 ml/l, dvě skupiny byly infikovány i.p. aplikací o koncentracích *E. tarda* 10^4 a 10^5 CFU/ml. Pokus byl ukončen za 10 dnů od infekce.

2. Ryby byly rozděleny do 5 skupin po 10 kusech. Tři skupiny byly infikovány imerzní koupelí o koncentracích *E. tarda* 10^6 ml/l, 10^7 ml/l a 10^8 ml/l, dvě skupiny byly kontrolní. Pokus byl ukončen za 10 dnů od infekce.

3. Ryby byly rozděleny do 5 skupin po 10 kusech. Dvě skupiny byly infikovány imerzní koupelí po dobu jedné hodiny o koncentracích *E. tarda* 10^8 ml/l po dobu jedné nebo dvou hodin, další dvě skupiny byly infikovány imerzní koupelí o koncentracích *E. tarda* 2×10^8 ml/l po dobu jedné nebo dvou hodin, a poslední skupina byla kontrolní. Pokus probíhal v duplikátech. Pokus byl ukončen za 10 dnů od infekce.

Každá uhynulá ryba byla vyšetřena a byla provedena kultivace pro ověření přítomnosti *E. tarda*. V rámci ukončení třetího pokusu byly ryby po usmrcení změřeny a zváženy, dále byla rybám odebrána krev na základní hematologické a imunologické vyšetření (hematokrit, celkový počet červených a bílých krvinek, fagocytární aktivita periferních fagocytů a titr specifických protilátek).

4) Zdravotní stav, hematologický, biochemický a imunitní profil invazních druhů sumečků rodu *Ameiurus*

Pro analýzu hematologických parametrů a zdravotního stavu ryb bylo získáno celkem 51ks sumečka černého (*Ameiurus melas*) a 41 kusů sumečka amerického (*Ameiurus nebulosus*) ze tří lokalit: rybníky v Kroměříži, Vehlovicích a z Mlázických tůní v období květen–červen. Ryby byly omráčeny, byla jim odebrána krev z ocasních cév a poté byly usmrceny a podrobeny patologicko-anatomickému a parazitologickému vyšetření. Krev od 13 jedinců ryb byla bezprostředně po odběru vyšetřena pomocí přístroje i-Stat. Zbylá krev byla zpracována dle standardních hematologických metodik.

5) Zdravotní situace a odolnost populací užovky stromové v ČR

V České republice je užovka stromová kriticky ohrožený druh, který se vyskytuje v 5 geograficky izolovaných populacích: 2 v Čechách (Poohří, okolí soutoku Vltavy a Sázavy) a 3 na Moravě (NP Podyjí, CHKO Bílé Karpaty, Dubňany u Hodonína). V posledních letech byla u užovky stromové potvrzena přítomnost případů ophidiomykózy – v Česku (Poohří), Španělsku, Švýcarsku, Rakousku a na Slovensku. Historicky je zdokumentovaná epidemie onemocnění neznámého původu z Poohří z roku 1985

a je možné, že se jedná o kontinuální vystavení populace patogennímu tlaku. O situaci u ostatních populací nejsou dosud informace. Cílem výzkumu bylo získání vzorků pro detekci plazích patogenů a pokus o kultivaci buněčných linií. Sběr vzorků probíhal primárně formou odběru bukalních a kožních

stěrů, a také byly odebírány vzorky měkkých tkání z nalezených kadáverů a nalezené exuvie. V rámci spolupráce s kolegy na UPOL Olomouc se povedlo získat vzorky ze všech českých populací a na základě výjimky z NP Podyjí byl jeden jedinec zpracovaný na kultivační pokusy (VETUNI) a odběry tkání

k celogenomovému sekvenování (na UPOL). Celkově jsme získali 121 tkáňových a stěrových vzorků z 81 jedinců ze všech českých populací a jednotlivé srovnávací vzorky z Rakouska a Slovenska. Soubor vzorků byl doplněn o 43 exuvií. DNA byla z tkání a bukálních stěrů izolována pomocí kitu a byly primárně využity pro genetické analýzy na UPOL a poté předány k detekci ranavirů na VETUNI. Vzorky kožních stěrů a exuvií byly přímo zpracovávány na VETUNI. Extrakce DNA byla provedena pomocí izolačního činidla PrepMan Ultra. Detekce jsou prováděny pomocí qPCR podle zavedených metodik na ranaviry (Leung et al., 2017), *Ophidiomyces* (Bohuski et al., 2015) a byla testována nová metoda na detekci *Paranannizziopsis* (Lorch et al., 2023).

Bohuski, E., J. M. Lorch, K. M. Griffin, and D. S. Blehert. 2015. TaqMan real-time polymerase chain reaction for detection of *Ophidiomyces ophiodiicola*, the fungus associated with snake fungal disease. *BMC Veterinary Research* 11.

Leung, W. T. M., L. Thomas-Walters, T. W. J. Garner, F. Balloux, C. Durrant, and S. J. Price. 2017. A quantitative-PCR based method to estimate ranavirus viral load following normalisation by reference to an ultraconserved vertebrate target. *Journal of Virological Methods* 249:147-155.

Lorch, J., M. Winzeler, J. Lankton, S. Raverty, H. Snyman, H. Schwantje, C. Thacker, S. Knowles, H. Cai, and D. Gear. 2023. *Paranannizziopsis* spp. associated with skin lesions in wild snakes in North America and development of a real-time PCR assay for rapid detection of the fungus in clinical samples. *bioRxiv*, 2023, 2023.07. 13.548879.

6) Modulace složení střevního mikrobiomu ježků v záchranných stanicích

Mikrobiota střeva představuje významný faktor v rámci regulace funkcí organismu a udržování homeostázy. Mechanismy, které vedou ke změnám mikrobiomu, a následně k narušení regulačních procesů ve střevě i v rámci celého organismu, jsou v současnosti v centru zájmu. Jedním z významných faktorů v rámci změny složení střevního mikrobiomu je stres (Yan et al., 2021). Příčin přijetí ježků

do záchranných stanic pro handicapované živočichy je celá řada, nicméně působení stresu představuje následně všeobecný problém bez ohledu na primární příčinu hospitalizace. Stres může významným způsobem ovlivnit výsledek snahy o záchranu jedince, a to i prostřednictvím ovlivnění trávení, metabolických funkcí a narušení celistvosti bariéry střeva s následným systemickým pronikáním mikroorganismů a rozvojem sepse (Ghosh et al., 2021). Jednou z možností modulace složení a funkce střevního mikrobiomu je aplikace probiotických přípravků (Wang et al., 2021). V rámci ochrany volně žijících druhů živočichů se jedná o vysoce aktuální a dosud velmi málo prostudované téma (Trevelline et al., 2019).

V rámci standardní péče o handicapované ježky západní v záchranné stanici byla u vybrané skupiny mláďat s nízkou hmotností před hibernací zavedena aplikace probiotického preparátu pro malé savce a po týdenní aplikaci byly odebrány vzorky čerstvého trusu na analýzu složení mikrobiomu. Jako kontrolní skupina budou použiti standardně krmení jedinci ze stejné věkové kategorie držení ve stejných podmínkách. Celkem bylo do skupiny s aplikací probiotik zařazeno 15 jedinců a stejný počet zvířat byl zařazen do skupiny kontrolní. V průběhu aplikace probiotik bylo u části zvířat nutné aplikovat antibiotika. Tito jedinci byli ze studie vyřazeni. Celkem bylo ve studii ponecháno 8 jedinců v kontrolní skupině a 7 jedinců v probiotické skupině. Změny ve složení střevního mikrobiomu byly

analyzovány pomocí sekvenování třetí generace (Minion, Oxford Nanopore, UK). Metagenomická analýza byla provedena na základě sekvenace ampikonu genu pro 16S rRNA.

Yan D, Hu D, Li K, et al. (2021). Effects of Chronic Stress on the Fecal Microbiome of Malayan Pangolins (*Manis javanica*) Rescued from the Illegal Wildlife Trade. *Curr Microbiol*, 78: 1017-1025.

Ghosh S, Whitley CS, Haribabu B, Jala VR (2021). Regulation of Intestinal Barrier Function by Microbial Metabolites. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 11(5): 1463-1482.

Wang X, Zhang P, Zhang X (2021). Probiotics Regulate Gut Microbiota: An Effective Method to Improve Immunity. *Molecules*, 26(19): 6076.

Trevelline BK, Fontaine SS, Hartup BK, Kohl KD (2019). Conservation biology needs a microbial renaissance: a call for the consideration of host-associated microbiota in wildlife management practices. *Proc. R. Soc. B*, 286: 20182448.

7) Výskyt filárií u ptáků chovaných v zoo a v záchraných centrech

Hlístice Filarioidea jsou původci onemocnění široké škály hostitelů včetně ptáků. Je obecně známo, že životní cyklus těchto parazitů zahrnuje definitivního hostitele (obratlovce) a mezihostitele (hematofágního ektoparazita), který zajišťuje přenos larev tzv. mikrofilárií. U ptáků parazitují dospělí červi filárií ve tkáních a/nebo v orgánových dutinách a mikrofilárie se vyskytují v krevním řečišti nebo kůži (Jones, 2013). Přesto, že jsou filárie obecně považovány za nepatogenní, u ptáků byly popsány případy (např. *Splendidofilaria caperata* u *Corvus brachyrhynchos*; Atkinson et al., 2008), kdy došlo v důsledku infekce mikrofiláriemi k úhynu zvířete. Mimo tyto záznamy je problematika výskytu filárií u ptáků nepříliš prozkoumána a molekulární data ptačích parazitů nadčeledi Filarioidea značně chybí (Garrido-Bautista et al., 2023).

V rámci tohoto dílčího cíle jsme se zaměřili na vývoj vlastní metody molekulární detekce filárií v krvi a tkáních obratlovců s následným využitím pro screening vzorků ptáků. Za účelem zisku polymerázové řetězové reakce s vyšší citlivostí a možností zachytu filariální DNA jsme modifikovali metodu PCR využívající univerzální primery COIntF a COIntR dříve popsanou Casiraghi et al. (2001). Námi navržené primery a protokol nested-PCR vyžadovaly optimalizační testování, aby se zajistilo, že test je dostatečně citlivý a specifický pro požadovaný cíl. Optimalizace a kontrolní analýzy byly provedeny za využití vzorků DNA izolovaných z *Dirofilaria repens*, *Dirofilaria immitis*, *Thelazia callipaeda*, *Setaria equina* a *Litomosa* sp.

Validovaná metoda byla následně využita pro molekulární detekci filárií v krvi ptáků. Krev byla odebrána ptákům v záchraných stanicích (ZS pro dravé ptáky Rajhrad, ZS Jinačovice) a zoologické zahradě (Zoo Brno) v rámci klinické veterinární činnosti. Po nested-PCR analýze a elektroforetické separaci PCR produktů následovalo komerční Sangerovo sekvenování a poté úprava získaných sekvencí pomocí Geneious Prime a porovnání se sekvencemi dostupnými v GenBank a prostřednictvím MegaBLAST. Sekvence byly poté podrobeny fylogenetické analýze a byl zkonstruován fylogenetický strom.

Atkinson CT, Thomas NJ, Hunter DB. Parasitic Diseases of Wild Birds. Wiley-Blackwell, Ames, 2008, 439-462.

Casiraghi M, et al. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: Comparison with the phylogeny of Wolbachia endosymbionts. *Parasitology*, 2001, 122(1): 93-103.

Garrido-Bautista J, Harl J, Fuehrer HP, Comas M, Smith S, Penn DJ, Moreno-Rueda G. Prevalence, Molecular Characterization, and Ecological Associations of Filarioid Helminths in a Wild Population of Blue Tits (*Cyanistes caeruleus*). *Diversity*, 2023, 15(5): 609.

Jones MP. Vascular Diseases in Birds of Prey. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 2013, 22(4): 348-357.

Dosažené výsledky

1) Reakce netopýřích buněk na expozici patogenům

Buňky hostitele reagují na přítomnost patogenního agens několika způsoby. Sledovali jsme významně zvýšené množství enzymu laktát dehydrogenázy unikajícího skrze poškozenou membránu mrtvých buněk v kulturách exponovaných antigenům. K významné ztrátě buněk vlivem antigenů docházelo častěji u fibroblastů než u makrofágů. Makrofágy naopak více reagovaly na teplotní podmínky, kdy přirozená ztráta buněk (neošetřená kontrolní kultura) byla významně vyšší v teplotě 36 °C ve srovnání s teplotou 8 °C, u fibroblastů byl vliv teploty zaznamenán pouze v kombinaci s působícími antigeny. Shodný vzorec odpovědi byl zaznamenán u hladiny vznikajících reaktivních forem kyslíku (ROS), tedy častější významné zvýšení hladiny ROS a vliv teploty na produkci ROS pouze při spolupůsobení antigenů u fibroblastů, a naopak jistá míra odolnosti vůči nadprodukci ROS a vliv teploty na fyziologickou produkci ROS u makrofágů. Shodně u obou kultur však byla prokázána obecně nízká odpověď buněk na působící antigeny, prostřednictvím produkce ROS a buněčné smrti, při teplotě simulující hibernaci, tedy 8 °C. Pomocí qRT-PCR jsme také sledovali relativní množství imunitních genů IFIH1, IL6, NFkB, IRF3, IFN ω , IFN β , IFI6, IL12a, IL8, IL23. U fibroblastů jsme z jmenovaných detekovali přítomnost IFIH1, NFkB, IFN ω , IL12a, IL8 a IL23. Ačkoliv u fibroblastů nebyla prokázána přítomnost IFN β , IL6, IFI6 a IRF3, je zřejmé, že také fibroblasty se mohou podílet na nespecifické imunitní odpovědi tvorbou cytokinů. Reakce buněk prostřednictvím regulace genů exprimujících cytokiny je u makrofágů a fibroblastů rozdílná. Dle výsledků se jeví, že makrofágy jsou v produkci cytokinů aktivnější při teplotě 36 °C, fibroblasty naopak při 8 °C. Dominantním cytokinem v kultuře fibroblastů je IL23 u makrofágů pak IFN ω . Univerzální odpovědí obou typů buněk je však extrémně zvýšená produkce právě IL23 a IFN ω a také IFN β 24 hodin po opakované expozici (tedy pre-expozice → promytí → expozice), kdy výše jmenované násobně převyšují odezvu ostatních genů, a to i v případě teplotních podmínek hibernace, kdy u makrofágů nedochází ke změně v regulaci žádného dalšího sledovaného genu.

2) Kombinované účinky neonikotinoidů na vývoj a reprodukci vodních organismů

Zaměřili jsme se na sledování chronické toxicity neonikotinoidového insekticidů thiaclopridu na perloočku *Daphnia magna*, která je přirozenou složkou potravy pro vodní bezobratlé organismy.

Podobně jako u akutních testů jsme vycházeli z environmentálních koncentrací testované látky. Koncentrace 0,0001-10 $\mu\text{g/l}$ byly zvoleny podle nejvyšších koncentrací v životním prostředí naměřených ve vodních útvech sousedících se zemědělským polem. Test vyhověl kritériu platnosti testu přežití kontrol $\geq 80\%$ a reprodukci > 60 potomků na samici *D. magna* (přežití 90 % na konci testu, průměrná kontrolní reprodukce 63 ± 2 potomků). Z výsledků našich experimentů vyplývá, že testovaný insekticid v koncentracích, jejichž hodnoty odpovídají koncentracím detekovaným v přírodním prostředí, nevykazuje chronickou toxicitu pro perloočky ($21\text{dEC}_{50} > 10 \mu\text{g/l}$) a nebyl ani prokázán statisticky významný vliv na reprodukci oproti kontrole, což neodpovídá námi předpokládaným výsledkům. Nesrovnalosti mezi výsledky testů a studiemi mohou být způsobeny mnoha faktory, jako jsou testovací podmínky (teplota a/nebo potrava, které se mohou lišit dle metodiky), stav chovu a druh testovacího organismu. Laboratorní podmínky jsou voleny tak, aby se blížily optimálním preferencím organismů (optimální teplota a světlo, neomezené potravní podmínky, žádná konkurence nebo predace), zatímco v přírodních podmínkách mohou organismy čelit spíše nepříznivému prostředí s mnoha stresovými faktory, ať už přirozenými (vnitrodruhové a mezidruhové kompetice, predace, zvyšující se teplota) nebo antropickými (chemické kontaminace). Abychom vyvodili věrohodné závěry, měla by být dále prozkoumána opožděná mortalita vyvolaná vybraným neonikotinoidem na dafniích. Zkoumání delších expozic s vyšším počtem replikací a testovacích organismů může odhalit, že expozice neonikotinoidy při nízkých koncentracích v životním prostředí mají významný negativní vliv na přežití dafnií. Výsledky naší studie ukázaly, že stanovení potenciálního vlivu thiaclopridu na

populace
je obtížné.

dafnií

3) Experimentální challenge model s *Edwardsiella tarda* u sumečka afrického (*Clarias gariepinus*)

Při prvním pokusu jsme zjistili, že použití imerzní koupele se jeví jako dostatečné a není potřeba injekční aplikace, a proto jsme dále používali pouze imerzní koupel.

U druhého a třetího pokusu jsme vyzkoušeli infikovat keříčkovce jen pomocí imerzní koupele. První klinické příznaky (apatie ryb) se objevily již 3. den ve skupině s nejvyšší koncentrací. Tři kusy ryb z této koncentrace vykazující klinické příznaky byly usmrceny a byla provedena kultivace z hlavové ledviny potvrzena přítomnost *E. tarda*.

Celkově jsme zjistili, že keříčkovci jsou velmi odolné ryby, k vyvolání onemocnění je potřeba vysokých koncentrací patogena a i přes to dojde po několika dnech k vymizení klinických příznaků a mortalita je zanedbatelná. Nicméně jsme schopni ryby nakazit imerzní koupelí s protilátkovou odpovědí, nejvyšší titry specifických protilátek byly naměřeny v nejvyšší koncentraci patogenního agens v imerzi (Tabulka 1). Výsledky budou podrobeny statistické analýze. Dalším problémem je kanibalismus, který se u ryb projevuje, pokud jsou chovány v nižší hustotě obsádky a jsou zdravé.

Výsledky hematologického a imunologického vyšetření (průměr ± SD). SD= směrodatná odchylka, CL=chemiluminiscence, RLU=relativní luminiscenční jednotka

	Hematokrit (l/l)	Erytrocyty (T/l)	Leukocyty (G/l)	Integrál CL (RLU.sec)	specifické xL (absorbance při 450nm)
kontrola	0,24 ± 0,02	1,49 ± 0,15	74,6 ± 22,8	20415 ± 13946	0,53 ± 0,30
10 ⁸ ml/l 1h	0,24 ± 0,01	1,38 ± 0,20	73,4 ± 12,1	17119 ± 28688	1,29 ± 0,36
10 ⁸ ml/l 2h	0,23 ± 0,02	1,45 ± 0,18	63,5 ± 17,0	4407 ± 3809	1,24 ± 0,28
2x10 ⁸ ml/l 1h	0,23 ± 0,03	1,40 ± 0,24	66,9 ± 14,4	5709 ± 3304	1,12 ± 0,32
2x10 ⁸ ml/l 2h	0,21 ± 0,02	1,34 ± 0,16	54,9 ± 15,3	23251 ± 21485	1,69 ± 0,29

4) Zdravotní stav, hematologický, biochemický a imunitní profil invazních druhů sumečků rodu *Ameiurus*

Výsledky hematologického vyšetření přístrojem i-Stat (průměr ± SD)

	pCO ₂	pH	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	n
<i>A. nebulosus</i>	6,2 ± 1,3	7,4 ± 0,1	102,5 ± 3,8	2,2 ± 0,2	94,8 ± 2,9	6
<i>A. melas</i>	5,3 ± 0,7	7,5 ± 0,1	106,0 ± 5,9	2,0 ± 0,2	96,7 ± 5,5	7

Výsledky hematologického a imunologického vyšetření (průměr ± SD). SD= směrodatná odchylka, CL=chemiluminiscence, RLU=relativní luminiscenční jednotka

	Hematokrit (l/l)	Hemoglobin (g/l)	Erytrocyty (T/l)	Leukocyty (G/l)	Integrál CL (RLU.sec)	n
<i>A. nebulosus</i>	0,29 ± 0,04 ^B	85,2 ± 15,9 ^B	1,24 ± 0,24	62,2 ± 35,6 ^b	144064±70883 ^A	35
<i>A. melas</i>	0,22 ± 0,04 ^A	64,9 ± 11,7 ^A	1,10 ± 0,23	45,6 ± 20,5 ^a	266736±86021 ^B	44

Dosavadní výsledky prokázaly signifikantní rozdíl mezi sledovanými druhy sumecků v hodnotách hematokritu, koncentraci hemoglobinu a celkových počtech leukocytů.

5) Zdravotní situace a odolnost populací užovky stromové v ČR

V rámci vzorkování nebyly zaznamenány případy akutně nemocných hadů s významnými lézemi, ale na úrovni jednotlivých šupin byly záchyty podezřelé ze subklinické ophidiomykózy. Hadi s drobnými lézemi byli pozorováni v nově objevené populaci v ptačím parku Kosteliska u Dubňan, v Bílých Karpatech a Podyjí. Všechny získané vzorky byly izolovány a průběžně probíhají analýzy přítomnosti ranavirů, *Ophidiomyces* a *Paranannizziopsis*. Na základě neúplných výsledků se zdá, že se potvrzuje negativní status na ophidiomykózu u populace v Podyjí a pozitivita v Poohří. Do laboratorních

prací i asistence v terénu byl zapojen student programu Welfare Kristián Vondra, který na tématu bude pokračovat i v r. 2025. V červenci byl proveden pokus o vytvoření sady imortalizovaných buněčných linií z vnitřních orgánů dospělé samice užovky stromové z NP Podyjí. Buněčné kultury se nepovedlo udržet.

6) Modulace složení střevního mikrobiomu ježků v záchranných stanicích

Relativní abundance bakteriálních taxonů na úrovni řádu ukazuje posun v zastoupení jednotlivých řádů. U probiotické skupiny došlo k nárůstu zastoupení Bacteroidales, Lactobacillales a Bifidobacteriales a k poklesu Clostridiales. V rámci analýzy byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl mezi alfadiverzitou u kontrolních jedinců a zvířat, kterým byla podávána probiotika. U skupiny s probiotiky byla diverzita vyšší než u kontrolní skupiny. Rovněž u analýzy betadiverzity byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl mezi skupinou s aplikací probiotik a kontrolní skupinou (PERMANOVA, $p = 0,02$). Statisticky průkazně došlo u probiotické skupiny v porovnání s kontrolní skupinou k poklesu zastoupení bakterií řádu Clostridiales a současně došlo k nárůstu bakterií řádu Bacteroidales a Bifidobacteriales.

V rámci studie byl v porovnání s kontrolními zvířaty zjištěn posun v zastoupení bakteriálních taxonů ve střevním obsahu u ježků, kterým byl po dobu jednoho týdne podáván probiotický preparát. Došlo k průkaznému snížení zastoupení řádu Clostridiales a k nárůstu relativní abundance Bacteroidales a Bifidobacteriales. Bacteroidales a Bifidobacteriales jsou považovány za skupiny zahrnující probiotické/symbiotické bakterie, jedná se tedy o pozitivní ovlivnění složení střevního mikrobiomu.

7) Výskyt filárií u ptáků chovaných v zoo a v záchranných centrech

V této studii jsme navrhli a optimalizovali nested-PCR pro citlivější a specifitější detekci zástupců Spiruromorpha, zejména se zaměřením na nadčeleď Filarioidea. Primery (CF F3 5'-TTCTGTTTTDACTATRCATGG-3' a CF R5 3'-GCHACAACATAATAAGTATCATG-5') byly designovány tak,

aby byly komplementární k amplikonům DNA parazitických filárií v oblasti mitochondriálního genu kódujícího podjednotku I enzymu cytochrom c oxidázy (COI). Finální elektroforetická separace kontrolních vzorků DNA (tj. izolovaných z uvedených druhů červů) ukázala všechny cílové sekvence o očekávané velikosti párů bází po prvním i druhém kole amplifikace nested-PCR.

Validovaná metoda byla následně využita pro screening přítomnosti filariální DNA v krvi ptáků. Analýze bylo podrobena 48 vzorků krve od 13 druhů ptáků: kos černý (*Turdus merula*, n=6), kavka obecná (*Coloeus monedula*, n=5), krkavec velký (*Corvus corax*, n=3), straka obecná (*Pica pica*, n=2), rorýs obecný (*Apus apus*, n=5), čáp bílý (*Ciconia ciconia*, n=5), puštík obecný (*Strix aluco*, n=2), kalous ušatý (*Asio otus*, n=1), výr velký (*Bubo bubo*, n=2), poštolka obecná (*Falco tinnunculus*, n=8), sokol stěhovavý (*Falco peregrinus*, n=4), káně lesní (*Buteo buteo*, n=4) a orel královský (*Aquila heliaca*, n=1). Testování odhalilo jeden pozitivní vzorek, což odpovídá 2 % celkové prevalenci. Vzorek krve s pozitivním výsledkem pocházel od *S. aluco*, přičemž nízká podobnost s porovnávanými sekvencemi dostupnými v genetické bance vypovídala o pravděpodobné detekci nového druhu filárie. Na základě umístění sekvencí v následně provedené fylogenetické analýze byl určen jako doposud geneticky nepopsaný druh náležící do rodu *Splendidofilaria*.

Přínos projektu:

Účast na řešení projektu byl pro tým Ústavu ekologie a chorob zoovířat, zvěře, ryb a včel motivací k intenzivnímu výzkumu, jež se uplatní v časopisech Q1 a Q2 kategorie a bude mít značný mezinárodní přesah a přispěje k osobnímu růstu zapojených pracovníků. Řešení projektu přispěje k rozvoji zoologické medicíny se zaměřením na zdravotní problematiku evropské fauny. Nové medicínské a ekologické poznatky budou také bezprostředně využívány při výuce studentů VETUNI.

Využití výsledků:

Lze předpokládat značný mezinárodní přesah výsledků projektu a jejich uplatnění ve vědeckých časopisech. Kromě vědeckého přínosu má řešení projektu i praktické implikace pro ochranu zdraví a veterinární medicínu volně žijících zvířat, ochranářskou a veterinární ekologii, odhad environmentálních rizik polutantů vodního prostředí. Výsledky budou také použity při sepisování odborných prací studentů.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

- 1) Bat first shield cellular responses provoked by non-viral pathogens: a temperature-dependent *in vitro* study. *Cellular Immunology*, IF 4,3, Q2; zpracování dat + rukopis v přípravě
- 2) Risks of combined neonicotinoids for aquatic organisms. *PLoS One*, IF 3,7, Q2; zpracování dat + rukopis v přípravě
- 3) An experimental challenge model with *Edwardsiella tarda* in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Journal of Fish Diseases*, IF 2,5, Q1; zpracování dat + rukopis v přípravě
- 4) Hematological, biochemical, immune profile and health of *Ameiurus* spp. fish. *Journal of Veterinary Research*, IF 1,8, Q2; zpracování dat + rukopis v přípravě
- 5) Health status and pathogen prevalence in isolated populations of Aesculapian snake. *Frontiers in Veterinary Science*, IF 3,2, Q1; zpracování dat + rukopis v přípravě
- 6) Gut microbiome modulation of juvenile European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) as a preventive procedure during captive care. *Frontiers in Veterinary Science*, IF 3,2, Q1; zpracování dat + rukopis v přípravě

7) Molecular characterization of a new *Splendidofilaria* sp. and prevalence of filarial nematodes in birds. *Parasites & Vectors*, IF 3,2, Q1; zpracování dat + rukopis v přípravě

8) Nemcova M, Zukal J, Seidlova V, Bednarikova S, Havelkova B, Dundarova H, Pikula J Temperature-dependent *in vitro* hepatocytotoxicity of insecticides in bats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2024, 111: 104544. IF 4,2, Q1; článek otištěn

9) Adam Š, Piaček V, Bednaříková Š, Havelková B, Němcová M, Bomon M, Lauer R, Pikula J Comparative cardiorespiratory and body temperature effects of ketamine-medetomidine, ketamine-xylazine and ketamine-xylazine-diazepam anaesthetic protocols on binturong (*Arctictis binturong*), *Acta Veterinaria Brno*, 2024, článek bude otištěn v posledním čísle časopisu roku 2024

Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	673 860,- Kč	673 860,- Kč
Služby	70 000,- Kč	70 000,- Kč
Cestovné	80 000,- Kč	80 000,- Kč
Další provozní náklady	443 077,- Kč	443 077,- Kč
Doplňkové náklady	190 041,- Kč	190 041,- Kč
Celkem	1 456 978,- Kč	1 456 978,- Kč

Zdůvodnění nákladů:

Osobní náklady

čerpano 673 860 Kč

Finanční prostředky na osobní náklady (674 tis. Kč) byly využity na vyplacení odměn a stipendií členům řešitelského kolektivu.

Služby:

čerpano 70 000 Kč

Celkové náklady na služby (70 tis. Kč) byly využity na uhrazení publikačních nákladů v časopisech Open Access, jazykový proofreading a sekvenování PCR produktů.

Cestovné:

čerpano 80 000 Kč

Cestovné (**80 tis. Kč**) bylo použito k zajištění terénního sběru vzorků v ČR i zahraničí a prezentaci výsledků na European Bat Research Symposium (2.-6. září, 2024, Tarragona, Katalánsko, Španělsko).

Další provozní náklady:

čerpano 443 077 Kč

Další provozní náklady (443 tis. Kč) byly použity k nakoupení materiálu na odběr, manipulaci a uskladnění vzorků (odběrové tampony, etanol, zkumavky, špičky, krabičky a igelitové pytlíky na vzorky apod., filtry na eDNA), materiál pro izolaci DNA (skalpel, PrepMan, DNA a RNA izolační kity, zkumavky na izolaci, keramické kuličky k homogenizaci, špičky), spotřební materiál a reagentie pro qPCR a PCR (voda, master mixy, primery, fluorescenčně značené sondy, PCR destičky, špičky),

spotřební materiál a reagentie pro LAMP reakce. Dále šlo o náklady spojené s chovy a kultivací testovacích organismů a s nákupy čistých chemikálií, materiálu pro přípravu živných roztoků, standardů neonicotinoidů (ACETAMIPRID, THIACTOPRID a THIAMETHOXAM), dalšího spotřebního materiálu (laboratorních pomůcek), křemenných lahvíček, kyvet, náplně do kolony. EC8+ cartridge pro stanovení acidobazické rovnováhy krve přístrojem i-Stat. Běžný laboratorní materiál, laboratorní sklo, plasty pro buněčné kultury, zkumavky, špičky na pipety, rukavice, dezinfekční prostředky; chemikálie: např. PBS, kultivační média, fetální bovinní sérum, antimykotika a antibiotika pro buněčné kultury.

Doplňkové náklady:

čerpáno 190 041,- Kč

Odvedeny doplňkové náklady (režie) ve výši 15 %.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě doložte výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2022 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude odkazovat na podporu ITA VETUNI. Výhradní odkaz na projekt ITA VETUNI (bez odkazů na podporu z dalších grantů, projektů a jim obdobných finančních zdrojů) musí obsahovat vždy nejméně jedna publikace s impakt faktorem na každých 1,5 milionu korun způsobilých nákladů projektu, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu:

23.12.2024 Jiří Pikula

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2022 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu **odpovědného za čerpání prostředků:**

23.12.2024 Jiří Pikula

Přednosta ústavu nebo kliniky, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu nebo klinice, respektive celoškolském pracovišti, které řídí.

Datum, jméno a podpis

přednosty ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště: 23.12.2024 Jiří Pikula

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště: doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2024

Identifikační číslo projektu: 2024ITA25

Název projektu: Vedlejší produkty rostlinného původu jako součást nových biodegradabilních/jedlých produktů pro ochranu životního prostředí a mechanismus ochrany zdraví před alergenními složkami potravin

Dílčí projekt 1

CaféCycle: BioPack – využití použité kávové sedliny pro jedlé balení při udržitelném vaření kávy

Dílčí projekt 2

Interakce pšeničného gliadinu a bioaktivních složek potravin.

Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: prof. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.

Fakulta/celoškolské pracoviště: Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu

E-mail: tremlovab@vfu.cz

Telefon: 602116956

Zástupce řešitele: doc. MSc. Dani Dordevič, Ph.D.

Řešitelský kolektiv:

Řešitelský tým byl tvořen pracovníky a studenty DSP Ústavu hygieny a technologie potravin rostlinného původu.

Hlavní řešitel:

prof. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D., akademický pracovník, úvazek 1,0 – koordinace dílčích úkolů, hodnocení vzorků a interpretace výsledků ve všech dílčích aktivitách, příprava a kontrola publikací, vypracování zprávy o řešení projektu. H index = 18, součet Q1 a Q2 = 38

Dílčí projekt 1 – řešitelský tým

doc. MSc. Dani Dordevič, Ph.D., akademický pracovník, úvazek 1,0 – koordinace dílčích aktivit, výroby biodegradabilních matric, stanovení celkových polyfenolů spektrofotometricky a pomocí HPLC, textura, hodnocení vzorků a interpretace výsledků, příprava a kontrola publikací, vypracování podkladů pro zprávu o řešení projektu. H index = 21, součet Q1 a Q2 = 38

Ing. Alexandra Tauferová, Ph. D., akademický pracovník, úvazek 0,6 – výroba vzorků, sensorická analýza připravených vzorků, hodnocení výsledků, vypracování podkladů pro závěrečnou zprávu a publikace. H index = 3, součet Q1 a Q2 = 3

Dílčí projekt 2 – řešitelský tým

doc. MVDr. Matej Pospiech, Ph.D., akademický pracovník, úvazek 1,0 – koordinace dílčích aktivit (provedení kolorimetrických a UV-VIS analýz), statistické zpracování výsledků a interpretace výsledků, příprava a kontrola publikací, vypracování podkladů pro zprávu o řešení projektu. H index 8, Q1+Q2 = 16

Mgr. Zdeňka Javůrková, Ph.D., akademický pracovník, úvazek 1,0 – provedení analýz ELISA (gliadin), příprava koncentračních řad bioaktivních látek. H index 9, Q1+Q2 = 12

Mgr. Marie Bartlová, Ph.D., akademický pracovník, úvazek 1,0, příprava koncentračních řad bioaktivních látek. H index 2 Q1+Q2 = 4

Ing. Lenka Havlová, Ph.D. akademický pracovník, úvazek 1,0 provedení elektroforézy gliadinu a jejích komplexů. H index 3, Q1+Q2 = 2

Studenti DSP

Mgr. Dominika Kotianová, student 1. ročník DSP – výroba vzorků, chemické analýzy a senzorická analýza připravených vzorků, hodnocení výsledků, vypracování podkladů pro závěrečnou zprávu a publikace.

Mgr. Tomáš Pencák, student 1. ročník DSP – výroba vzorků, chemické analýzy a senzorická analýza připravených vzorků, hodnocení výsledků, vypracování podkladů pro závěrečnou zprávu a publikace.

Mgr. Kateřina Křištofová (3. rok studia) – úvazek 0, provedení metod pro stanovení antioxidačního účinku, provedení UV-VIS a kolorimetrických analýz.

Mgr. Ing. Jana Čaloudová (3. rok studia) – úvazek 0, hodnocení interakce bioaktivních látek a alergenních proteinů Ramanovou spektroskopií, provedení metod pro stanovení antioxidačního účinku a kolorimetrických analýz

V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu: -

Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Téma projektu je v souladu s prioritami výzkumu na VETUNI i fakultě, konkrétně se zaměřuje na oblast bezpečnosti, hygieny a technologie potravin. Řešení projektu podpořilo výzkumnou činnost, která dosud nebyla řešena v rámci jiného výzkumného úkolu.

Dílčí projekt 1

Dílčí projekt se systematicky zabýval využitím použité kávové sedliny pro výrobu jedlých obalů, což přináší ekologickou alternativu k tradičním obalům a podporuje udržitelné využití odpadu z kávového průmyslu. Tento aspekt projektu byl zahájen v reakci na rostoucí obavy z environmentálního dopadu vznikajících odpadů a potřeby hledat inovativní a ekologicky šetrné alternativy. Naším cílem bylo vyvinout materiály, které splňují technické a bezpečnostní požadavky pro potravinářské obaly a zároveň poskytují biologickou odbouratelnost, což umožňuje jejich přirozený rozklad a snižuje ekologický otisk po použití. Tyto vyrobené biodegradabilní filmy se nejen ukázaly jako funkční a bezpečné, ale také přinášejí potenciální přidanou hodnotu díky své jedlé formě,

čímž mohou přispět k lepšímu zážitku spotřebitele a podpořit přechod na udržitelnější alternativy v potravinářském balení. Celkově tato část projektu představuje významný krok ke snížení environmentální zátěže spojené s používáním plastových materiálů.

Dílčí projekt 2 byl zaměřen na oblast bezpečnosti potravin. Konkrétně řeší na úrovni základního výzkumu vztah bioaktivních látek a nanočástic využívaných v potravinářství na změnu alergenicity gliadinu. Gliadin představuje nejen protein s alergenním potenciálem, ale spolupodílí se rovněž na vzniku celiakie. Poznání v mechanismu interakcí mezi gliadinem a dalšími látkami má přesah z bezpečnosti potravin do zdraví spotřebitelů a může přispět k produkci bezpečných potravin vhodných také pro celiaky.

Cíle projektu:

Dílčí projekt 1

Cílem projektu CaféCycle: BioPack je využití kávové sedliny k vývoji jedlých a biodegradabilních obalových materiálů, které budou sloužit jako ekologická alternativa k tradičním plastovým obalům. Tento přístup nejen snižuje množství odpadu z kávového průmyslu, ale také přináší pozitivní dopad na životní prostředí díky biodegradabilním vlastnostem materiálu. Projekt si rovněž klade za cíl přispět ke kvalitě potravinových produktů obohacením obalů o antioxidanty a další bioaktivní látky z kávové sedliny, což může přinést nutriční a funkční přidanou hodnotu.

Dílčí projekt 2

Cílem projektu je sledovat a popsat dynamiku inhibice pšeničného gliadinu přidávkem bioaktivních látek a nanočástic a definovat mechanismus tohoto účinku. Dílčím cílem je ověřit, zda dochází ke změně antioxidační aktivity takto připravených komplexů.

Popis a metodika řešení projektu:

Dílčí projekt 1

Při přípravě jedlých/biodegradabilních obalů s přidávkem kávové sedliny byly použity různé receptury založené na polysacharidech, zejména na bázi kappa karagenanu, doplněné o glycerol jako změkčovadlo. Byly testovány různé koncentrace kávové sedliny a extraktů, které zajišťují bioaktivní a antioxidační vlastnosti materiálu. Příprava obalů zahrnovala sušení lógru při kontrolované teplotě a následné promíchání s karagenanovou směsí. Cílem bylo vytvořit jedlé obaly s vysokou mechanickou odolností, optimální texturou a výživovými benefity.

Vyrobené biodegradabilní matrice byly hodnoceny následujícími metodami:

- a) parametry textury obalů, mechanické vlastnosti – ukázali interakci mezi použitými složkami a jejich vliv na pružnost a pevnost matic
- b) antioxidační vlastnosti – byl stanoven obsah celkových polyfenolů metodou dle Folin-Ciocalteu a HPLC, kde se přesně kvalitativně i kvantitativně stanovily polyfenolické látky nacházející se ve vzorcích; dále byla měřena antioxidační aktivita metodami FRAP (při kyselém pH), DPPH a ABTS (radikálové metody) a CUPRAC (redukční při pH = 7); použití více metod stanovení antioxidační aktivity je důležité z hlediska co nejobjektivnějšího zhodnocení antioxidačních vlastností
- c) antimikrobiální aktivita – antimikrobiální aktivita byla stanovena proti devíti kmenům mikroorganismů: (osm bakteriálních kmenů) *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC

700603) a *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) a (jeden kmen houby) *Candida albicans* (ATCC 2091).

- d) senzorická analýza byla zaměřená na chuť, vzhled a texturu, tak aby bylo možné vyhodnotit akceptovatelnost jedlých obalů u konzumentů.

Všechny dosažené výsledky byly zhodnoceny statistickými metodami – t-test, ANOVA, Principal component analysis, Pearson correlation a cross correlation.

Dílčí projekt 2

Příprava vzorků: Byly vytvořeny koncentrační řady kyseliny gallové, rutinu, kvercetinu, železa, stříbra a hliníku. U nanočástic (železo, stříbro a hliník) byly zvoleny tyto koncentrace: 150 mg/g, 120 mg/g, 90 mg/g, 60 mg/g, 30 mg/g, 15 mg/g, 10 mg/g, 5 mg/g, 2,5 mg/g a 0 mg/g. Navážené nanočástice byly smíseny s 55% alkoholem a v jednotlivých koncentracích byl obsažen 1% roztok gliadinu, který byl připraven rozpuštěním gliadinu (Sigma-Aldrich) v 55% alkoholu. Vzhledem k různé rozpustnosti vybraných antioxidantů v 55% alkoholu, byly vytvořeny nasycené zásobní roztoky, které byly dále ředěny 55% alkoholem a v každé koncentraci bylo obsaženo 1 % gliadinu.

Takto připravené vzorky byly měřeny *spektrofotometricky* v oblasti UV-VIS (Tecan). Měřena byla turbidita při 630 nm, a spektrální profil měřený v rozmezí 230-500 nm. Vyhodnocení bylo Kruskal-Wallisovým testem a Pearsonovým korelačním koeficientem. Vzorky byly dále měřeny *Ramanovým spektroskopem* v rozmezí vlnočíslel 269-2003 cm^{-1} . Významné peaky Ramanova spektra byly identifikovány testem lineární diskriminační analýzy. Významné peaky byly následně vyhodnoceny pro popis interakcí mezi gliadinem a bioaktivními látkami a nanočásticemi.

Elektroforéza byla provedena na vzorcích zpracovaných dvěma způsoby. V prvním případě byl vzorek gliadinu ($c = 10 \text{ mg/g}$) rozpuštěn v Laemmliho redukčním činidlo s přísadkou β -mercaptoethanolu (dle návodu výrobce) a ve druhém případě byl ke vzorku gliadinu ($c = 10 \text{ mg/g}$) přidán roztok s obsahem 2,75 M močoviny (urea), 5% kyseliny octové a barvivem methylenová zeleň.

Antioxidační vlastnosti byly hodnoceny testy na celkový obsah polyfenolů, DPPH, ABTS, FRAP. Vyhodnocení dat bylo Pearsonovým korelačním koeficientem a Kruskal-Wallisovým testem.

Imunoreaktivita byla ověřena ELISA kitem potaženým protilátkami „2D4“, které detekují gliadin se specificitou podobnou R5 s detekcí toxičtějších deaminovaných forem. Oxidace TMB chromogenu byla provedena křenovou peroxidázou. Měření bylo při absorbanzi (450 nm), výsledky byly vyjádřeny v mg lepku/kg.

Dosažené výsledky projektu:

Podrobné výsledky projektu jsou doloženy jako příloha 1. Níže jsou uvedeny sumární výsledky.

Dílčí projekt 1

Dosažené výsledky projektu ukázaly, že přísadka kávové sedliny do jedlých/biodegradabilních obalů výrazně ovlivňuje jejich antioxidační, mechanické a senzorické vlastnosti. Bylo potvrzeno, že zvýšené koncentrace kávové sedliny vedou ke zvýšení obsahu polyfenolů, což přispívá k vyšší antioxidační aktivitě materiálu. Tyto vlastnosti byly hodnoceny metodami FRAP, DPPH, ABTS a CUPRAC, přičemž každý z testů potvrdil pozitivní vliv na antioxidační kapacitu s rostoucí koncentrací bioaktivních látek. Mechanické testy prokázaly, že obaly s přísadkou kávového lógru mají dostatečnou pevnost a pružnost, což zajišťuje jejich stabilitu při použití. Senzorická analýza potvrdila, že jedlé obaly byly přijaty s pozitivním ohlasem, zejména díky unikátnímu vzhledu a zlepšeným nutričním hodnotám.

Celkově lze říci, že dosažené výsledky podporují využití kávové sedliny v jedlých/biodegradabilních obalech jako udržitelnou alternativu k tradičním plastovým materiálům. Výsledky naznačují, že tento materiál nejen snižuje ekologickou stopu, ale také přináší přidanou hodnotu ve formě bioaktivních složek, což může přispět k obohacení potravinových produktů o antioxidanty.

Dílčí projekt 2

Změna imunoreaktivity byla potvrzena na proteinech gliadinu po přidavku kyseliny gallové od 0,4 mg/kg u kvercetinu od 0,07 mg/kg, nanočástic stříbra a železa od 10 g/kg a u nanočástic hliníku od 15 g/kg. Inhibice vazby antigen – protilátka byla v průměru o 6 % u bioaktivních látek a 8 % u nanočástic.

Změny v imunoreaktivitě byly způsobeny konformačními změnami v proteinu, způsobeného interakcí bioaktivních látek a nanočástic s gliadinem. Elektroforeticky byl u kvercetinu, kyseliny gallové a nanočástic stříbra potvrzen nárůst molekulové hmotnosti vznikem strukturních komplexů protein – bioaktivní látka. Změny byly zejména u α -gliadinu a β -gliadinu s molekulovou hmotností 28-35 kDa a dále také u γ -gliadinu s alergenními vlastnostmi a molekulovou hmotností 35-40 kDa. UV-VIS a Ramanova spektroskopie potvrdily interakce gliadinu s kvercetinem a kyselinou gallovou také na úrovni vodíkových můstků a batochromního posunu. Jednalo se zejména o interakci s tyrosinovým dupletem a o změnu formování α -helixu.

U nanočástic stříbra byly spektrálními metodami také potvrzeny interakce typu vodíkové můstky, ale byl potvrzen také vznik bílkovinných komplexů. Změny byly zejména na úrovni aromatických aminokyselin a disulfidických vazeb, částečně ale docházelo také ke změně sekundární struktury gliadinu.

U rutinu, nanočástic hliníku a železa nebyl potvrzen elektroforeticky nárůst molekulární hmotnosti. U rutinu ale byly potvrzeny interakce s gliadinem a tvorba vodíkových můstků gliadin – rutin, u nanočástic hliníku a železa tyto interakce nebyly potvrzeny.

Interakce bioaktivních látek a nanočástic s gliadinem byla potvrzena také nepřímo, změnou antioxidačních vlastností takto připravených komplexů, kde trend růstu antioxidační aktivity není plně lineární s nárůstem koncentrace bioaktivních látek.

Přínos projektu:

Dílčí projekt 1

Přínosem projektu je zejména vytvoření inovativního a udržitelného obalového materiálu na bázi kávového lógru, který představuje ekologickou alternativu k tradičním plastovým obalům. Díky využití odpadu z kávového průmyslu projekt podporuje cirkulární ekonomiku a přispívá ke snížení množství odpadu, čímž pozitivně ovlivňuje životní prostředí. Projekt také přináší jedinečný způsob obohacení obalů o bioaktivní látky, zejména antioxidanty, které mohou zvyšovat nutriční hodnotu a ochranné vlastnosti potravinových produktů. Přítomnost těchto látek může pomoci zpomalit oxidaci a prodloužit trvanlivost potravin, což je přínosné pro spotřebitele i výrobce. Navíc díky senzoryckým a mechanickým vlastnostem obalů, jako jsou jejich vzhled, mají tyto jedlé a biodegradabilní obaly potenciál získat si pozitivní přijetí mezi spotřebiteli, kteří kladou důraz na udržitelnost. Projekt tedy nejen přispívá k ochraně životního prostředí, ale i ke zvýšení atraktivity a přidané hodnoty balených potravinových výrobků.

Dílčí projekt 2

Dílčí cíl přinesl nové poznatky v oblasti interakce mezi gliadinem a kyselinou gallovou, kvercetinem, rutinem a dále nanočásticemi stříbra, hliníku a železa. Na pracovišti byly zavedeny nové metody pro hodnocení interakcí proteinů s bioaktivními látkami a nanočásticemi (stanovení turbidity, UV-VIS průkaz strukturálních změn, Ramanova-spektroskopie a elektroforéza). Projekt také navázal na předešlý výzkum a rozšířil poznatky v oblasti interakcí proteinů s bioaktivními látkami a nanočásticemi. Přínosem projektu je také zapojení studentů DSP, kteří získali nové dovednosti s hodnocením proteinů a bioaktivních látek, které dále využijí v rámci svých řešených tématech.

Využití výsledků:

Dílčí projekt 1

Výsledky projektu mají široké možnosti uplatnění v potravinářském a obalovém průmyslu. Jedlé a biodegradabilní obaly s přídavkem kávové sedliny mohou sloužit jako ekologicky šetrná alternativa ke konvenčním plastovým obalům, čímž přispívají ke snižování produkce plastového odpadu a podpoře udržitelných obalových řešení. Díky obsahu bioaktivních látek, zejména antioxidantů, mohou tyto obaly zvýšit trvanlivost potravin a chránit je před degradací, což je využitelné zejména u produktů citlivých na oxidaci. Navíc lze výsledky využít pro další výzkum v oblasti funkčních obalů, které mohou mít kromě ochranných vlastností i pozitivní vliv na nutriční hodnotu produktů. Výsledky mohou být rovněž inspirací pro další inovace v oblasti využívání potravinového odpadu jako suroviny pro obaly. Zájemci o ekologicky šetrné produkty, jako jsou výrobci zdravé výživy, speciality nebo produkty pro ekologicky smýšlející spotřebitele, mohou využít tyto obaly jako součást marketingových strategií, čímž posílí svou konkurenční výhodu.

Dílčí projekt 2

Dosažené výsledky je možné uplatnit v potravinářském průmyslu a v oblasti analýzy alergenů v potravinách. Pochopení vzájemných interakcí složek potravin umožňuje v potravinářství správně dávkovat antioxidanty s ohledem na oxidační stabilitu potravin.

Dalším výsledkem výzkumu bylo ověření aktivity detekčního kitu využívajícího nově používanou protilátku 2D4. Detekční kit byl schopen potvrdit přítomnost gliadinů, i v případech že docházelo k interakci gliadinu s přidávanými látkami.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

Dílčí projekt 1

Incorporation of Spent Coffee Grounds in Biodegradable Packaging: Enhancing Mechanical Properties and Functional Attributes. *LWT – Food Science and Technology*, Q1, iF 6

Dílčí projekt 2

Výsledky zatím nebyly publikovány v časopise s IF. Plánují se zpracovat do publikace Gliadin Interaction between Bioactive Compounds and Nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Q1)

Dílčí část výsledků byla publikovaná na konferenci:

Javůrková, Z., Tremlová, B. Lepek nebezpečí v potravinách. In: *Hygiena Alimentorum XLIV*, Košice: Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, 2024, pp. 346-350. 2024ITA25, ISBN 978 80 8077 822 4.

Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	661 950,00	661 960,00
Služby	117 926,00	92 943,41
Cestovné	69 730,00	21 459,75
Další provozní náklady	619 950,00	693 202,84
Doplňkové náklady	220 434,00	220 434,00
Celkem	1 690 000,00	1 690 000,00

Zdůvodnění nákladů:

Osobní náklady

Byly čerpány v souladu s plánem projektu na:

- odměnu hlavnímu řešiteli za zpracování podkladů k projektu, kontrolu řešení projektu, vypracování a obhájení závěrečné zprávy,
- odměny spoluřešitelů (akademických pracovníků) za vypracování podkladů, řešení konkrétních úkolů, odpovědnost za konkrétní metodiku nebo dílčí úkol, zpracování výsledků a podkladů pro závěrečnou zprávu, za přípravu publikací,
- stipendium studentů DSP za řešení konkrétních úkolů, odpovědnost za konkrétní metodiku zpracování výsledků a podkladů pro závěrečnou zprávu a publikaci.

Služby

Opravy a udržování přístrojů potřebných k získání výsledků – HPLC, GC, mikroskopy

Pronájem plynových lahví

Publikační poplatky a kontrola odborného překladu

Vložné na zahraniční konference a školení

Cestovné

Konference *Hygiena Alimentorum*, Štrbské Pleso, Slovensko.

Výstup: JAVŮRKOVÁ, Z., TREMLOVÁ, B. Lepek – nebezpečí v potravinách. In: *Hygiena Alimentorum XLIV*, Košice: Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, 2024, pp. 346-350. 2024 ITA25, ISBN 978 80 8077 822 4.

Cesty na univerzity v Polsku a Maďarsku pro navázání spolupráce s partnerskými univerzitami a sdílení znalostí a metodologií relevantních pro cíle projektu. Tyto návštěvy umožnily výměnu odborných poznatků o biodegradabilních materiálech, analýze bioaktivních látek a pokročilých technologiích balení, což bude použito také v budoucím výzkumu.

Školení chromatografie

Školení v chromatografických technikách zajistilo efektivně a přesně využívat pokročilé chromatografické metody pro analýzu bioaktivních látek a dalších chemických vlastností relevantních pro projekt.

Další provozní náklady

Chemikálie nezbytné pro řešení projektu – bioaktivní látky, nanočástice, čisté formy proteinů, reagenční kity, plyny, speciální chemické látky (chitosan, karagenany aj.), pufrý pro elektroforézu

Laboratorní pomůcky – špičky, rukavice, zásobníky, zkumavky pro centrifugu, membrány pro elektroforézu, laboratorní sklo

Laboratorní přístroje – elektroforetická komora, elektrický zdroj k elektroforéze, transfer blot, digitální časovače, těsnění pro Oxitest, SLA, FDM 3D tiskárna a filamenty, sada pro měření vodní aktivity, váhy, nástavce k texturometru

Doplňkové náklady

Byly stanoveny ve výši 15 % z plánovaných přímých nákladů projektu.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

Je doložen jako příloha 2.

Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2022 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude odkazovat na podporu ITA VETUNI. Výhradní odkaz na projekt ITA VETUNI (bez odkazů na podporu z dalších grantů, projektů a jim obdobných finančních zdrojů) musí obsahovat vždy nejméně jedna publikace s impakt faktorem na každých 1,5 milionu korun způsobilých nákladů projektu, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

6.1.2025

prof. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu:

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2024

Identifikační číslo projektu: 2024ITA26

Název projektu: Vliv vybraných faktorů na pohodu zvířat

Řešitel projektu:

prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D.

Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství

FVHE VETUNI

E-mail: voslarovae@vfu.cz

Telefon: 541 562 773

Zástupce řešitele:

Prof. MVDr. Vladimír Večerek, CSc., MBA

Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství

FVHE VETUNI

E-mail: vecerekv@vfu.cz

Telefon: 541 562 770

Řešitelský kolektiv:

Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství

Prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D. – hlavní řešitelka, akademická pracovnice

Prof. MVDr. Vladimír Večerek, CSc., MBA – zástupce hlavní řešitelky, akademický pracovník

Prof. MVDr. Zdeňka Svobodová, DrSc. – spoluřešitelka, akademická pracovnice

Doc. Ing. Jana Blahová, Ph.D. – spoluřešitelka, akademická pracovnice

Doc. MVDr. Petr Chloupek, Ph.D. – spoluřešitel, akademický pracovník

Doc. Mgr. Petr Maršálek, Ph.D. – spoluřešitel, akademický pracovník

Doc. MVDr. Helena Modrá, Ph.D. – spoluřešitelka, akademická pracovnice

MVDr. Jana Jozefová, Ph.D. – spoluřešitelka, akademická pracovnice

MVDr. Gabriela Kadlecová, Ph.D. – spoluřešitelka, akademická pracovnice

MVDr. Michal Kaluža, Ph.D. – spoluřešitel, akademický pracovník

MVDr. Simona Kovaříková, Ph.D. – spoluřešitelka, akademická pracovnice

Mgr. Petr Linhart, Ph.D. – spoluřešitel, akademický pracovník
MVDr. Petra Mačáková, Ph.D. – spoluřešitelka, akademická pracovnice
MVDr. Miroslav Macháček, Ph.D. – spoluřešitel, akademický pracovník
MVDr. Přemysl Mikula, Ph.D. – spoluřešitel, akademický pracovník
Ing. Kamila Novotná Kružíková, Ph.D. – spoluřešitelka, akademická pracovnice
MVDr. Monika Šebánková, Ph.D. – spoluřešitelka, akademická pracovnice
Mgr. Veronika Vojtkovská, Ph.D. – spoluřešitelka, akademická pracovnice
Mgr. Bc. Renáta Hesová – spoluřešitelka, akademická pracovnice
Mgr. Lucie Kováčová – spoluřešitelka, akademická pracovnice
Mgr. Lucia Kotianová – spoluřešitelka, studentka 4. ročníku DSP v prezenční formě
Mgr. Dominik Vacuška – spoluřešitel, student 3. ročníku DSP v prezenční formě
Mgr. Zdeňka Vacušková – spoluřešitelka, studentka 3. ročníku DSP v prezenční formě
Mgr. Naďa Konečná – spoluřešitelka, studentka 2. ročníku DSP v prezenční formě
MVDr. Ekaterina Koriakina – spoluřešitelka, studentka 3. ročníku DSP v prezenční formě
Mgr. Barbora Riesová – spoluřešitelka, studentka 3. ročníku DSP v prezenční formě
Mgr. Michaela Frederika Vargová – spoluřešitelka, studentka 2. ročníku DSP v prezenční formě

V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu:

-

Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Předmět řešení spadal do výzkumné činnosti pracovníků Ústavu ochrany zvířat a welfare a veřejného veterinárního lékařství realizované na FVHE VETUNI, která je zaměřena do oblasti hodnocení úrovně ochrany a welfare zvířat určených pro hospodářské účely, zvířat v zájmových chovech a volně žijících zvířat a také do oblasti toxikologie, kde jsou sledovány toxické účinky vybraných látek na zdraví a pohodu zvířat, zejména ryb a vodních organismů.

Cíle projektu:

Cílem projektu bylo

- posouzení úrovně welfare hospodářských zvířat při přepravě na jatky na základě analýzy úhynů v souvislosti s přepravou

- ověření možnosti hodnocení hygieny prostředí v chovu pomocí rychlé detekční metody měření ATP
- zhodnocení welfare psů využívaných při canisterapii na základě analýzy chování v průběhu trvání terapeutické intervence
- posouzení faktorů ovlivňujících koncentraci kortizolu v srsti koček při hodnocení pohody zvířat
- posouzení vlivu enrichmentu v chovech morčat na jejich behaviorální projevy
- hodnocení akutní stresové reakce u alpak (*Vicugna pacos*) pomocí neinvazivních metod
- stanovení referenčních rozmezí poměru proteinu ke kreatininu v moči pro hodnocení zdravotního stavu a pohody koní
- zhodnocení zatížení hospodářských zvířat cizorodými látkami na základě monitoringu cizorodých látek v krmivech, u živých zvířat v hospodářstvích a v surovinách živočišného původu z pohledu dopadu na zdraví a pohodu zvířat
- zhodnocení zatížení řek Moravy a Dyje rtutí ve vztahu ke zdraví a welfare ryb na základě posouzení obsahu celkové rtuti ve svalovině ryb
- komplexní posouzení účinků herbicidu glyfosátu a jeho degradačního produktu aminomethylfosfonové kyseliny (AMPA) při výskytu v povrchových vodách na zdraví a pohodu kapra obecného (*Cyprinus carpio*)
- zhodnocení účinku látek používaných v kosmetickém průmyslu (lauryl sulfátu sodného a quaternia), jejichž rezidua kontaminují povrchové vody, na zdravotní stav a welfare vodních organismů

Popis a metodika řešení projektu:

Posouzení úrovně welfare hospodářských zvířat při přepravě na jatky na základě analýzy úhynů v souvislosti s přepravou bylo realizováno ve spolupráci se Státní veterinární správou. Pro potřeby analýzy byly získány údaje o počtu zvířat, která uhynula v souvislosti s přepravou na jatky. Předmětem analýzy byly všechny zásilky skotu, prasat, ovcí, koz, králíků a drůbeže přepravovaných z českých chovů na české jatky v období let 2017 až 2023. Na základě výsledků byla zhodnocena a srovnána úroveň welfare jednotlivých druhů zvířat při přepravě, faktory, které úhyny při přepravě ovlivňují, a ve srovnání s výsledky dřívějších studií byl posouzen dlouhodobý trend vývoje.

Monitoring hygieny prostředí probíhal v laboratorních podmínkách (vyšetření suspenze sbírkového kmene *Escherichia coli* a vyšetření inokulovaného modelového povrchu), a dále v terénních podmínkách ve vybraném chovu prasat, a to v porodní sekci. Vlastní měření bylo realizováno po vyskladnění prasníc a selat v době odstavu v porodním kotci. V rámci monitoringu bylo provedeno měření (1) v nevyčištěném kotci po vyskladnění zvířat, (2) po provedení mechanické očištění kotce (využití vysokotlaké vodní pistole) a (3) po provedení dezinfekce a fogace. Vzorčky pro zhodnocení hygieny prostředí byly odebírány stěrovou metodou (plocha 100 cm²) na 3 místech (podlážka, stěna kotce a provozní chodba). Hygiena prostředí byla monitorována pomocí měření ATP (stanovení RLU), nepřímého stanovení mikrobiální kontaminace s luminometrií (selektivní inkubace a přepočítání RLU na KTJ) a mikrobiální kultivace (stanovení KTJ). Hladina ATP byla detekována pomocí měření bioluminiscence 3 luminometry (luminometr Clean-Trace LM1, 3M Health Care, USA, luminometr EnSURE, Hygiena LLC, USA; luminometr SystemSURE Plus, Hygiena LLC, USA) dle metodiky výrobce. Výsledky měření luminometrií a plotnovými kultivačními metodami byly srovnány pro ověření možnosti hodnocení hygieny prostředí v chovu pomocí rychlé detekční metody měření ATP.

Pro zhodnocení welfare psů využívaných při canisterapii na základě analýzy chování v průběhu trvání terapeutické intervence byly přenosnou kamerou Niceboy Vega X Pro (NICEBOY s.r.o., ČR) pořízeny videozáznamy pracujících psů v průběhu terapeutických intervencí v rámci běžné canisterapeutické

praxe. Bylo sledováno 10 terapeutických psů se splněnými canisterapeutickými zkouškami při pětiminutových intervencích u každého klienta během celkové hodinové návštěvy zařízení. Intervence byly uskutečněny během jednotlivých pravidelných návštěv zařízení u totožných klientů v místnostech s vybavením pro udržování stálého mikroklimatu. Analýza videozáznamů byla provedena pomocí specializovaného software pro analýzu chování Observer XT (Noldus Information Technology, Nizozemsko). Byla sledována změna chování (výskyt a frekvence stresových prvků chování a konejšivých signálů) v závislosti na délce trvání práce psa a určena optimální doba trvání canisterapeutické intervence, resp. počet jejích opakování.

Za účelem posouzení faktorů ovlivňujících koncentraci kortizolu v srsti koček při hodnocení pohody zvířat byla navázána spolupráce s vybranými veterinárními pracovišti, na kterých byly získány vzorky srsti od koček podstupujících na daných pracovištích kastraci. Vzorek srsti o velikosti 5 x 5 cm u samic nebo 2 x 2 cm u samců byl zvířatům odebírán pomocí holicího strojku v celkové anestezii z abdominální oblasti (u samic), resp. z okolí šourku (u samců) v rámci předoperační přípravy na kastraci. Počet získaných vzorků byl 66 (jeden vzorek odpovídá jednomu zvířeti). Po odebrání byly vzorky umístěny do uzavíratelných ZIP sáčků a společně s průvodním dopisem obsahujícím základní informace o zvířeti (věk, pohlaví, plemeno, barva, typ srsti a způsob chovu) předány do laboratoře Ústavu ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, kde byly až do vyšetření skladovány bez přístupu slunečního záření při pokojové teplotě. Po navážení, promytí vzorků od případných externích steroidních hormonů a extrakci kortizolu ze vzorků byl k jeho detekci a následné kvantifikaci použit komerčně dostupný kit Cortisol Express ELISA (Cayman Chemical, USA) o rozsahu 39,1-5000 pg/ml.

Za účelem posouzení vlivu enrichmentu v chovech morčat na jejich behaviorální projevy byla sledována a hodnocena skupina deseti morčat v prostorách chovné stanice. Sledováno bylo chování morčat po dobu 36 hodin v prostorách běžného ustájení a následně po dobu 36 hodin při ustájení v ubikacích s obohaceným prostředím, vždy v průběhu tří dnů. Chování jednotlivých zvířat bylo po celou dobu sledování nahráváno přenosnou kamerou Niceboy Vega X Pro (NICEBOY s.r.o., ČR) pro pozdější vyhodnocení. Hodnocení jednotlivých prvků chování bylo provedeno s využitím metody snímání. Analýza videozáznamů byla provedena pomocí specializovaného software pro analýzu chování Observer XT (Noldus Information Technology, Nizozemsko).

K hodnocení akutní stresové reakce u alpak během pravidelného veterinárního vyšetření byly využity dvě neinvazivní metody hodnocení stresu – měření povrchové teploty termokamerou a odběr slin pro stanovení hladiny kortizolu. Běžné veterinární ošetření zahrnovalo kontrolu celkového zdravotního stavu, aplikaci vitamínů a odběr vzorků faeces. Odběr vzorků slin a snímání termokamerou bylo provedeno před vyšetřením a po něm. Ke snímání povrchové teploty byla využita termokamera testo 890-2 (Testo SE & Co. KGaA, Německo) s odečtením dat v programu IRSoft. Odběr slin byl proveden z dutiny ústní pomocí odběrové sady Salivette a hladina kortizolu ve vzorcích byla následně zjištěna laboratorně s využitím ELISA kitů.

Pro účely stanovení referenčních rozmezí poměru proteinu ke kreatininu v moči byly pomocí spontánní mikce získávány vzorky moči od klinicky zdravých koní různého pohlaví a věku, a to včetně hříbat ve věku do šesti měsíců. Vyšetření vzorků spočívalo ve zjištění fyzikálních vlastností (barva, zákal, hustota) a základních chemických vlastností (pH, bílkovina, glukóza, ketolátky, bilirubin, krev) a vyšetření močového sedimentu. Současně byl stanovován poměr proteinu ke kreatininu v moči. Ke zjištění koncentrace proteinu v moči byly použity dvě běžně používané spektrofotometrické metody založené na reakci analytu s pyrogalolovou červení a benzethonium chloridem. Stanovení obsahu kreatininu bylo provedeno spektrofotometricky s využitím Jaffého metody. V rámci studie bylo získáno celkem 126 vzorků moči. Byl sledován vliv věku a pohlaví na tyto parametry.

Hodnocení zatížení hospodářských zvířat cizorodými látkami na základě monitoringu cizorodých látek v krmivech, u živých zvířat v hospodářstvích a v surovinách živočišného původu bylo provedeno ve spolupráci se Státní veterinární správou. Na základě četnosti nevyhovujících vzorků z monitoringu cizorodých látek prováděného Státní veterinární správou byl zhodnocen trend výskytu různých skupin a podkategorií cizorodých látek za sledované období let 2015 až 2022, dále bylo určeno, které cizorodé látky se vyskytují nejčastěji a posouzen jejich dopad s ohledem na zdraví zvířat. Výskyt nevyhovujících vzorků byl členěn podle legislativně stanovených skupin sledovaných cizorodých látek zařazených v monitoringu. Jedná se o skupinu A (látky s anabolickým účinkem a nepovolené látky) a skupinu B (veterinární léčivé přípravky a látky kontaminující). Dále bylo na základě dostupných dat zhodnoceno zatížení koz a kůzlat z pohledu kadmia.

Pro zhodnocení zatížení řek Moravy a Dyje rtutí ve vztahu ke zdraví a welfare ryb byly využity vzorky svaloviny a šupin získané z ryb odlovených na podzim roku 2023 ve spolupráci s Ústavem biologie obratlovců Akademie věd ČR (povolení pro lov AV ČR - MZE-68283/2022-16232) na řece Moravě a Dyji následujících druhů: hlaváč černoústý, hrouzek běloploutvý, hrouzek obecný, okoun říční, jelec tloušť, plotice obecná a karas stříbřitý. Šupiny byly použity na zjištění věku ryb a u vzorků svaloviny byl změřen obsah celkové rtuti na analyzátoru AMA 254 (Altec spol. s r.o., ČR). Na základě zjištěných koncentrací rtuti byl (1) zjištěn rozdíl v obsahu rtuti mezi sledovanými druhy ryb, (2) zhodnocena diference mezi sledovanými řekami na základě srovnání obsahu rtuti mezi stejnými druhy z různých řek, (3) zhodnocena bioakumulace u nepůvodního druhu hlaváče černoústého a (4) posouzen obsah rtuti z pohledu zdraví a welfare ryb.

Pro testování subchronické toxicity herbicidu glyfosátu a jeho degradačního produktu AMPA byl jako modelový organismus zvolen kapr obecný (*Cyprinus carpio*). Test toxicity na juvenilních rybách vycházel z metodiky OECD 215 a byl prováděn průtočnou metodou s pravidelnou výměnou lázně po 12 hodinách. Testované látky byly aplikovány do krmiva, pro každou látku byly zvoleny dvě různé koncentrace, kdy první odpovídala environmentálně relevantní koncentraci (350 µg/kg) a druhá, vyšší koncentrace, byla jejím desetinásobkem (3500 µg/kg). Do experimentu byla také zařazena kontrolní skupina. Testování bylo provedeno v duplikátu. Délka trvání expozice byla 4 týdny, vlastní expozici předcházela adaptační fáze v délce 14 dnů. Ryby byly v průběhu experimentu krmeny komerčním krmivem, a to 3x denně v dávce 3 % tělesné hmotnosti. Dvakrát denně bylo prováděno mechanické odstranění výkalů ryb a jiných organických zbytků z nádrží a byla prováděna výměna vody. V průběhu experimentu byla pravidelně každý den sledována kvalita vody (pH, kyslík, teplota, koncentrace amoniaku a dusitanů) a zdravotní stav ryb. Po ukončení experimentu byl proveden odběr krve z ocasní žíly na komplexní hematologické a biochemické vyšetření. Následně byly ryby usmrceny tupým úderem do hlavy a provedlo se zhodnocení základních morfologických ukazatelů. Dále byl proveden odběr vzorků vybraných tkání pro analýzu ukazatelů oxidativního stresu (aktivity antioxidantních enzymů, poškození lipidů), histologické vyšetření a zjištění možných změn genové exprese. V rámci hematologického vyšetření byl stanoven počet erytrocytů a leukocytů, hemoglobin, hematokrit a diferenciální rozpočet bílých krvinek. V plné krvi bylo také provedeno vyšetření krevních plynů. V rámci biochemického vyšetření byly stanovovány základní parametry sacharidového, lipidového a bílkovinného metabolismu krevní plasmu ryb. Byly také hodnoceny koncentrace významných iontů, aktivity vybraných enzymů a ukazatele oxidativního stresu (např. míra poškození DNA, antioxidantní kapacita, ceruloplasmin). Test toxicity byl realizován v akreditovaném zařízení Ústavu ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství FVHE VETUNI v souladu se schváleným projektem pokusů č. MSMT-7295/2024-3.

Účinek látek používaných v kosmetickém průmyslu (lauryl sulfátu sodného a quaternia), jejichž rezidua kontaminují povrchové vody, na zdravotní stav a welfare vodních organismů byl hodnocen na

základě zjištěných endpointů u modelových organismů zvolených s důrazem na upřednostnění tzv. alternativních metod testování toxicity. Pomocí testů provedených dle modifikované metodiky OECD č. 236 byla sledována akutní toxicita testovaných látek pro embrya dáňka pruhooraného (*Danio rerio*) a drápatky vodní (*Xenopus laevis*). V testech byla pozorována celá škála letálních i subletálních endpointů. Za pomoci kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií byly ověřeny koncentrace testovaných látek v roztocích.

Dosažené výsledky projektu:

Výsledkem projektu v části zaměřené na posouzení úrovně welfare hospodářských zvířat při přepravě na jatky je zhodnocení a srovnání úrovně welfare sledovaných druhů zvířat při přepravě, určení faktorů ovlivňujících úhyny při přepravě a dlouhodobých trendů vývoje úhynů v souvislosti s přepravou zvířat na jatky v ČR.

Výsledkem projektu v části zaměřené na ověření možnosti hodnocení hygieny prostředí v chovu pomocí rychlé detekční metody měření ATP je srovnání různých metod stanovení mikrobiální kontaminace prostředí, tj. rychlé bioluminiscenční metody s klasickými plotnovými kultivačními metodami.

Výsledkem projektu v části zaměřené na sledování welfare a metod hodnocení welfare zájmových zvířat je zhodnocení dopadu využívání psů v canisterapii na jejich behaviorální projevy v závislosti na délce trvání canisterapeutické práce psa, ověření metodiky zpracování vzorků srsti a stanovení hladiny kortizolu v srsti a zhodnocení vlivu vybraných faktorů (pohlaví, barva, typ srsti, věk a způsob chovu) na hladinu kortizolu v srsti koček a zhodnocení vlivu enrichmentu v chovech morčat na jejich behaviorální projevy.

Výsledkem projektu v části zaměřené na hodnocení akutní stresové reakce u alpak (*Vicugna pacos*) pomocí neinvazivních metod je stanovení změn povrchové teploty v koutku oka alpak a kolísání hladiny kortizolu ve slinách při stresové reakci spojené s běžným veterinárním vyšetřením.

Výsledkem projektu v části zaměřené na hodnocení zdravotního stavu a pohody koní je stanovení referenčních rozmezí jednotlivých parametrů moči koní a porovnání dvou různých spektrofotometrických metod běžně používaných ve veterinární diagnostice pro stanovení koncentrace proteinu v moči koní.

Výsledkem projektu v části zaměřené na hodnocení zatížení hospodářských zvířat cizorodými látkami na základě monitoringu cizorodých látek v krmivech, u živých zvířat v hospodářstvích a v surovinách živočišného původu je zhodnocení trendu výskytu látek s anabolickým účinkem a nepovolených látek a veterinárních léčivých přípravků a kontaminantů a zjištění, u kterých druhů zvířat se cizorodé látky vyskytují nejčastěji, a posouzení potenciálního dopadu na jejich zdraví a pohodu.

Výsledkem projektu v části zaměřené na zdraví a welfare vodních živočichů z pohledu jejich ohrožení vlivem kontaminace vodního prostředí je zhodnocení obsahu celkové rtuti u sledovaných druhů ryb, posouzení zatížení rtutí u sledovaných lokalit a odvození dopadu na zdraví a welfare ryb. Dalším výsledkem je komplexní posouzení subchronického působení herbicidu glyfosátu a jeho degradačního produktu AMPA na kapra obecného (*Cyprinus carpio*), získání nových poznatků o vlivu látek používaných v kosmetickém průmyslu (lauryl sulfátu sodného a quaternia), jejichž rezidua kontaminují povrchové vody, na zdravotní stav a welfare vodních organismů při použití alternativních metod testování toxicity (využití embryonálních stádií ryb a žab).

Přínos projektu:

Přínosem projektu v části zaměřené na welfare hospodářských zvířat je zhodnocení a srovnání úrovně welfare hlavních druhů jatečných zvířat při přepravě, určení faktorů ovlivňujících úhyny při přepravě a dlouhodobých trendů vývoje úhynů v souvislosti s přepravou zvířat na jatky v ČR a ověření potenciálu zrychleného monitoringu mikrobiální kontaminace a posouzení významu měření ATP v monitoringu hygieny v prostředí chovu zvířat z hlediska zhodnocení výhod a možných omezení tohoto rychlého detekčního systému ve srovnání s klasickou kultivací.

Přínosem projektu v části zaměřené na welfare zájmových zvířat je zhodnocení welfare psů během canisterapie s ohledem na dobu trvání canisterapeutické práce psa a navržení odpovídajících pracovních postupů, ověření metodiky zpracování vzorků srsti a získání poznatků o faktorech ovlivňujících hladinu kortizolu v srsti koček, které jsou klíčové při dalším využívání srsti jako neinvazivní matrice při monitorování chronického stresu v praktickém i výzkumném kontextu, a zhodnocení vlivu enrichmentu v chovech morčat na jejich behaviorální projevy a doporučení vhodného typu enrichmentu pro daný druh.

Dalším přínosem projektu je stanovení stresové zátěže pomocí neinvazivních metod u alpak při běžném veterinárním ošetření.

Přínosem projektu v části zaměřené na hodnocení zdravotního stavu a pohody koní je vytvoření referenčních rozmezí poměru proteinu ke kreatininu v moči klinicky zdravých koní a porovnání výsledků koncentrace proteinu získaných s využitím dvou různých spektrofotometrických metod.

Přínosem projektu v části zaměřené na hodnocení zatížení hospodářských zvířat cizorodými látkami na základě monitoringu cizorodých látek v krmivech, u živých zvířat v hospodářstvích a v surovinách živočišného původu je zjištění trendu výskytu látek s anabolickým účinkem, nepovolených látek, veterinárních léčiv a kontaminantů s ohledem na zdraví zvířat.

Přínosem projektu v části zaměřené na zdraví a welfare vodních živočichů z pohledu jejich ohrožení vlivem kontaminace vodního prostředí je rozšíření znalostí o obsahu rtuti v rybách žijících na dolním toku řek Moravy a Dyje s důrazem na nepůvodní druh hlaváče černoústého a jeho roli v bioakumulaci rtuti, rozšíření v současné době limitovaných informací o potenciálním negativním efektu herbicidu glyfosátu a jeho degradačního produktu AMPA na ryby, konkrétně kapra obecného, což je druh s vysokou relevancí pro Českou republiku. Byla sledována dietární expozice, která nebyla prozatím nikde popsána. Dalším přínosem je získání nových poznatků o toxicitě reziduí látek používaných v kosmetickém průmyslu (lauryl sulfátu sodného a quaternia) pro vodní organismy.

Využití výsledků:

Výsledky byly již prezentovány prostřednictvím jednoho článku ve vědeckém časopise s IF (Water Air and Soil Pollution, Q1), čtyř článků v odborných časopisech (Veterinářství, Maso) a celkem 15 příspěvků ve sbornících tuzemských (Ochrana zvířat a welfare 2024, 51. konference České a Slovenské etologické společnosti, XV. konference DDD - Přívorovy dny, I. společná konference farmakologických společností 2024 – Toxcon, konference Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí) a zahraničních konferencí (ZVIERATÁ: Problémy súvisiace s chovom zvierat vo svetle všeobecne záväzných právnych predpisov, XXI Congress of the Portuguese Ethological Society).

Další články obsahující výsledky řešení projektu byly již odeslány k publikaci nebo jsou připravovány k odeslání pro publikaci ve vědeckých časopisech s impakt faktorem.

Výsledky jsou také součástí připravovaných dizertačních prací spoluřešitelů – studentů DSP Mgr. Dominika Vacušky, Mgr. Zdeňky Vacuškové, MVDr. Ekateriny Koriakiny, Mgr. Barbory Riesové a Mgr. Michaely Frederiky Vargové.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

Cíl 1: Posouzení úrovně welfare hospodářských zvířat při přepravě na jatky na základě analýzy úhynů v souvislosti s přepravou

Publikace ve vědeckém časopise s IF

1. JUSTOVÁ, E., VEČEREK, V., VOŠLÁŘOVÁ, E., SEMERÁD, Z., VÁLKOVÁ, L. Úhyny zvířat při přepravě na jatky z pohledu ochrany zvířat proti týrání. (2024ITA26 VETUNI) - *v přípravě pro časopis Animal Science Journal*

Další publikační výstupy

1. JUSTOVÁ, E., VEČEREK, V., VOŠLÁŘOVÁ, E., VÁLKOVÁ, L. Ochrana krůt, kachen a hus z pohledu úhynů při jejich přepravě na jatky. (Protection of turkeys, ducks and geese from the perspective of mortality related to their transport to slaughterhouses). *Veterinářství*, 2024, roč. 74, č. 11, s. 616-620. (2024ITA26 VETUNI)
2. JUSTOVÁ, E., VEČEREK, V., VOŠLÁŘOVÁ, E., VÁLKOVÁ, L. Ochrana brojlerů a nosnic z pohledu úhynů při jejich přepravě na jatky. (Protection of broiler chickens and end-of-lay hens from the perspective of mortality related to their transport to slaughterhouses). *Veterinářství*, in press. (2024ITA26 VETUNI)
3. JUSTOVÁ, E., VEČEREK, V., VOŠLÁŘOVÁ, E. Vývoj v počtech přepravovaných prasat a jejich úhyny při přepravě na jatky. (Trends in the number of transported pigs and their mortality during transport to slaughterhouses). *Maso*, 2025, roč. 36, č. 1, in press. (2024ITA26 VETUNI)
4. JUSTOVÁ, E., VEČEREK, V., VOŠLÁŘOVÁ, E. Trendy v přepravě malých přežvýkavců na jatky. (Trends in the transport of small ruminants to slaughterhouses). In *Ochrana zvířat a welfare Sborník příspěvků*. Brno: VETUNI, 2024, s. 368-380. (2024ITA26 VETUNI)
5. JUSTOVÁ, E., VEČEREK, V., VOŠLÁŘOVÁ, E. Vývoj v počtech hus přepravených na jatky a jejich úhyny při přepravě na jatky. (Trends in the number of geese transported to slaughterhouses and their mortality during transport to slaughterhouses). In *Ochrana zvířat a welfare Sborník příspěvků*. Brno: VETUNI, 2024, s. 381-385. (2024ITA26 VETUNI)

Cíl 2: Ověření možnosti hodnocení hygieny prostředí v chovu pomocí rychlé detekční metody měření ATP

Publikace ve vědeckém časopise s IF

1. KALUŽA, M., MACHÁČEK, M., VEČEREK, V. ATP test a jeho využití v monitoringu hygieny prostředí na porodnách prasat ve srovnání s plotnovými mikrobiologickými metodami. (2024ITA26 VETUNI) – *v přípravě pro časopis Agriculture*

Další publikační výstupy

1. KALUŽA, M. Monitoring hygieny napájení u telat na mléčných farmách. In: *XXII. ročník vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou: ZVIERATÁ: Problémy súvisiace s chovom*

zvierat vo svetle všeobecne záväzných právnych predpisov, Vysoké Tatry, Tatranská Lomnica: ELSEWA s.r.o., 2024, s. 68-82. (2024ITA26 VETUNI)

2. KALUŽA, M. Rychlé detekční metody a jejich potenciál pro monitoring hygieny prostředí zvířat ve srovnání s plotnovými metodami. In: *XV. KONFERENCE DDD, Přívorovy dny*, Poděbrady, 2024, s. 20. (2024ITA26 VETUNI)
3. MACHÁČEK, M. Mikrobiologické metody a možnosti rychlé detekce čistoty prostředí. (Microbiological methods and quick detection of environmental hygiene). In: *Ochrana zvířat a welfare Sborník příspěvků*. Brno: VETUNI, 2024, s. 452-458. (2024ITA26 VETUNI)
4. MACHÁČEK, M. Mikrobiologické vyšetřovací metody – minulost, současnost, budoucnost. In: *XV. KONFERENCE DDD, Přívorovy dny*, Poděbrady, 2024, s. 19. (2024ITA26 VETUNI)

Cíl 3: Zhodnocení welfare psů využívaných při canisterapii na základě analýzy chování v průběhu trvání terapeutické intervence

Publikace ve vědeckém časopise s IF

1. VACUŠKA, D., VACUŠKOVÁ, Z., KOTIANOVÁ, L., KOVÁČOVÁ, L., VOŠLÁŘOVÁ, E., VEČEREK, V. Behaviorální projevy psů v průběhu canisterapeutické praxe. (2024ITA26 VETUNI) - *v přípravě pro časopis Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*

Další publikační výstupy

1. **VACUŠKA, D., VACUŠKOVÁ, Z., KOVÁČOVÁ, L., KOTIANOVÁ, L., VOŠLÁŘOVÁ, E., VEČEREK, V.** Behavioral responses of canistherapy dogs. In XXI Congress of the Portuguese Ethological Society. Lisboa, 2024, s. 58. (2024ITA26 VETUNI)
2. **KOTIANOVÁ, L.** Hodnotenie rozdielov v prejavocho správania psov v súvislosti s odlúčením od majiteľa. In: *XXII. ročník vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou: ZVIERATÁ: Problémy súvisiace s chovom zvierat vo svetle všeobecne záväzných právnych predpisov*, Vysoké Tatry, Tatranská Lomnica: ELSEWA s.r.o., 2024, s. 9-13. (2024ITA26 VETUNI)

Cíl 4: Posouzení faktorů ovlivňujících koncentraci kortizolu v srsti koček při hodnocení pohody zvířat

Publikace ve vědeckém časopise s IF

1. VOJTKOVSKÁ, V., ŠEBÁNKOVÁ, M., KONEČNÁ, N., KOVAŘÍKOVÁ, S., ŠTEPÁNKOVÁ, K. Faktory ovlivňující koncentraci kortizolu v srsti koček. (2024ITA26 VETUNI) - *v přípravě pro časopis Frontiers in Veterinary Science*

Další publikační výstupy

1. VOJTKOVSKÁ, V., ŠEBÁNKOVÁ, M. Možnosti analýzy kortizolu ze srsti koček. (Options for cortisol analysis from the fur of cats). In *Zborník publikácií z XXII. ročníka vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou ZVIERATÁ: Problémy súvisiace s chovom zvierat vo svetle všeobecne záväzných právnych predpisov*. Tatranská Lomnica, SR, Elsewa, 2024, s. 61-67. (2024ITA26 VETUNI)

Cíl 5: Posouzení vlivu enrichmentu v chovech morčat na jejich behaviorální projevy

Publikace ve vědeckém časopise s IF

1. VACUŠKOVÁ, Z., VACUŠKA, D., KOVÁČOVÁ, L., KOTIANOVÁ, L., VOŠLÁŘOVÁ, E., VEČEREK, V. Posouzení vlivu enrichmentu na behaviorální projevy morčat domácích. (2024ITA26 VETUNI) - v přípravě pro časopis *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*

Další publikační výstupy

1. VACUŠKOVÁ, Z., VACUŠKA, D., KOVÁČOVÁ, L., KOTIANOVÁ, L., VOŠLÁŘOVÁ, E., VEČEREK, V. Influence of housing dimensions and enrichment on behavioural expression in domestic guinea pigs. In XXI Congress of the Portuguese Ethological Society. Lisboa, 2024, s. 62. (2024ITA26 VETUNI)

Cíl 6: Hodnocení akutní stresové reakce u alpak (*Vicugna pacos*) pomocí neinvazivních metod

Publikace ve vědeckém časopise s IF

1. KADLECOVÁ, G., ŠEBÁNKOVÁ, M., VOŠLÁŘOVÁ, E., VEČEREK, V. Využití infračervené termografie při hodnocení akutní stresové reakce u alpak (*Vicugna pacos*) – pilotní studie. (2024ITA26 VETUNI) - v přípravě pro časopis *Acta Veterinaria Brno*

Další publikační výstupy

1. ŠEBÁNKOVÁ, M., KADLECOVÁ, G., HUSÁKOVÁ, T., KALUŽA, M., VOŠLÁŘOVÁ, E. Možnosti monitoringu akutní stresové reakce u alpak. (Possibilities of monitoring acute stress reaction in alpacas). *Veterinářství*, 2024, roč. 74, č. 11, s. 610-615. (2024ITA26 VETUNI)
2. ŠEBÁNKOVÁ, M., KADLECOVÁ, G. Hodnocení welfare lam alpak s využitím neinvazivních metod. (Evaluation of the welfare of alpaccas using non-invasive methods). In *Zborník publikácií z XXII. ročníka vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou Zvierata: Problémy súvisiace s chovom zvierat vo svetle všeobecne záväzných právnych predpisov, 22. ročník vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou*. Tatranská Lomnica, Slovensko, 2024, s. 55-60. (2024ITA26 VETUNI)

Cíl 7: Stanovení referenčních rozmezí poměru proteinu ke kreatininu v moči pro hodnocení zdravotního stavu a pohody koní

Publikace ve vědeckém časopise s IF

1. KOVAŘÍKOVÁ, S., BLAHOVÁ, J., VAŠKOVÁ, N., ŠTEFFENOVÁ, V., JAHN, P. Poměr proteinu ke kreatininu v moči koní: stanovení referenčního rozmezí a posouzení vlivu věku a pohlaví. (2024ITA26 VETUNI) – v přípravě pro časopis *Veterinary Clinical Pathology*

Cíl 8: Zhodnocení zatížení hospodářských zvířat cizorodými látkami na základě monitoringu cizorodých látek v krmivech, u živých zvířat v hospodářstvích a v surovinách živočišného původu z pohledu dopadu na zdraví a pohodu zvířat

Publikace ve vědeckém časopise s IF

1. CHLOUPEK, P., MAČÁKOVÁ, P., JOZEFOVÁ, J., NOVOTNÁ KRUŽÍKOVÁ, K. Zhodnocení výsledků monitoringu cizorodých látek ve vztahu ke zdraví a welfare hospodářských zvířat. (2024ITA26 VETUNI) – v přípravě pro časopis *Acta Veterinaria Brno*
2. NOVOTNÁ KRUŽÍKOVÁ, K., HARUŠTIÁKOVÁ, D., VLASÁKOVÁ, V., JOZEFOVÁ, J., SVOBODOVÁ, Z., CHLOUPEK, P., SVOBODA, M. Dlouhodobá studie hladin kadmia v tkáních kůzlat a koz v České republice (Střední Evropa). (2024ITA26 VETUNI) – v oponentském řízení v časopise *Acta Veterinaria Brno*

Cíl 9: Zhodnocení zatížení řek Moravy a Dyje rtutí ve vztahu ke zdraví a welfare ryb na základě posouzení obsahu celkové rtuti ve svalovině ryb

Publikace ve vědeckém časopise s IF

1. NOVOTNÁ KRUŽÍKOVÁ, K., LINHART, P., SVOBODOVÁ, Z. Zhodnocení zatížení řek Moravy a Dyje rtutí ve vztahu ke zdraví a welfare ryb na základě posouzení obsahu celkové rtuti ve svalovině ryb. (2024ITA26 VETUNI) - v přípravě pro časopis *Acta Veterinaria Brno*

Další publikační výstupy

1. NOVOTNÁ KRUŽÍKOVÁ, K., LINHART, P., SVOBODOVÁ, Z. Total mercury content in fish of the lower reaches of the Morava River. In: *1. Společná konference farmakologických společností 2024*, Ostrava: City Campus Ostravské univerzity, 2024, s. 73. (2024ITA26 VETUNI)
2. NOVOTNÁ KRUŽÍKOVÁ, K., LINHART, P., SVOBODOVÁ, Z. Hodnocení obsahu rtuti v rybách z dolního toku řeky Moravy a Dyje. (Assessment of mercury content in fishes from the lower reaches of Morava and Dyje rivers). In: *Toxicita biodegradability odpadů a látek významných ve vodním prostředí. XXI. toxikologická konference. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV, Vodňany*, s. 17. (2024ITA26 VETUNI)

Cíl 10: Komplexní posouzení účinků herbicidu glyfosátu a jeho degradačního produktu aminomethylfosfonové kyseliny (AMPA) při výskytu v povrchových vodách na zdraví a pohodu kapra obecného (*Cyprinus carpio*)

Publikace ve vědeckém časopise s IF

1. BLAHOVÁ, J., KORIAKINA, E., MIKULA, P., MARŠÁLEK, P., MODRÁ, H. Komplexní posouzení účinků herbicidu glyfosátu a jeho degradačního produktu aminomethylfosfonové kyseliny (AMPA) na kapra obecného (*Cyprinus carpio*). (2024ITA26 VETUNI) – v přípravě pro časopis *Science of the Total Environment*

Další publikační výstupy

1. BLAHOVÁ, J., KORIAKINA, E., MIKULA, P., SVOBODOVÁ, Z. Toxicity of glyphosate and its degradation product aminomethylphosphonic acid on selected markers of common carp (*Cyprinus carpio*). In: *1. Společná konference Farmakologických společností 2024 - Toxcon. Sborník příspěvků. 13.-15.6.2024, Ostrava.*
2. MIKULA, P., BLAHOVA, J., KORIAKINA, E. Glyphosate and its main degradation product, the aminomethylphosphonic acid (ampa), as the important environmental contaminants with significant toxic potencial in fish. In: *1. Společná konference Farmakologických společností 2024 - Toxcon. Sborník příspěvků. 13.-15.6.2024, Ostrava.*

Cíl 11: Zhodnocení účinku látek používaných v kosmetickém průmyslu (lauryl sulfátu sodného a quaternia), jejichž rezidua kontaminují povrchové vody, na zdravotní stav a welfare vodních organismů

Publikace ve vědeckém časopise s IF

1. ZICARELLI, G., IMPELLITTERI, F., FAGGIO, C., BLAHOVA, J., SVOBODOVA, Z., HESOVA, R., RIESOVA, B., VARGOVA, M. F., PICCIONE, G., MULTISANTI, C. R., LAKDAWALA, P. Effects of a common surfactant sodium lauryl sulfate on early life stages of two fish and one amphibian species. *Water Air and Soil Pollution*, 2024, vol. 235, no. 12, article nr. 807. (2024ITA26 VETUNI)

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	1 726 588	1 726 588,00
Služby	196 160	176 202,37
Cestovné	38 571	34 837,40
Další provozní náklady	1 235 340	1 259 031,23
Doplňkové náklady	479 500	479 500,00
Celkem	3 676 159	3 676 159,00

Zdůvodnění nákladů:

Náklady na řešení projektu byly čerpány v souladu s rozhodnutím o přidělení finančních prostředků, vzhledem k nižším cenám došlo k nedočerpání částky přidělené na Služby a Cestovné a celkem 23 691,23 Kč bylo převedeno do kategorie Další provozní náklady, ve které bylo čerpání o tuto částku navýšeno.

Osobní náklady:

Položka „Osobní náklady celkem“ zahrnuje odměny a odvody akademických pracovníků (Prof. Ing. Eva Voslášková, Ph.D., Prof. MVDr. Vladimír Večerek, CSc., MBA, Prof. MVDr. Zdeňka Svobodová, DrSc., Doc. Ing. Jana Blahová, Ph.D., Doc. MVDr. Petr Chloupek, Ph.D., Doc. Mgr. Petr Maršálek, Ph.D., Doc. MVDr. Helena Modrá, Ph.D., MVDr. Jana Jozefová, Ph.D., MVDr. Gabriela Kadlecová, Ph.D., MVDr. Michal Kaluža, Ph.D., MVDr. Simona Kovaříková, Ph.D., Mgr. Petr Linhart, Ph.D., MVDr. Petra Mačáková, Ph.D., MVDr. Miroslav Macháček, Ph.D., MVDr. Přemysl Mikula, Ph.D., Ing. Kamila Novotná Kružíková, Ph.D., MVDr. Monika Šebánková, Ph.D., Mgr. Veronika Vojtkovská, Ph.D., Mgr. Bc. Renáta Hesová, Mgr. Lucie Kováčová) a stipendia studentů DSP (Mgr. Lucia Kotianová, Mgr. Dominik Vacuška, Mgr. Zdeňka Vacušková, Mgr. Naďa Konečná, MVDr. Ekaterina Koriakina, Mgr. Barbora Riesová, Mgr. Michaela Frederika Vargová), kteří byli součástí řešitelského týmu a podíleli se na řešení tohoto projektu.

Odměny byly vyplaceny v celkové výši 1 136 894 Kč a stipendia v celkové výši 220 000 Kč. Odvody na zákonné zdravotní a sociální pojištění činily celkem 369 694 Kč. Celkem bylo v položce osobní náklady vyčerpáno 1 726 588 Kč.

Služby:

Položka „Služby“ zahrnuje náklady, které byly využity na servis a kalibraci přístrojů využívaných při řešení projektu (analyzátor, mikroskop, chromatograf, termokamera), pronájem 2 ks kyslíkových lahví a na úhradu vložného při aktivní účasti spoluřešitelů projektu na tuzemských konferencích (3x Toxcon, 1x Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí, 2x Přívorovy dny, 2x konference ČSEtS). Celkové náklady v této položce byly 176 202,37 Kč, zbývající částka ve výši 19 957,63 Kč byla převedena do položky Další provozní náklady.

Cestovné:

Položka „Cestovné“ zahrnuje náklady související s aktivní účastí spoluřešitelů projektu na tuzemských konferencích (3x Toxcon, 1x Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí, 2x konference ČSEtS), tj. jízdné, stravné a ubytování ve výši 34 837,40 Kč. Zbývající částka ve výši 3 733,60 Kč byla převedena do položky Další provozní náklady.

Další provozní náklady:

Položka „Další provozní náklady“ představuje finanční prostředky, které byly využity pro nákup testovaných organismů a prostředků nezbytných pro realizaci testů toxicity (tzn. krmivo, akvaristické potřeby), komerčních kitů a kontrolního séra pro biochemické vyšetření, chemikálií pro hematologické a histologické vyšetření, testovaných chemikálií, ELISA kitů pro hodnocení endokrinní disrupce, ELISA kitů pro stanovení ukazatelů oxidativního stresu, chemikálií a spotřebního materiálu pro chromatografickou analýzu účinné látky, chemikálií pro analýzu ukazatelů oxidativního stresu, chemikálií pro genovou expresi, spotřebního materiálu (např. špičky, Pasteurovy pipety, odběrové nádoby) pro odběr a skladování vzorků, spotřebního materiálu (např. kyvety, kepičky, špičky, Eppendorf zkumavky, mikrotitrační destičky) pro zpracování vzorků, chemikálií pro analýzu parametrů vody, RNA later, kitů pro vyšetření krevních plynů, skleněné elektrody do pH metru využívané při přípravě roztoků pro analýzu, elektrody do multimetru využívané pro vyšetření vody, SPE kolonek pro přípravu vzorků a dalšího spotřebního laboratorního materiálu (spalovací lodičky k AMA 254, pytlíky, sáčky, špičky k pipetám, buničitá vata, laboratorní sklo, rukavice, Petriho misky, Eppendorf zkumavky, Pasteurovy pipety, odběrové nádoby, kyvety, kepičky, membránové filtry, sterilní špičky, stěrové tampóny apod.).

Dále byl zakoupen medicínální kyslík, dezinfekční prostředky (etanol), spotřební materiál pro luminometr, diagnostické proužky pro základní screening moči, diagnostické kity pro vyšetření chemických parametrů s využitím biochemického analyzátoru (např. protein, kreatinin), komerční kity pro elektroforetické stanovení proteinu, kalibrátory a kontroly pro chemické vyšetření moči, spotřební materiál pro biochemické vyšetření s využitím analyzátoru (např. kyvety, kepičky), spotřební materiál pro odběr vzorků moči (např. zkumavky, odběrové nádoby, misky pro sběr moči), spotřební materiál pro zpracování vzorků před analýzou (např. Eppendorf zkumavky, mikrotitrační destičky, destičky pro vyšetření moč. sedimentu, špičky, jehly, refraktometry, pH metry, Pasteurovy pipety, špičky), SPE kolony pro úpravu vzorků před analýzou, testované organismy a chemikálie pro testování embryotoxicity, chemikálie pro analýzu biomarkerů, spotřební materiál pro chromatografickou analýzu a ELISA kity pro stanovení kortizolu. Další část finančních prostředků byla využita pro zakoupení kancelářských potřeb, které byly využity pro účely realizace předkládaného projektu. Celkové náklady v této položce byly 1 259 031,23 Kč.

Celkové náklady v položce Další provozní náklady byly čerpány ve výši 1 259 031,23 Kč (původně přidělená částka byla navýšena o 23 691,23 Kč převedených z položky Služby a Cestovné).

Doplňkové náklady:

Položka „Doplňkové náklady“ představuje režijní náklady ve výši 479 500 Kč.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě je doložen výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2024 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude odkazovat na podporu ITA VETUNI. Výhradní odkaz na projekt ITA VETUNI (bez odkazů na podporu z dalších grantů, projektů a jim obdobných finančních zdrojů) musí obsahovat vždy nejméně jedna publikace s impakt faktorem na každých 1,5 milionu korun způsobilých nákladů projektu, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis

řešitelky projektu:

6. 1. 2025

prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D.

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2024 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu odpovědného za čerpání prostředků:

6. 1. 2025

prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D.

Přednosta ústavu potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu, který řídí.

Datum, jméno a podpis

přednosty ústavu:

6. 1. 2025 prof. MVDr. Vladimír Večerek, CSc., MBA

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:

Ing. Josef Kupčík

Děkanka fakulty potvrzuje, že fakulta provedla kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis

děkanky fakulty:

doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

Razítko

Příloha:

Vypracované články k publikaci k naplnění jednotlivých cílů projektu

Cíl 1: Posouzení úrovně welfare hospodářských zvířat při přepravě na jatky na základě analýzy úhynů v souvislosti s přepravou

ÚHYNÝ ZVÍŘAT PŘI PŘEPRAVĚ NA JATKY Z POHLEDU OCHRANY ZVÍŘAT PROTI TÝRÁNÍ

Eva Justová¹, Vladimír Večerek¹, Eva Voslářová¹, Zbyněk Semerád², Lenka Válková¹

¹ Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, ² Státní veterinární správa ČR

Abstrakt

Cílem práce bylo zjistit úroveň úhynů zvířat (počty uhynulých zvířat) při jejich přemístování na jatky pro jednotlivé druhy a kategorie přepravovaných zvířat a posoudit je na základě porovnání mezi jednotlivými druhy a kategoriemi přepravovaných zvířat. Cílem bylo také zjistit trendy (vývojové směry) v úrovni úhynů jednotlivých druhů a kategorií zvířat při jejich přepravě na jatky při porovnání prvního a posledního období celkového sledovaného časového úseku a na základě zjištěných trendů posoudit, zda-li dochází k zlepšování a nebo k zhoršování situace v přepravě zvířat na jatky.

Práce vychází z údajů dozorové činnosti úředních veterinárních lékařů nad přepravou zvířat na jatky v období let 2017 až 2023. Byla hodnocena přeprava skotu v členění na kategorie krávy (763 062 zvířat), jalovice (197 018 zvířat), býci (679 556 zvířat) a telata (59 200 zvířat), dále prasat v členění na kategorie prasnice 348 141 zvířat), vykrmovaná prasata (15 821 391 zvířat) a selata (97 785 zvířat), dále malých přežvýkavců v členění na kozy (1 169 zvířat) a kůzlata (6 196 zvířat), ovce (15 442 zvířat) a jehňata (71 359 zvířat), dále králíků (1 806 815 zvířat), dále drůbeže v členění na husy (48 988 zvířat), kachny (28 012 184 zvířat), krůty (1 075 070 zvířat), brojlerů (kura domácího) (807 874 546 zvířat) a nosnice (kura domácího) (11 503 789 zvířat), a dále pštrosů (4 226 zvířat).

Ze zjištěné úrovně úhynů a trendů v úhynech zvířat při jejich přepravě na jatky vyplývá, že by měl být zvýšen důraz na odlišné a v tomto smyslu příznivější nastavení podmínek přepravy na jatky s cílem zohlednění welfare přepravovaných zvířat s nižší kondicí u selektivně vyřazovaných zvířat (telat, selat); dále ve smyslu příznivějšího nastavení podmínek přepravy na jatky z hlediska zohlednění welfare přepravovaných zvířat zatížených nižší kondicí z pohledu intenzivní produkce předcházející přepravě (zejména u krav, prasnic a nosnic); důslednější dodržování podmínek welfare při přepravě na jatky by mělo být zejména u jalovic, vykrmovaných prasat, a dále kachen a krůt; u králíků by mělo být doporučeno porážení zvířat v místě výkrmu, u brojlerů i přes zlepšující se trend by mělo být záměrem zlepšit podmínky přepravy, poměrně dobrá úroveň se ukázala u býků; velmi dobrá úroveň je u koz, kůzlat, ovcí a jehňat, a dále u hus a pštrosů.

Úvod

Podstatnou součástí ochrany hospodářských zvířat a zajišťování dobrých životních podmínek pro tato zvířata je nastavení a dodržování podmínek přepravy těchto zvířat na jatky. Podmínky přepravy určuje právní nastavení formou právních předpisů, případné nedostatky v tomto nastavení doložitelné objektivními zjištěními by měly být napravovány změnou těchto právních předpisů iniciovanou dozorovými orgány. Dodržování podmínek přepravy je povinností přepravců hospodářských zvířat a dozor nad dodržováním těchto podmínek vykonávají úřední veterinární lékaři, případné nedostatky doložitelné objektivními zjištěními jsou postihovány odpovědnými orgány státní správy anebo orgány v trestním řízení.

Neodpovídající nastavení podmínek přepravy hospodářských zvířat na jatky anebo nedodržení podmínek přepravy ze strany přepravců hospodářských zvířat se projevuje u zvířat na různé úrovni, a to jako změny chování, subklinické změny ukazatelů stresového zatížení, bolesti anebo utrpení zvířat, nebo jako klinické změny dokládající patofyziologické procesy u zvířat, případně jako změny zdravotního stavu s projevy stresu, bolesti, utrpení, poškození nebo nemocí u zvířat. Nejzákladnější porušování dobrých životních podmínek pro zvířata v průběhu přepravy se projevují úhyny zvířat při přepravě anebo po přepravě na jatky, nutností utracení zvířat při přepravě anebo po jejich přepravení na jatky anebo nutným poražením zvířat při přepravě a přeřazením zvířat na nutnou porážku po jejich přepravení na jatky.

Úroveň úhynů zvířat, utracení zvířat anebo nutné porážení zvířat v souvislosti s přepravou na jatky dokládá víceméně, zda-li právní nastavení podmínek pro přepravu zvířat a jejich dodržování přepravci odpovídá požadavkům na dobré životní podmínky zvířat v průběhu přepravy na jatky pro jednotlivé druhy a kategorie zvířat, a to se zohledněním také určitých specifit, které by měly odlišovat schopnost úspěšného vyrovnání se s podmínkami přepravy zvířat v dobré nebo standardní kondici a zvláště přepravy zvířat v snížené kondici způsobené vývojem zvířat nebo intenzitou jejich využívání k produkci masa, mléka, vaječ a nebo případně dalších produktů.

Zkušenosti ukazují, že je významný rozdíl v požadavcích na dobré životní podmínky zvířat pro jejich přepravu na jatky mezidruhově (například vykrmovaný skot a vykrmovaná prasata), tak mezi jednotlivými kategoriemi uvnitř příslušného druhu (například vykrmovaný skot a dojnice), tak mezi zvířaty s různou kondicí uvnitř příslušné kategorie zvířat (například vyřazovaná telata z chovu a telata vykrmená k porážení).

Zhodnocení naplňování požadavků na dobré životní podmínky zvířat při jejich přepravě na jatky na základě úhynů zvířat, nezbytnosti utracení zvířat anebo jejich nutné porážky v souvislosti s přepravou zvířat za několikaleté období a posouzení trendů v projevech dopadajících na život zvířat v souvislosti s přepravou zvířat na jatky dává konkrétní pohled na legislativní nastavení podmínek pro přepravu zvířat a jejich dodržování přepravci zvířat na pozadí požadavků jednotlivých druhů, kategorií a kondičních skupin zvířat při jejich přepravě na jatky.

Cílem práce bylo zjistit míru nepříznivého dopadu úrovně přepravovaných zvířat na jatky projevujícího se úhynů zvířat při přepravě anebo po přepravě na jatky, nutností utracení zvířat při přepravě anebo po jejich přepravení na jatky anebo nutným poražením zvířat při přepravě a přeřazením zvířat na nutnou porážku po jejich přepravení na jatky (dále souhrnně označovaných v práci jako úhynů zvířat při přepravě).

Materiál a metodika

Údaje o výsledcích dozorové činnosti úředních veterinárních lékařů nad přepravou zvířat na jatky byly získány ve spolupráci se Státní veterinární správou ČR. Bylo hodnoceno období 7 let od roku 2017 do roku 2023.

Byla hodnocena přeprava skotu v členění na kategorie krávy (763 062 zvířat), jalovice (197 018 zvířat), býci (679 556 zvířat) a telata (59 200 zvířat), dále prasat v členění na kategorie prasnice 348 141 zvířat), vykrmovaná prasata (15 821 391 zvířat) a selata (97 785 zvířat), dále malých přežvýkavců v členění na kozy (1 169 zvířat) a kůzlata (6 196 zvířat), ovce (15 442 zvířat) a jehňata (71 359 zvířat), dále králíků (1 806 815 zvířat), dále drůbeže v členění na husy (48 988 zvířat), kachny (28 012 184 zvířat), krůty (1 075 070 zvířat), brojlerů (kura domácího) (807 874 546 zvířat) a nosnice (kura domácího) (11 503 789 zvířat), a dále pštrosů (4 226 zvířat).

Byla zjišťována úroveň úhynů pro jednotlivé druhy a kategorie zvířat přepravovaných na jatky. Z absolutních počtů přepravených zvířat a absolutních počtů uhynulých zvířat byla vypočítána relativní četnost v procentech úhynů pro jednotlivé druhy a kategorie zvířat. Na základě statistického porovnání úrovně úhynů mezi kategoriemi a jednotlivými druhy přepravovaných zvířat a na základě dovození možného zlepšení situace v úhynech jednotlivých druhů a kategorií zvířat při jejich přepravě na jatky byla posouzena úroveň úhynů pro jednotlivé druhy a kategorie zvířat přepravovaných na jatky.

Dále byly zjišťována trendy v úhynech pro jednotlivé druhy a kategorie zvířat přepravovaných na jatky. Byly zjištěny absolutní počty přepravených zvířat na jatky pro jednotlivé roky sledovaného období a dále byly vypočítány z absolutních počtů přepravených zvířat na jatky a z absolutních počtů zvířat uhynulých při přepravě na jatky relativní četnosti uhynulých zvířat při přepravě na jatky pro jednotlivé roky sledovaného období. Z absolutních počtů přepravených zvířat za první období (označované jako posuzované první období) (období let 2017 až 2019) a z absolutních počtů přepravených zvířat za poslední (označované jako posuzované druhé období) období (období let 2021 až 2023) byl statistickým porovnáním hodnot obou období zjištěn trend ve vývoji počtů zvířat přepravovaných na jatky pro jednotlivé druhy a kategorie zvířat. Z absolutních počtů přepravených zvířat a absolutních počtů uhynulých zvířat za první období (období let 2017 až 2019) byla vypočítána relativní četnost v procentech úhynů pro jednotlivé druhy a kategorie zvířat a z absolutních počtů přepravených zvířat a absolutních počtů uhynulých zvířat za poslední období (období let 2021 až 2023) byla vypočítána relativní četnost v procentech úhynů pro jednotlivé druhy a kategorie zvířat a statistickým porovnáním hodnot obou období byl zjištěn trend ve vývoji počtů zvířat uhynulých při přepravě na jatky pro jednotlivé druhy a kategorie zvířat. Míra změny byla vyjádřena jako relativní hodnota v procentech vypočítaná jako poměr rozdílu absolutních počtů druhého a prvního období k absolutnímu počtu prvního období, a to v procentech. Významnost rozdílů byla posouzena statistickým porovnáním relativních četností prvního a posledního období. Tyto hodnoty dokládaly míru trendové změny v počtech zvířat přepravených na jatky a v počtech uhynulých zvířat při přepravě na jatky pro jednotlivé druhy a kategorie přepravovaných zvířat. Na základě zjištěných trendů v úrovni úhynů bylo posouzeno, zda-li dochází k zlepšování a nebo k zhoršování situace

v přepravě zvířat na jatky a případně byly dovozeny souvislosti pro welfare zvířat spojené s jednotlivými trendy v úhynech zvířat při přepravě na jatky.

Statistické posuzování vycházelo z porovnávání relativních četností pomocí χ^2 testu s určováním statistické významnosti na hladině $p \leq 0,05$. Výpočty byly provedeny pomocí programu Excel Microsoft Office Professional Plus 2019.

Výsledky a diskuze

Skot

U skotu se statistickou významností k nejvyšším úhynům došlo u telat (0,297 %), poté u krav (0,059 %), následně u jalovic (0,017 %) a nejméně u býků (0,010 %).

Z pohledu trendu ve vývoji zvířat přepravovaných na porážku došlo se statistickou významností k poklesu u býků, krav a telat a vzestupu u jalovic.

V trendu ve smyslu změn v počtech uhynulých zvířat byla situace odlišná podle jednotlivých kategorií zvířat, došlo se statistickou významností k zhoršení (k zvýšení počtu uhynulých) u telat a jalovic, počty se nezměnily u býků, k zlepšení (k snížení počtu uhynulých) došlo u krav.

Nejhorší (nejvyšší) úhyny u telat lze vysvětlit systémem chovu skotu, kdy na porážku nejsou přepravována všechna telata, ale jen telata s nižší kondicí, telata s lepší kondicí zůstávají v chovu s cílem odchovu jalovic anebo k výkrmu býků. U vyšších úhynů v rámci skotu, a to u krav, je tato situace vysvětlitelná skutečností, že na jatky jsou odesílána zvířata po skončení svého produktivního období, tzn. v horší kondici (ve srovnání např. s býky nebo jalovicemi) a pozitivní je zde zaznamenání trendu zlepšování (snížování úhynů). U jalovic je negativní trend zhoršování (zvýšování úhynů), který by mohl být vysvětlitelný vyšší brakací jalovic, tzn. zvýšeným počtem přepravy na jatky jalovic s nižší kondicí, což by se mělo projevit ve vyšším počtu přepravovaných jalovic na jatky a v nižším počtu přepravovaných krav na jatky (snížený počet krav omezuje počet vyřazovaných a na jatky posílaných krav), což výsledky ukazují – statistické zvýšení počtu přepravovaných jalovic na jatky o 3,7 % a statistické snížení počtu přepravovaných krav na jatky o 19,3 %. U býků je v porovnání s ostatními kategoriemi skotu nejnižší úroveň úhynů při přepravě na jatky, což je vysvětlitelné jejich nejvyšší kondicí při přepravě na jatky a pozitivní je zachování tohoto nízkého počtu úhynů zvířat při přepravě na jatky.

Prasata

U prasat k nejvyšším úhynům došlo se statistickou významností u selat a prasnic (0,206 % a 0,184 %) a nejméně u prasat ve výkrmu (0,063 %).

V trendu ve smyslu změn v počtech uhynulých zvířat lze spatřovat celkové zhoršování situace, došlo se statistickou významností k zhoršení (k zvýšení počtu uhynulých) u selat a výkrmu, počty se nezměnily u prasnic.

Nejhorší (nejvyšší) úhyny u selat lze vysvětlit obdobně jako u telat, tj. systémem chovu, kdy na porážku nejsou přepravována všechna selata, ale jen selata s nižší kondicí, selata s lepší kondicí zůstávají v chovu s cílem odchovu prasniček anebo k výkrmu prasat. U vyšších úhynů v rámci prasat, a to u prasnic, je tato situace vysvětlitelná skutečností, že na jatky jsou odesílána zvířata po skončení svého produktivního období, tzn. v horší kondici (ve srovnání např. s prasaty ve výkrmu) a negativní je, že nebyl zaznamenán trend zlepšování (snížování úhynů) v počtech vyšších úhynů prasnic (ve

srovnání např. s krávy). U prasat ve výkrmu je v porovnání s ostatními kategoriemi prasat nejnižší úroveň úhynů při přepravě na jatky, což je vysvětlitelné jejich nejvyšší kondicí při přepravě na jatky, avšak negativní je trend zhoršování tohoto pozitivního počtu úhynů zvířat při přepravě na jatky.

Ovce a kozy

U malých přežvýkavců došlo se statistickou významností k nejvyšším úhynům u koz (0,171 %), poté u ovcí a jehňat a kůzlat (0,013 % a 0,008 % a 0,000 %).

Situaci u malých přežvýkavců lze hodnotit jako velmi dobrou, protože rozsah úhynů v absolutních číslech je velmi nízký (za celé sledované období sedmi let uhynula v souvislosti s přepravou na jatky u koz 2 zvířata, u kůzlat 0 zvířat, u ovcí 2 zvířata a u jehňat 6 zvířat). V trendu ve smyslu změn v počtech uhynulých zvířat lze spatřovat celkově velmi dobrou situaci, protože počet uhynulých zvířat poklesl anebo zůstal na úrovni nula, v počtech uhynulých se se statistickou významností situace tak nezměnila a byla celkově velmi dobrá, a to jak u koz, kůzlat, ovcí i jehňat.

Králíci

U králíků (0,191 %) byly úhyny porovnány s jinými druhy a kategoriemi zvířat ve výkrmu, a tato úroveň byla zjištěna jako jedna z nejhorších v porovnání s jinými vykrmovanými druhy a kategoriemi jatečných zvířat, konkrétně se statistickou významností byly úhyny vyšší než u býků, prasat ve výkrmu, jehňat a kůzlat, a také vyšší než u kachen, krůt a hus; nižší byly jen ve srovnání s brojlerů (kura domácího). Tuto skutečnost lze přičítat biologické konstituci králíků, kteří velmi citlivě reagují na stres způsobovaný přepravou, a dopadem je zvýšený úhyn králíků při jejich přepravě na jatky. Nicméně, systém přepravy králíků by měl na tuto skutečnost reagovat a změnit podmínky přepravy tak, aby byla více přizpůsobena požadavkům welfare králíků při přepravě a došlo tak ke snížení úrovně úhynů králíků při přepravě na jatky. Praxe nachází i další řešení této nepříznivé situace, a to, že porážky jatečných králíků jsou budovány přímo u velkochovů králíků a tím jsou eliminovány negativní důsledky přepravy králíků ve smyslu vyšších úhynů zvířat při přepravě na jatky.

V trendu ve smyslu změn v počtech uhynulých zvířat byla situace se statistickou významností se celkově zlepšující. Toto zjištění ukazuje, že přeprava králíků na jatky reaguje na nepříznivou situaci v úhyněch králíků při přepravě na jatky a zlepšuje podmínky přepravy ve smyslu vyššího welfare králíků, které se v dlouhodobém trendu projeví zlepšením (snížením počtů úhynů) v počtech úhynů při přepravě králíků na jatky v posledních letech sledovaného období (s výjimkou roku 2022).

Drůbež

U drůbeže se statistickou významností k nejvyšším úhynům došlo u brojlerů (0,471 %), poté u nosnic (0,452 %), následně u kachen (0,160 %), pak u krůt (0,151 %) a nejméně u hus (0,000 %).

U brojlerů lze tuto situaci hodnotit jako nepříznivou, protože ve srovnání s nosnicemi by na jatky měla přicházet zvířata v lepší kondici, než je kondice nosnic víceméně snížená intenzivním produkčním obdobím. Úhyny brojlerů by měly být řešeny ve smyslu změny podmínek přepravy ve smyslu posilování welfare přepravovaných zvířat s vědomím, že současná technologie přepravy vede k úhynu provázenému utrpením (na rozdíl od porážky zvířat na jatkách) téměř 550 000 živých bytostí ročně. U nosnic je situace vyšší úrovně úhynů vysvětlitelná nižší kondicí zvířat oslabených intenzivní produkcí vajec v období předcházejícímu přepravě na jatky, nicméně tak jako u brojlerů by podmínky přepravy měly být přizpůsobeny této skutečnosti a welfare přepravovaných zvířat by mělo být posilováno tak, aby se počty téměř 7 500 uhynulých zvířat ročně při přepravě na jatky výrazně snížily. U kachen a krůt je situace významně lepší (nižší počet uhynulých zvířat ve vztahu k počtu přepravovaných na jatky), nicméně požadavkem by mělo být zvyšování welfare zvířat při jejich

přepřavě na jatky, protože i při relativním nižším počtu uhynulých zvířat se jedná v absolutním počtu o poměrně vysoká čísla uhynulých zvířat, a to zejména u kachen okolo 6500 zvířat a u krůt pak okolo 230 zvířat ročně uhynulých při přepřavě na jatky. U hus je skutečnost v přepřavě zvířat na jatky velmi pozitivní, a to taková, že podmínky přepřavy na jatky jsou ve smyslu welfare zvířat nastaveny a dodržovány na úrovni, že k úhynu zvířat při přepřavě na jatky nedochází.

V trendu ve smyslu změn v počtech uhynulých zvířat byla situace se statistickou významností se zhoršující u kachen a krůt, nezměnila se u nosnic a zlepšila se u brojlerů, a velmi dobrá zůstala u hus. Tato zjištění dokládají, že u brojlerů se situace v posledních letech sledovaného období v počtech uhynulých zvířat při jejich přepřavě na jatky zlepšuje a počty uhynulých zvířat klesají. U nosnic hodnoty posledních let sledovaného období naznačují možné zlepšování situace v počtu úhynů zvířat při přepřavě na jatky, nicméně zatím se statisticky významně neprojeví. Tato zjištění týkající se brojlerů a nosnic ve smyslu počtů jejich úhynů při přepřavě na jatky jsou pozitivní a snižují rozsah utrpení spojeného s přepřavou brojlerů a nosnic při přepřavě na jatky. U kachen je trend úhynů zvířat při přepřavě na jatky negativní (počet uhynulých se zvýšil) a dokládá, že změna v podmínkách přepřavy kachen ve smyslu posilování jejich welfare při přepřavě není pozitivní a úhyn zvířat a tím i jejich utrpení při přepřavě mají tendenci narůstat, což nepochybně vyžaduje řešení. U krůt je celkový trend v úhynech zvířat přepřavovaných na jatky také negativní, nicméně je způsoben zejména velmi nepříznivým rokem 2023, ve kterém došlo k významným počtům úhynů krůt přepřavovaných na jatky (až dvojnásobek ve srovnání se střední hodnotou). Toto zjištění dokládá nevyrovnanost v podmínkách přepřavy krůt na jatky ve smyslu dodržování jejich welfare, které vede k výkyvům v počtu uhynulých zvířat a dopadem je trend nárůstu počtu uhynulých krůt při přepřavě na jatky a tím celkový nárůst utrpení zvířat při jejich přepřavě na jatky. Tato skutečnost vyžaduje řešení ve smyslu prosazení vyššího standardu nastavení a dodržování podmínek přepřavy krůt na jatky.

Pštrosi

U pštrosů nebyly zjištěny žádné úhyny (0,000 %). Tato skutečnost je významně pozitivní a dokládá eliminaci nejvýraznějších dopadů případného utrpení zvířat při jejich přepřavě na jatky. Z pohledu trendu v případných úhynech zvířat přepřavovaných na jatky je u pštrosů situace velmi pozitivní a je zřejmé, že podmínky welfare a jejich dodržování při přepřavě pštrosů jsou na požadované úrovni a k úhynům tak nedochází, což prokázalo sedmileté sledování počtů případných úhynů zvířat přepřavovaných na jatky.

Závěr

Z úrovně úhynů a trendů v úhynech zvířat při jejich přepřavě na jatky vyplývá, že by měl být zvýšen důraz na odlišné a v tomto smyslu příznivější nastavení podmínek přepřavy na jatky s cílem zohlednění welfare přepřavovaných zvířat s nižší kondicí u selektivně vyřazovaných zvířat, a to zejména u telat, selat, dále ve smyslu příznivějšího nastavení podmínek přepřavy na jatky z hlediska zohlednění welfare přepřavovaných zvířat zatížených nižší kondicí z pohledu intenzivní produkce předcházející přepřavě pak zejména u krav, prasnic a nosnic. Z pohledu trendů, které dokládají určitou úroveň nastavení podmínek přepřavy, ale zhoršování jejich dodržování při přepřavě by měl být zvýšen důraz na důslednější dodržování podmínek welfare při přepřavě na jatky zejména jalovic, vykrmovaných prasat, a dále kachen a krůt. U králíků by mělo být doporučení porážení zvířat v místě výkrmu. U brojlerů i přes zlepšující se trend by mělo být záměrem zlepšit podmínky přepřavy a snížit tak vysoký absolutní počet zvířat trpících přepřavou na jatky. Poměrně dobrá úroveň anebo zlepšující trend dokládající dodržování nastavených podmínek přepřavy se ukázala u býků. Velmi dobrá úroveň nastavení podmínek přepřavy a jejich dodržování je u koz, kůzlat, ovcí a jehňat, a dále u hus a pštrosů.

Tato práce byla financována ITA VETUNI (projekt č. 2024ITA26).

Cíl 2: Ověření možnosti hodnocení hygieny prostředí v chovu pomocí rychlé detekční metody měření ATP

ATP TEST A JEHO VYUŽITÍ V MONITORINGU HYGIENY PROSTŘEDÍ NA PORODNÁCH PRASAT VE SROVNÁNÍ S PLOTNOVÝMI MIKROBIOLOGICKÝMI METODAMI

Michal Kaluža, Miroslav Macháček, Vladimír Večerek

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

Abstrakt

Cílem této studie bylo posoudit potenciál luminometrie pro monitoring hygieny prostředí na porodnách prasat. K měření byly využity 3 typy luminometrů: lum. č. 1: Clean-Trace™ LM1, lum. č. 2: EnSure a lum. č. 3: SystemSURE Plus. V naměřených hodnotách byly mezi luminometry potvrzeny statisticky vysoce významné závislosti ($rP = 0,853–0,946$; $p < 0,01$). Variabilita naměřených hodnot nebyla statisticky potvrzena ($p > 0,05$) mezi lum. č. 1 a 2 (obdobná citlivost) a lum. č. 2 a 3 (shodný detekční systém). Praktické použití luminometrie bylo ověřeno v laboratorních podmínkách a dále pak v terénu na porodně prasat. Sledována byla závislost (rP) mezi výsledky měření celkového ATP a tradiční plotnové kultivace. Statisticky významná korelace ($rP = 0,783–0,806$; $p < 0,05$) mezi naměřenými hodnotami celkového ATP v RLU a počtem bakterií stanovených kultivací v KTJ byla potvrzena při hodnocení čisté bakteriální kultury (*E. coli* CCM 3988) inokulované na modelových površích (PVC), a to pro luminometry využívající stěrky Ultrasnap. Měření na porodně prasat ukázalo, že v terénu je závislost mezi hodnotami celkového ATP a výsledky bakteriální kultivace snížena v důsledku přítomného organického znečištění na daném povrchu. Statisticky významné korelace ($p < 0,05$) byly potvrzeny na podlážce ($rP = 0,557–0,822$) a v provozní chodbě ($0,601–0,616$). Zhodnoceny byly dále možnosti rychlé mikrobiální kultivace s využitím systému MicroSnap. Pro stanovení CPM vykazoval systém MicroSnap statisticky významnou korelaci s CPM stanoveným na krevním agaru, která byla v laboratorních podmínkách vyšší ($rP = 0,866$) než v terénu ($rP = 0,589–0,769$). Systémy MicroSnap pro stanovení *Enterobacteriaceae* (EB), koliformních bakterií (KB) a *E-coli* (EC) byly zatíženy rozdíly v korelacích s příslušnými výsledky selektivních agarů, a to v závislosti na místě odběru. Nejvyšší korelace MicroSnap pro stanovení EB byla na podlážce ($rP = 0,843$). Pro KB ($rP = 0,809$) a EC ($rP = 0,884$) byla nejvyšší korelace v provozní chodbě. Srovnání systému MicroSnap a tradičních plotnových metod potvrdilo také statisticky významné rozdíly v počtu stanovených KTJ těmito metodami ($p < 0,01$). Systém Microsnap pro stanovení CPM zaznamenal v průměru o 0,35 log KTJ méně než neselektivní plotnové metody, naopak pro stanovení EB, KB a EC v průměru o 1,53 (EB); 1,44 (KB) a 2,36 (EC) log KTJ více ve srovnání se selektivními plotnovými metodami. Studie prokázala možný potenciál měření celkového ATP pro praktické užití na porodnách prasat, kdy primárně představuje test k určení čistoty povrchů. Systém MicroSnap pak může být v chovech nápomocný pro rychlejší detekci vybraných skupin mikroorganismů. Oba systémy mohou nalézt uplatnění přímo v terénu jako rychlé metody stanovení čistoty prostředí. Přesto však zůstávají, prozatím dílčími metodami tradičních metod bakteriální kultivace.

Úvod

Sledování hygieny prostředí je standardem v nemocnicích a také ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu (Mildenhall and Rankin, 2020; Turner et al., 2010). Monitoring hygieny prostředí má však klíčový význam i v chovech zvířat. Čistota chovného prostředí je jedním z faktorů, které ovlivňují zdraví, welfare i užitkovost zvířat (Heinemann et al., 2020a).

Biologická bezpečnost je pečlivě kontrolována a udržována v chovech laboratorních zvířat (Svoboda et al., 2019). Zde je sanitace všech chovných jednotek a vybavení pro laboratorní zvířata nezbytná z důvodu eliminaci patogenních a oportunně patogenních mikroorganismů (Turner et al., 2010). Zajištění biologické bezpečnosti je žádoucí i v chovech hospodářských zvířat (Yi et al., 2020). Jejím cílem je minimalizovat riziko vniku patogenů do chovu a zabránit jejich šíření v prostředí (Johnson et al., 2024). Základní nástroje biosecurity zahrnují čištění a dezinfekci a využívají se pro zajištění hygieny prostředí v chovech drůbeže (Luyckx et al., 2015). Velký důraz na jejich uplatňování lze pozorovat i v chovech prasat, a to při jejich výkrmu, ale především pak na porodnách (Johnson et al., 2024).

Pro monitoring hygieny prostředí v chovech je tak žádoucí mít k dispozici praktickou, rychlou a také spolehlivou metodu (Chancy et al., 2023; Renaud et al., 2017; Turner et al., 2010). Nejjednodušším způsobem hodnocení je metoda vizuálního posouzení, která je v praxi běžně uplatňována (Heinemann et al., 2020b; Johnson et al., 2024). Viditelné znečištění je indikací k provedení čištění, a to zejména v krmných zařízeních nebo napáječkách. Tato metoda však může být velmi subjektivní (Van Driessche et al., 2023). Absence viditelného makroskopického znečištění navíc nevyklučuje silnou mikrobiální kontaminaci. Pro získání validních výsledků o účinnosti provedení čistících a dezinfekčních postupů je tak nutné použít přesnějších metod.

Celosvětově zlatým standardem monitoringu mikrobiální kontaminace jsou stále plotnové metody, které slouží k přímému stanovení mikroorganismů (Lindell et al., 2018; Yi et al., 2020). V rámci monitoringu hygieny prostředí jsou vzorky získávány pomocí otisků nebo stěrů sledovaných povrchů (Luyckx et al., 2015; Turner et al., 2010).

Slabou stránkou tradiční kultivace je však časová náročnost spojená s přípravou, inkubací a odečtem kolonií (Chancy et al., 2023). Navíc z přítomného spektra mikroorganismů jsou klasickou kultivací stanoveny pouze snadno kultivovatelné, zejména aerobní bakterie a plísňe (Siebel et al., 2008; Turner et al., 2010). Pro ověření jednotlivých postupů sanitace přímo v terénu mají proto omezený význam (Colquhoun et al., 1998).

Významný potenciál pro stanovení čistoty prostředí přímo v chovech zvířat proto v současné době mají rychlé detekční metody, které umožňují poskytnout výsledky přímo v terénu, a to ihned po odběru vzorku (Chancy et al., 2023; Hammes et al., 2008). Tyto metody umožňují přímý (průtoková cytometrie) nebo nepřímý (luminometrie) průkaz mikrobiální kontaminace. Některé postupy lze také využít pro selektivní stanovení bakteriálních kmenů (Meighan, 2014).

Luminometry fungují na principu bioluminiscenčního měření ATP (adenosintrifosfát). ATP je přítomno ve všech buňkách, a to jak živočišných, rostlinných, tak mikrobiálních. Pro vlastní měření je nezbytný substrát luciferin a enzym luciferáza. Ten katalyzuje bioluminiscenční reakci luciferinu a ATP za přítomnosti kyslíku. Výsledkem je emitace světla. Intenzita vyzářeného světla se vyjadřuje v relativních světelných jednotkách (dále RLU – Relative Light Units) a je přímo úměrná množství uvolněné ATP z buněk (Mildenhall and Rankin, 2020). Metodiky použití luminometrů jsou výrobci

zpracovány včetně názorných audiovizuálních návodů a možností interpretace získaných výsledků, což je velkou výhodou pro rychlé osvojení pracovníky v terénu (Osimani et al., 2014). Praktičnost pro použití v terénu zvyšuje i použití standardizovaných komerčně vyráběných odběrových tampónů (Renaud et al., 2017).

Luminometr detekuje přítomnost ATP jakékoliv organické hmoty, a to ať už na površích nebo ve vzorcích vody. Organická hmota může být infekční nebo může představovat substrát pro růst patogenních mikroorganismů (Willis et al., 2007; Yi et al., 2020). Místem odběru vzorků tak může být jakékoliv místo v ubikaci, ale i krmítka a napáječky (Mannion et al., 2007).

Praktické využití luminometrů je spojováno zejména s ověřováním účinnosti a pečlivosti prováděných čistících a dalších sanitačních úkonů. K dispozici jsou studie popisující využití luminometrů v různých odvětvích (Efremenko et al., 2022).

Široké uplatnění má luminometrie zejména v praxi potravinářských provozů a také ve zdravotnictví, převážně v prostředí nemocnic, kde je sanitace klíčová pro lidské zdraví (Cannon et al., 2022). Aycicek et al. (2006) sledovali míru čistoty povrchů v nemocniční kuchyni za využití luminometrie a klasické kultivace. Korelace mezi těmito dvěma metodami byla statisticky potvrzena ($p < 0,01$). V 97,5 % se výsledky těchto metod shodovaly.

V zemědělství je praktické použití luminometrie zmiňováno z prostředí jatek. Rodrigues et al. (2018) popisují využití ATP testu na drůbežích jatkách pro monitoring hygieny povrchů přicházejících do kontaktu s živočišnými produkty. Uplatnění nachází luminometrie také při hodnocení čištění přívěsů určených pro hospodářská zvířata, a to ve snaze snížit riziko přenosu onemocnění (Letsch et al., 2024). Další oblastí jsou dojírny, kde se luminometry používají ke kontrole v dojících zařízeních v rámci prevence proti tvorbě biofilmů (Lindell et al., 2018). Poznatky o aplikaci luminometrie v rámci monitoringu hygieny prostředí zvířat jsou předmětem následujících studií.

Turner et al. (2010) se zabývali využitím metody měření ATP pro detekci mikroorganismů a organických nečistot v prostředí chovů laboratorních zvířat. Výsledky jejich studie ukázaly, že metoda měření ATP umožňuje citlivou detekci buněk i organického znečištění. Ve své studii potvrdili silnou korelaci s celkovým počtem stanovených mikroorganismů.

Luyckx et al. (2015) se zabývali čistícími a dezinfekčními postupy v chovech brojlerů. Účinnost těchto postupů byla hodnocena vizuálně, měřením ATP a mikrobiální kultivací. Výsledky ukázaly, že navzdory vizuálně čistým povrchům, měření ATP stále poukazovalo na přítomnost organického materiálu. Měření ATP tak poskytuje objektivnější údaje o úrovni hygieny prostředí.

Renaud et al. (2017) a Buczinski et al. (2022) sledovali možnosti využití luminometrie pro sledování hygieny krmení u telat. Autoři dospěli k závěru, že luminometrické metody mohou být v terénních podmínkách alternativou k bakteriální kultivaci.

Chancy et al. (2023) sledovali možnosti využití luminometrie pro hodnocení čistoty krmných žlabů u telat před odstavem. Předmětem studie bylo stanovení celkového ATP, ale také využití systému pro rychlou mikrobiální kultivaci s luminomerií (MicroSnap). Naměřené hodnoty byly srovnávány s plotnovými metodami kultivace. Autoři dospěli k závěru, že pro monitoring hygieny prostředí v chovech zvířat, může mít využití luminometrie své praktické uplatnění.

Využitím luminometrie se zabývali také Yi et al. (2020) v porodních kotcích prasat. Studie ukázala, že výsledky mikrobiální kontaminace naměřené pomocí luminometru významně korelovaly s výsledky získanými klasickou mikrobiální kultivací. Možnosti využití luminometrie pro hodnocení čistoty poroden prasat byly rovněž předmětem studie prováděné Johnson et al. (2024). Přesnost této

metody a její potenciál pro využití v monitoringu hygieny prostředí v chovech zvířat by měl být dále posouzen.

Cílem této studie bylo posoudit potenciál luminometrie jako rychlého detekčního systému pro monitoring hygieny prostředí na porodnách prasat.

Porodny prasat představují klíčovou oblast z pohledu monitoringu biosecurity v jednotlivých turnusech. Pro pravidelnou objektivní kontrolu čistících a dezinfekčních postupů je rychlá detekční metoda na porodnách žádoucí. Pro praktické ověření možnosti použití luminometrie pro monitoring hygieny prostředí zvířat, byl proto vybrán právě tento typ provozu.

Materiál a metodika

Praktické použití luminometrie pro monitoring hygieny prostředí zvířat bylo ověřeno nejprve v laboratorních podmínkách na vybraném sbírkovém kmeni a následně v terénních podmínkách, a to na porodně ve vybraném chovu prasat.

Laboratorní monitoring

Čistá sbírková kultura *Escherichia coli* (E. coli CCM 3988) získaná z mikrobiologické laboratoře Oddělení biologických metod na ÚSKVBL byla v mikrobiologické laboratoři Ústavu ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství VETUNI 9krát rozředěna desítkovým ředěním (1 ml suspenze + 9 ml sterilního fyziologického roztoku). Tímto způsobem byla získána série ředění čisté kultury *Escherichia coli* s predikcí koncentrace buněk od 10^9 do 10^0 KTJ/1 ml. Z této definované série ředění sbírkové kultury byly z jednotlivých koncentrací odebrány vzorky na vyšetření luminometrem a na mikrobiologickou kultivaci.

V laboratorních podmínkách na VETUNI byly dále simulovány podmínky kontaminace povrchu. Modelový kus podlahové krytiny z PVC byl vysterilizován a následně umístěn do laminárního boxu, kde byly na plochu 10 x 10 cm aplikovány jednotlivé vzorky z připravené série ředění (objem alikvotu 0,5 ml). Po 30 minutách (po zaschnutí inokula) byly inokulované plochy připraveny pro vyšetření luminometrem a pro mikrobiologickou kultivaci.

Terénní monitoring

Využití luminometrie v terénu bylo ověřeno ve vybraném konvenčním chovu prasat, a to v porodní sekci. Podmínky ustájení zvířat na porodnách byly následující. Prasnice byly na porodně ustájené v boxech s roštovou podlahou. Pro selata je vyhrazená kompaktní vyhřívaná podlážka. Prasnice je uzavřena v porodní kleci od 2 dnů před porodem do 28 dnů po porodu, kdy dochází k odstavu selat. Následně je prasnice převedena na individuální ustájení do eroscentra. Vlastní monitoring hygieny prostředí byl zahájen po vyskladnění prasnic a selat v době odstavu. Odběry vzorků byly prováděny v následujících krocích čistících a sanitačních úkonů:

1. po vyskladnění zvířat (den: 0), 2. před dezinfekcí (den: 3),
3. po dezinfekci – T: 1,5 hod (den: 3), 4. po dezinfekci – T: 3 hod (den: 3),
5. před fogací (den: 6), 6. po fogaci – T: 1,5 hod (den: 6),
7. po fogaci – T: 3 hod (den: 6).

Odběry vzorků byly prováděny na 3 definovaných místech (viz obrázek č. 1): 1. vyhřívaná podlážka pro selata, 2. stěna porodního kotce (10 cm nad zemí) a 3. podlaha provozní chodby v porodní sekci (střed chodby).

Obrázek č. 1. Odběrová místa a způsob odběru na porodně prasat



Všechny odběry byly prováděny ve 2 vybraných porodních koticích porodní sekce (vyznačeno červeně), kde bylo prováděno čištění a sanitace.

Metody a podmínky luminometrie

Pro měření ATP byly zvoleny 3 různé typy zařízení:

1. luminometr Clean-Trace™ LM1 (3M Health Care, USA)
2. luminometr EnSure (Hygiena LLC, USA).
3. luminometr SystemSURE Plus (Hygiena LLC, USA)

Měření luminometry bylo prováděno pouze jedním pracovníkem (viz obrázek č. 1), který postupoval dle stanovených metodik výrobců (3M, 2013; Hygiena, 2024). Luminometrie byla využita pro měření celkového ATP a dále pak pro nepřímé stanovení mikrobiální kontaminace (rychlá mikrobiální kultivace s luminometrií – systém MicroSnap).

V případě laboratorní části pokusu zaměřené na hodnocení čisté sbírkové kultury *Escherichia coli* byly vzorky vyšetřovány z připravené série naředěné suspenze. V ostatních případech (simulace terénních podmínek v laboratoři a terénní monitoring) byly prováděny stěry z definovaných ploch, a to 10 x 10 cm, jak je doporučováno výrobcí luminometrů (3M, 2013; Hygiena, 2020). Během odběru bylo, pro dosažení maximálního kontaktu tampónu se vzorkovanou oblastí, tampónem postupně otáčeno.

Obrázek č. 2. Použité luminometry pro monitoring



Měření celkového ATP bylo prováděno pomocí 3 luminometrů. Pro luminometr Clean-Trace™ LM1 byly využity pro alikvoty 3M Clean-Trace Water Plus-Total ATP a pro stěrovou metodu CleanTrace Surface ATP Test Swab UXL100. Pro luminometr SystemSURE Plus (Hygiena LLC, USA) a luminometr EnSure (Hygiena LLC, USA) byly využity pro alikvoty odběrovky AquaSnap Total a dále pro stěrovou metodu stěrové tampóny Ultrasnap. Po odběru byly vzorky v odběrovkách smíseny s činidlem (dle metodiky výrobce) a změřeny příslušnými luminometry. Získané výsledky byly vyjádřeny v RLU.

Pomocí luminometru bylo provedeno nepřímé, rychlé stanovení celkového počtu mikroorganismů (dále jen CPM), bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, koliformních bakterií a *E-coli*. Měření bylo prováděno dle metodického návodu výrobce (Microsnap, Hygiena, 2017).

Tato měření byla provedena luminometrem EnSure (Hygiena LLC, USA), pro který výrobce dodává validované odběrové soupravy Microsnap. Metodika Microsnap zahrnuje dvě fáze. První fáze představuje odběr vzorku do pomnožovacího média (Enrichment device) a dále vlastní inkubaci v termostatu. V případě odběru vzorku v terénu a následném transportu se stěrky musí uložit v chladu. V druhé fázi je odebrán alikvot z pomnožovacího média do detekčního média (Detection device), ve kterém je obsažen bioluminogenní substrát. Následuje krátká inkubace v termostatu (s výjimkou detekčních zkumavek pro stanovení bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*). Po těchto dvou krocích byl proveden odečet výsledků v RLU. Zvolená média pro metodiku Microsnap a podmínky kultivace jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Metody a podmínky mikrobiologické kultivace

V rámci laboratorního monitoringu byly z celé série, od každého ředění, včetně koncentrátu, na petriho misky s neselektivním krevním agarem (pro stanovení celkového počtu mikroorganismů - CPM) a petriho misky se selektivním agarem pro *E-coli* (HiCrome M1295I) inokulovány vzorky o objemu 0,5 ml. Tato inokulace byla z každého ředění provedena dvakrát.

Z uměle kontaminovaného povrchu v laboratoři byly vzorky odebírány následovně.

Inokulovaná plocha (100 cm²) byla setřena sterilním tampónem. Stěr probíhal dle standardní metodiky (celá plocha byla setřena nejprve horizontálně, následně vertikálně a poté diagonálně z levého horního rohu do pravého dolního rohu). Během stěru byl tampón postupně otáčen. Stěrový tampón se před stěrem zvlhčil ve zkumavce s fyziologickým roztokem (objem: 4 ml) a po stěru byl do ní vložen zpět. Takto připravený vzorek byl následně protřepán a inokulován na petriho misky. Na každou petriho misku (2 petriho misky krevního agaru pro stanovení CPM a 2 petriho misky

selektivního HiCrome agaru pro stanovení E-coli) bylo naneseno a rozetřeno 0,5 ml inokula. Takto připravené vzorky byly následně inkubovány v termostatu dle podmínek uvedených v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1. Zvolené metody mikrobiologického vyšetření a luminometrického stanovení skupin mikroorganismů a způsoby kultivace vzorků

Bakteriální kultivace			
Stanovené mikroorganismy	Metoda vyšetření	Kultivační médium	Teplota a doba kultivace
Psychofilní m. o.		PCA	22 °C, 72 h
CPM při 36 °C		Krevní agar (Columbia agar + 5% beraní krev)	37 °C: 24 h
č. <i>Enterobacteriaceae</i>	Roztěr (0,5 ml)	MacConkey agar, 98040	37 °C: 24 h
Koliformní bakterie		Endo agar, M029	37 °C: 24 h
		HiCrome agar (M1295I)	44 °C: 24 h
		M-FC agar, M1122	44 °C, 24 h
<i>E-coli</i>		Endo agar, M029	37 °C: 24 h
		MacConkey agar, 98040	37 °C: 24 h
Rychlá mikrobiální kultivace s luminometrií			
Stanovené mikroorganismy	Metoda vyšetření	Pomnožovací a detekční médium	Teplota a doba kultivace
CPM při 30 °C		Microsnap Total	30 °C: 7 h + 37 °C: 10 min
<i>Enterobacteriaceae</i>	Microsnap	Microsnap Entero	37 °C: 6 h
Koliformní bakterie		Microsnap Coliform	37 °C: 6 h + 37 °C: 10 min
		Microsnap E.coli	37 °C: 6 h + 37 °C: 10 min
<i>E.coli</i>			

Při terénním monitoringu byly odebrány vzorky stěrovou metodou (shodným postupem jako při laboratorním monitoringu) v jednotlivých fázích čištění a sanace porodních kotců. Odběr vzorků byl vždy proveden párově. Stěrové tampóny byly po setření vloženy do zkumavek s 4 ml transportního

média (enzymatický kaseinový hydrolizát, NaCl, glukóza a kvasniční autolyzát). Vzorby byly uloženy v chladicím boxu (teplota: 4 °C) a následně transportovány do mikrobiologické laboratoře Ústavu ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství VETUNI Brno. Těsně před inokulací na petriho misky byl obsah tampónu vytřepán do transportního média a následně byl inokulován na petriho misky s agary. Jednotlivé párové vzorky byly naředěny desítkovým ředěním tak, aby inokulovaná koncentrace byla přibližně $10^0 - 10^3$ KTJ. Z takto připravených párových vzorků bylo inokulováno po 0,5 ml na 2 petriho misky s agary (2x PCA agar, 2x krevní agar, 2x Mac Conkey agar, 2x Endo agar, 2x HiCrome agar a 2x MFC agar). Připravené párové vzorky byly následně inkubovány v termostatech za stanovených podmínek uvedených v tabulce č. 1.

Po inkubaci vzorků za podmínek uvedených v tabulce č. 1 byl proveden odečet kolonií na manuální počítače kolonií a dále bylo provedeno stanovení KTJ/100 cm² u jednotlivých vzorků z laboratorního a terénního monitoringu.

Statistická analýza

Výsledky získané pomocí luminometrů a plotnových kultivačních metod byly dále srovnány a statisticky vyhodnoceny. Získaná data byla analyzována za použití statistického programu Unistat for Excel 6.5. (Unistat Ltd., GB).

U dat byla posouzena normalita s využitím Shapiro-Wilkova a Kolmogorovův – Smirnova testu (zjištěna nerovnoměrná distribuce).

Pro možnost využití luminometrie jako náhrady za bakteriální kultivaci v rámci monitoringu hygieny prostředí v chovech zvířat byla sledována závislost naměřených hodnot pomocí luminometrů s výsledky bakteriální kultivace.

Pro stanovení závislosti byl využit Spearmanův korelační koeficient (r_P) z důvodu dat s nenormálním rozdělením. Kladné hodnoty koeficientu poukázaly na přímou závislost. Záporné hodnoty indikovaly nepřímou závislost. Pro stanovení síly významnosti byla využita následující škála hodnocení korelace dle Hinkle et al. (2003): zanedbatelná ($0 - < 0,3$), nízká ($0,3 - < 0,5$), střední ($0,5 - < 0,7$), vysoká ($0,7 - < 0,9$) a velmi vysoká korelace ($0,9-1$).

Pro vyjádření vztahu mezi výsledky luminometrie a výsledky bakteriální kultivace byla využita lineární regrese s vyjádřením rovnice a koeficientů determinace R^2 , které byly posouzeny jako vysoké ($>0,7$), střední ($0,3-0,7$) nebo nízké ($<0,3$). U vybraných výsledků byla lineární regrese vizualizována v grafech.

Pro porovnání nepřímého stanovení mikrobiální kontaminace pomocí luminometrie (systém MicroSnap) s bakteriální kultivací byly výsledky vybraných skupin mikroorganismů (CPM, bakterie č. *Enterobacteriaceae*, koliformní bakterie a E-coli), které byly odečteny v hodnotách RLU na luminometru dále přepočteny s využitím definovaných vzorců lineární regrese na hodnoty KTJ.

Pro stanovení rovnice lineární regrese byla využita tabulka středních hodnot RLU a jim odpovídající střední hodnoty KTJ, které byly získány z metodiky stanovené výrobcem (Microsnap, Hygiene, 2017). Pro koliformní bakterie a E-coli byla rovnice shodná ($RLU=0,0318 \times KTJ+11,97$) s koeficientem determinace $R^2 = 0,973$ poukazujícím na silnou závislost. Pro bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* byla rovnice stanovena takto ($RLU=0,199 \times KTJ+0,875$) s koeficientem determinace $R^2 = 0,999$ poukazujícím na silnou závislost. Přepočet celkového počtu mikroorganismů v RLU pak dle metodiky výrobce odpovídá celkovému počtu mikroorganismů v KTJ.

Vybrané výsledky KTJ byly vyjádřeny v log KTJ. Pro logaritmické vyjádření výsledků počtu kolonií byla provedena úprava dat s přičtením 1 KTJ pro vyloučení nulových hodnot.

Pro posouzení rozdílů mezi naměřenými hodnotami RLU samotnými luminometry, byla použita analýza rozptylu (neparametrický Kruskal-Wallisův test) a dále jako post hoc test Dunnův test.

Pro porovnání výsledků rychlé mikrobiální kultivace a tradičních plotnových metod z pohledu počtu stanovených mikroorganismů v KTJ byl využit Chí kvadrát test pro hodnocení statistické významnosti v kontingenční tabulce 2x2. Při četnostech > 5 se použila Yatesová korekce, při četnostech < 5 byl využit Fisherův přesný test.

V této studii byla použita hladina významnosti $p < 0,05$ (statisticky významný rozdíl) a $p < 0,01$ (statisticky vysoce významný rozdíl).

Výsledky

Potenciál luminometrie pro využití monitoringu hygieny prostředí v chovech zvířat byl ověřen nejprve v laboratorních podmínkách, a dále pak posouzen v terénních podmínkách na porodně prasat. Pro účely měření byly použity 3 různé typy luminometrů: luminometr č. 1 (luminometr Clean-Trace™ LM1, 3M Health Care), luminometr č. 2 (luminometr EnSure, Hygiena) a luminometr č. 3 (luminometr SystemSURE Plus, Hygiena).

Aplikace luminometrie pro monitoring v laboratorních podmínkách – hodnocení suspenze bakteriálního kmene

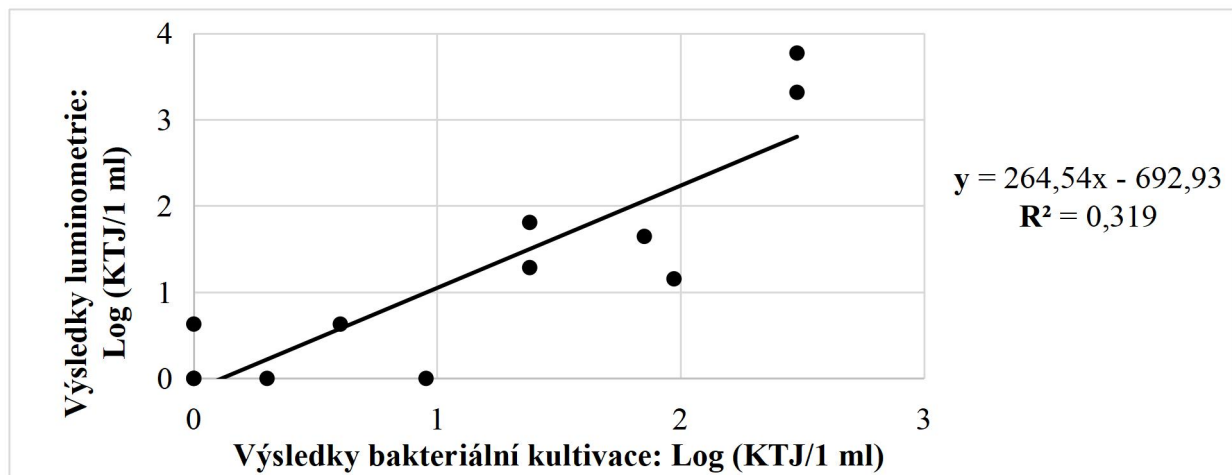
V laboratoři bylo nejprve provedeno měření celkového ATP u alikvotů jednotlivých ředění sbírkového bakteriálního kmene *E-coli* (E. coli CCM 3988) Pro měření byla využita původní suspenze s predikcí koncentrace buněk 10^9 KTJ/ ml a dále série ředění do 10^0 KTJ/ ml.

Měření probíhalo s využitím všech 3 luminometrů. Posouzena byla závislost mezi naměřenými hodnotami jednotlivými luminometry a výsledky kultivace sbírkového kmene *E-coli* na neselektivním a selektivním agaru. Neselektivní kultivace byla provedena na krevním agaru, selektivní stanovení bylo provedeno na HiCrome agaru. Z naměřených výsledků vyplývá, že mezi hodnotami naměřenými jednotlivými luminometry (RLU) a počtem kolonií vyrostlých na neselektivním a selektivním agaru (KTJ) nebyla zjištěna statisticky významná závislost ($p > 0,05$). Síla korelace r_P byla střední a pohybovala se od 0,314 (luminometr č. 1 X neselektivní médium) po 0,696 (selektivní médium).

Dále byly zhodnoceny výsledky nepřímého stanovení mikrobiální kontaminace luminometry (systém MicroSnap) ve vztahu k výsledkům bakteriální kultivace. Nepřímé stanovení mikrobiální kontaminace bylo prováděno pouze s využitím luminometru č. 2 a spočívalo v rychlé mikrobiální kultivaci vybraných skupin mikroorganismů (CPM, bakterie č. *Enterobacteriaceae*, koliformní bakterie a E-coli) a měření ATP. Hodnoty RLU naměřené luminometrem byly dále přepočteny s využitím rovnice lineární regrese dle definovaných tabulek středních hodnot RLU a KTJ (viz metodika). Získané výsledky vybraných skupin mikroorganismů v KTJ byly dále srovnány s výsledky plotnových metod.

Srovnání nepřímé metody stanovení mikroorganismů s bakteriální kultivací potvrdilo statisticky významnou vysokou korelaci mezi stanoveným počtem bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* luminometrem a CPM stanovených na krevním agaru ($r_P = 0,843$; $p < 0,01$). V grafu č. 1 je vyjádřena lineární regrese a koeficient determinace R^2 .

Graf č. 1. Vyjádření závislosti mezi počtem bakterií čeledi Enterobacteriaceae stanovených luminometrií a CPM stanovených na neselektivním agaru



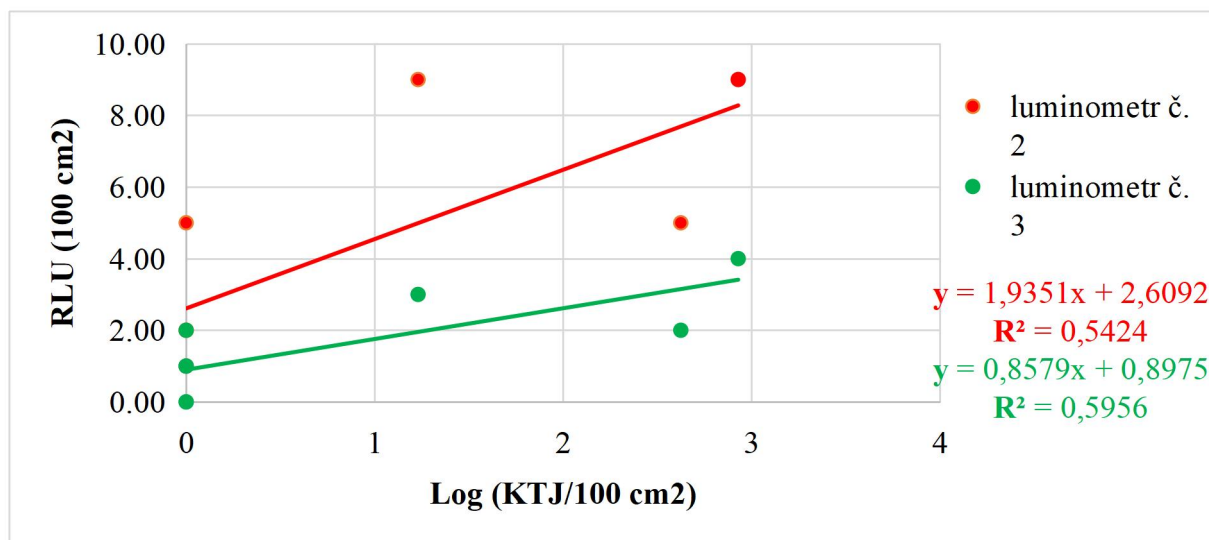
Dále byla potvrzena velmi vysoká korelace mezi počtem *E-coli* stanovených luminometrem a CPM stanovených na krevním agaru ($r_P = 1,000$; $p < 0,01$). V rámci pokusu byla také potvrzena velmi vysoká korelace mezi počtem *E-coli* stanovených luminometrem a počtem *E-coli* stanovených na selektivním agaru ($r_P = 1,000$; $p < 0,01$). Nízká korelace mezi CPM stanovených luminometrem a CPM stanovených na krevním agaru, stejně jako nízká korelace mezi počtem koliformních bakterií stanovených luminometrem a CPM stanovených na krevním agaru nebyla statisticky prokázána ($p > 0,05$).

Aplikace luminometrie pro monitoring v laboratorních podmínkách – inokulace modelového povrchu

V laboratoři byl dále prováděn monitoring celkového ATP s využitím 3 luminometrů, a to na vysterilizovaném povrchu PVC, který byl během měření (inokulace, osychání, stěr) uložen do laminárního boxu. Povrch PVC byl inokulován sérií ředění sbírkové kultury *E-coli* (objem alikvoty 0,5 ml na plochu 100 cm²). Po zaschnutí inokula (stanovený čas 30 min) byla stěrovou metodou setřena tampónem plocha 10 x 10 cm. Stejným způsobem byl také proveden odběr pro mikrobiologickou kultivaci. Z výsledků byla posouzena závislost mezi naměřenými hodnotami (RLU) jednotlivými luminometry po stěru vzorků a výsledky kultivace stěrů (KTJ) na neselektivním (krevní agar) a selektivním agaru (HiCrome agar)

Výsledky potvrdily statisticky významnou vysokou závislost mezi naměřenými hodnotami luminometru č. 2 (RLU) a počtem kolonií (KTJ) vyrostlých na neselektivním agaru ($r_P = 0,783$; $p < 0,05$). Vysoká korelace byla potvrzena také mezi naměřenými hodnotami luminometru č. 3 (RLU) a počtem kolonií (KTJ) vyrostlých na neselektivním agaru ($r_P = 0,806$; $p < 0,05$). Mezi naměřenými hodnotami (RLU) luminometrů č. 1-3 ($r_{P1} = 0,276$; $r_{P2} = 0,543$; $r_{P3} = 0,611$) nebyly potvrzeny statisticky významné závislosti s počtem kolonií (KTJ) vyrostlých na selektivním agaru ($p > 0,05$). Rovněž nebyla potvrzena statisticky významná korelace mezi naměřenými hodnotami (RLU) luminometru č. 1 a počtem kolonií (KTJ) vyrostlých na neselektivním agaru ($r_P = 0,428$; $p > 0,05$). V grafu č. 2 je vyjádřena lineární regrese a koeficient determinace R^2 pro luminometr č. 2 a 3.

Graf č. 2. Vyjádření závislosti mezi naměřenými hodnotami luminometry (RLU) a počtem bakterií stanovených na neselektivním agaru (KTJ) – inokulace modelového povrchu



Dále byl posouzen vztah mezi výsledky nepřímého stanovení mikrobiální kontaminace luminometry (systém MicroSnap) a výsledky bakteriální kultivace z odebraných stěrů z modelového povrchu. Výsledky potvrdily statisticky vysoce významnou závislost mezi stanovenými skupinami bakterií rychlou detekcí s využitím luminometrie a bakteriální kultivací ($p < 0,01$). Výsledky korelace (R_p) a koeficientu determinace R^2 jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2. Vyjádření závislosti mezi výsledky rychlé mikrobiální detekce s luminometrií (systém MicroSnap) a bakteriální kultivace (laboratorní monitoring)

Luminometr	Bakteriální kultivace	r_p	R^2	Statistická významnost
CPM		0,866	0,6113	
Bakterie č. <i>Enterobacteriaceae</i>	CPM (Krevní agar)	0,922	0,9209	$p < 0,01$
Koliformní bakterie		0,746	0,4522	
<i>E-coli</i>		0,661	0,3902	
<i>E-coli</i>	<i>E-coli</i> (HiCrome agar)	0,756	0,6535	

Z výsledků je zřejmé, že byla zjištěna vysoká hodnota koeficientu determinace pro vztah mezi zjištěným počtem mikroorganismů čeledi *Enterobacteriaceae* luminometrem a CPM stanovených na neselektivním agaru. Střední hodnota koeficientu determinace byla zjištěna pro vztah mezi CPM, koliformními bakteriemi a *E-coli* stanovených luminometrem a CPM stanovených na krevním agaru.

Při posouzení vztahu mezi *E-coli* stanovených luminometrem a počtem *E-coli* stanovených na selektivním agaru se potvrdila střední hodnota koeficientu determinace.

Aplikace luminometrie pro monitoring v terénních podmínkách

Možnost využití luminometru byla dále sledována v terénních podmínkách, a to v porodním kotci v chovu prasat. Vlastní odběr vzorků byl proveden v období po vyskladnění prasnic a selat, kdy byly zahájeny čistící a sanitační úkony. Vzorky byly odebírány v definovaných fázích sanace porodního kotce: po vyskladnění zvířat (den: 0), před dezinfekcí (den: 3), po dezinfekci – T: 1,5 hod (den: 3), po dezinfekci – T: 3 hod (den: 3), před fogací (den: 6), po fogaci – T: 1,5 hod (den: 6), po fogaci – T: 3 hod (den: 6)

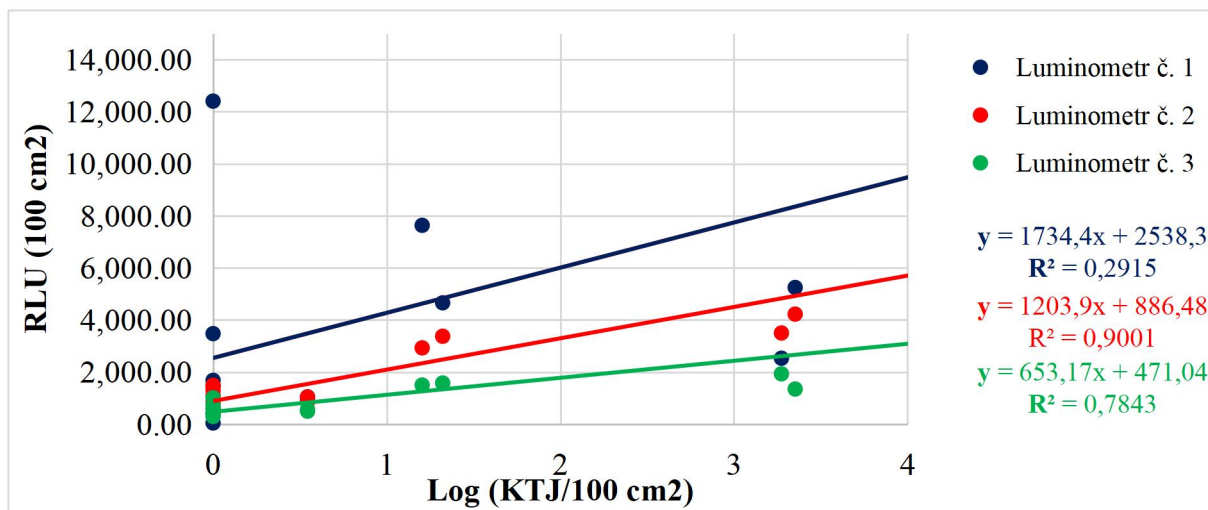
Vzorky byly odebírány na 3 předem zvolených místech (podlážka pro selata, stěna porodního kotce, podlaha provozní chodby v porodní sekci). Pro kontrolu byly všechny vzorky odebírány ve 2 vybraných porodních kotcích.

Posouzena byla závislost výsledků celkového ATP v RLU měřeného luminometry v terénu s výsledky psychrofilních mikroorganismů, a dále s výsledky CPM při 36 °C, narostlých na neselektivních agarech (PCA, krevní agar). Korelace byly sledovány na všech 3 definovaných místech.

Výsledky z podlážky u selat potvrdily statisticky vysoce významnou vysokou závislost mezi naměřenými hodnotami (RLU) luminometru č. 2 a počtem kolonií (KTJ) vyrostlých na krevním agaru ($rP = 0,845$; $p < 0,01$). Obdobně vysoká korelace byla zjištěna u naměřených hodnot (RLU) luminometru č. 3 k počtu kolonií (KTJ) vyrostlých na krevním agaru ($rP = 0,822$; $p < 0,01$). Statisticky významná střední korelace byla zjištěna pouze u naměřených hodnot (RLU) luminometru č. 1 k počtu kolonií (KTJ) vyrostlých na krevním agaru ($rP = 0,557$; $p = 0,04$). Statistická významnost nebyla potvrzena pro korelace naměřených hodnot luminometrů k počtu psychrofilních bakterií vyrostlých na PCA agaru ($p > 0,05$).

V grafu č. 3 je vyjádřena lineární regrese a koeficient determinace R^2 . V rámci pokusu byla zjištěna vysoká hodnota koeficientu determinace pro vztah mezi luminometrem č. 2, střední hodnota koeficientu determinace pro vztah mezi luminometrem č. 3 a pouze nízká hodnota koeficientu determinace pro vztah mezi luminometrem č. 1, a CPM při 36°C.

Graf č. 3. Vyjádření závislosti mezi naměřenými hodnotami (RLU) luminometry a CPM při 36 °C na neselektivním agaru (KTJ) – vyhřívaná podlážka u selat



Výsledky ze stěny kotce nepotvrdily statisticky významnou závislost mezi naměřenými hodnotami (RLU) luminometry a počtem kolonií (KTJ) psychrofilních mikroorganismů, ani CPM při 36 °C vyrostlých na PCA a krevním agaru ($p > 0,05$).

Výsledky z provozní chodby porodní sekce potvrdily statisticky významnou střední závislost mezi naměřenými hodnotami luminometru č. 1, 2 a 3 (RLU) a počtem kolonií (KTJ) CPM vyrostlých na krevním agaru při 36°C ($rP_1 = 0,610$; $p = 0,02$; $rP_2 = 0,601$; $p = 0,02$; $rP_3 = 0,616$; $p = 0,02$). Statistická významnost nebyla potvrzena pro korelace naměřených hodnot luminometrů k počtu psychrofilních bakterií vyrostlých na PCA agaru ($p > 0,05$).

Byla zjištěna střední hodnota koeficientu determinace pro vztah mezi luminometrem č. 2 ($R^2 = 0,4907$), střední hodnota koeficientu determinace pro vztah mezi luminometrem č. 3 ($R^2 = 0,4742$) a pouze nízká hodnota koeficientu determinace pro vztah mezi luminometrem č. 1 ($R^2 = 0,1955$), a CPM při 36°C.

V terénních podmínkách byly dále posouzeny výsledky nepřímého stanovení mikrobiální kontaminace pomocí luminometrie (systém MicroSnap) a výsledky bakteriální kultivace.

Posouzeny byly nejprve výsledky CPM stanovené luminometrií. Výsledky potvrdily statisticky významnou závislost ($p < 0,05$) mezi CPM stanoveným luminometrem a CPM stanovených na krevním agaru, a to na všech měřených stanovištích. Výsledky korelace a koeficientu determinace R^2 jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3. Vyjádření závislosti mezi výsledky rychlé detekce CPM (systém MicroSnap) a bakteriální kultivací – terénní monitoring na zvolených místech

Místo odběru	Bakteriální kultivace	rP	R ²	Statistická významnost
Vyhřívaná podlážka selat	CPM	0,619	0,8406	$p = 0,02$
Stěna kotce	(Krevní agar)	0,589	0,3889	$p = 0,03$

Z výsledků je patrné, že v rámci pokusu byla zjištěna vysoká korelace u provozní chodby a střední korelace u podlahy selat a stěny kotce s CPM stanovených na krevním agaru. Byla zjištěna vysoká hodnota koeficientu determinace pro vztah mezi podlahou selat, vysoká hodnota koeficientu determinace pro vztah mezi provozní chodbou a nízká hodnota koeficientu determinace pro vztah mezi stěnou kotce a počtem CPM stanovených na krevním agaru.

CPM stanovené luminometrií byly dále posouzeny k počtu psychrofilních bakterií stanovených na PCA agaru. Výsledky potvrdily statisticky významnou střední závislost na podlážce selat ($rP = 0,547$; $p = 0,04$) se středním koeficientem determinace ($R^2 = 0,5538$) a vysokou závislost v provozní chodbě ($rP = 0,711$; $p < 0,01$) s vysokým koeficientem determinace ($R^2 = 0,8150$). Na stěně kotce nebyla statisticky potvrzena ($p > 0,05$) závislost s počtem psychrofilních bakterií stanovených na PCA agaru.

Dále byly posouzeny výsledky počtu bakterií č. *Enterobacteriaceae*, koliformních bakterií a *E-coli* stanovené luminometrií (systém MicroSnap). Výsledky potvrdily statisticky vysoce významnou závislost mezi bakteriemi č. *Enterobacteriaceae*, koliformními bakteriemi a *E-coli* stanovenými rychlou detekcí a příslušnými metodami plotnové kultivace těchto mikroorganismů ($p < 0,01$) v provozní chodbě. Koeficient determinace zde byl střední pro bakterie č. *Enterobacteriaceae* a vysoký pro koliformní bakterie a *E-coli*. Na podlážce selat byla potvrzena závislost pouze pro bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* a koliformní bakterie. Na podlážce i stěně kotce prasat nebyla potvrzena závislost pro *E-coli* ($p > 0,05$). V případě stěny kotce prasat nebyla potvrzena závislost ani pro bakterie č. *Enterobacteriaceae* ($p > 0,05$).

Pro bakterie č. *Enterobacteriaceae* byla nejsilnější korelace zjištěna na podlážce prasat. Pro koliformní bakterie byla vysoká korelace potvrzena v provozní chodbě, střední korelace na podlážce selat. Pro *E-coli* byla vysoká korelace potvrzena v provozní chodbě. Výsledky korelace jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4. Vyjádření závislosti mezi výsledky rychlé detekce skupin gramnegativních bakterií (systém MicroSnap) a bakteriální kultivace – terénní monitoring na zvolených místech

Místo odběru	Rychlá kultivace s luminometrií	Bakteriální kultivace	rP	R ²	Statistická významnost
Podlážka selat	EB	MC agar	0,843	0,7588	p < 0,01
	KOL	ENDO agar	0,698	0,4525	
	EC	HiCrome agar	0,388	0,1656	
Stěna kotce	EB	MC agar	0,110	0,0149	p > 0,05
	KOL	ENDO agar	1,000*	X	p < 0,01
	EC	HiCrome agar	0,077	0,0451	p > 0,05
Provozní chodba	EB	MC agar	0,777	0,6078	p < 0,01
	KOL	ENDO agar	0,809	0,7144	
	EC	HiCrome agar	0,884	0,9771	

Pozn.: EB (bakterií č. *Enterobacteriaceae*), KOL (koliformní bakterie), EC (*E-coli*)

* nulové hodnoty KTJ na petriho miskách

X nestanovena lineární regrese

Množství detekovaných mikroorganismů v terénním měření v závislosti na použité metodě

Byly porovnány výsledky rychlé mikrobiální kultivace a tradičních plotnových metod z pohledu počtu stanovených mikroorganismů. Pro účely srovnání byly využity výsledky po mechanické očištění, a to před dezinfekcí. Výsledky ukázaly, že mezi CPM stanoveným rychlou mikrobiální kultivací s luminometrií a CPM stanovených běžnou kultivací na krevním agaru byly potvrzeny statisticky vysoce významné rozdíly v počtu KTJ ($p < 0,01$). Tyto rozdíly byly potvrzeny u všech 3 stanovišť (podlážka, stěna kotce a provozní chodba), kdy vyšší CPM bylo detekováno na krevním agaru (4,20; 3,87 a 4,41 log KTJ) ve srovnání s rychlou mikrobiální kultivací (3,87; 3,63 a 3,92 log KTJ). Obdobně byly statisticky významné rozdíly potvrzeny s počtem psychrofilních mikroorganismů stanovených na PCA agaru, kde počty byly naopak nižší (1,10; 1,14 a 1,12 log KTJ).

Dále byly sledovány rozdíly mezi metodami v počtu stanovených vybraných gramnegativních bakterií na všech 3 stanovištích. Počet bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* stanovený rychlou detekční metodou byl vyšší (4,47; 4,44 a 4,38 log KTJ) ve srovnání s běžnou kultivací (3,07; 1,78 a 3,85 log KTJ). Počet koliformních bakterií byl na všech stanovištích rovněž vyšší (4,29; 2,70 a 4,31 log KTJ) ve srovnání s běžnou kultivací (2,48; 0,80 a 3,71 log KTJ). V případě *E-coli* byl rovněž potvrzen vyšší počet bakterií stanovených rychlou detekční metodou (3,86; 2,67 a 4,21 log KTJ) ve srovnání s běžnou kultivací (0; 0 a 3,67 log KTJ). Mezi vybranými skupinami bakterií stanovenými luminometrií a selektivním stanovením těchto bakterií na vybraných agarech (*Enterobacteriaceae*: MC agar; koliformní bakterie: ENDO agar a *E-coli*: HiCrome agar) byly rovněž potvrzeny statisticky vysoce významné rozdíly v počtu KTJ ($p < 0,01$).

Variabilita výsledků luminometrie v závislosti na použitém detekčním přístroji

V závěru byly posouzeny vlastní korelace naměřených hodnot mezi vybranými luminometry a dále rozdíly v naměřených hodnotách v závislosti na použitém luminometru.

Z výsledků byla posouzena závislost naměřených hodnot luminometry (RLU) v různých podmínkách s využitím Spearmanova korelačního koeficientu (rP).

V laboratoři byla nejprve zjišťována závislost naměřených hodnot (RLU) luminometry v sérii ředění sbírkové kultury *E-coli* od 10^9 do 10^0 KTJ/ ml, kdy vyšetřovaným vzorkem byl alikvot. Výsledky ukázaly, že mezi hodnotami naměřenými jednotlivými luminometry byla zjištěna statisticky vysoce významná přímá závislost ($p < 0,01$). Vysoká korelace byla zjištěna mezi luminometry č. 1 a 2 ($rP = 0,853$) a dále luminometry č. 1 a č. 3 ($rP = 0,888$). Velmi vysoká korelace byla zjištěna mezi hodnotami naměřenými luminometrem č. 2 a 3 ($rP = 0,946$).

Dále byla posouzena závislost naměřených hodnot (RLU) luminometry, kdy vyšetřovaným vzorkem byl stěr z povrchu uměle kontaminovaného sbírkovou kulturou *E-coli* v sérii koncentrací od 10^9 do 10^0 KTJ/ ml. Výsledky rovněž potvrdily statisticky vysoce významnou přímou závislost ($p < 0,01$) mezi hodnotami RLU naměřenými jednotlivými luminometry. Tato závislost byla vysoká mezi luminometrem č. 1 a 3 ($rP = 0,828$) a luminometrem č. 1 a 2 ($rP = 0,815$) Velmi vysoká korelace byla potvrzena mezi luminometry č. 2 a 3 ($rP = 0,997$).

Závislost mezi naměřenými hodnotami luminometrů byla dále sledována v terénních podmínkách chovu prasat na porodnách. Na třech stanovištích (podlážka pro selata v kotci, stěna kotce a provozní chodba porodní sekce) byla sledována korelace mezi naměřenými hodnotami použitých luminometrů.

Výsledky potvrdily statisticky vysoce významnou závislost ($p < 0,01$) mezi hodnotami naměřenými luminometry na podlážce pro selata. Vysoká korelace byla zjištěna mezi luminometrem č. 1 a 2 ($rP = 0,776$) a luminometrem č. 1 a 3 ($rP = 0,789$). Velmi vysoká korelace byla potvrzena mezi luminometrem č. 2 a 3 ($rP = 0,965$). Z výsledků bylo zjištěno, že organická kontaminace na stěně porodního kotce vedla ke snížení korelace na středně silnou, a to mezi luminometrem č. 1 a 2 ($rP = 0,639$; $p < 0,01$) a luminometrem č. 1 a 3 ($rP = 0,596$; $p < 0,05$). Mezi luminometrem č. 2 a 3 nadále zůstala korelace velmi vysoká ($rP = 0,991$; $p < 0,01$). Obdobně v případě provozní chodby porodní sekce bylo pozorováno snížení závislosti mezi luminometry č. 1 a 2 ($rP = 0,574$; $p < 0,05$) a luminometrem č. 1 a 3 ($rP = 0,600$; $p < 0,05$) na středně silnou. Velmi vysoká byla nadále korelace mezi luminometrem č. 2 a 3 ($rP = 0,965$; $p < 0,01$).

Zhodnoceny byly rozdíly v korelaci naměřených dat luminometry v závislosti na charakteru místa stěru. Zjištěné korelace pro jednotlivá místa (podlážka pro selata, stěna kotce a provozní chodba) byly porovnány s korelacemi zjištěnými pro stěr modelového povrchu v laboratoři a bylo určeno, do jaké míry dochází k poklesu nebo vzestupu síly korelace v %.

Na plastové podlážce prasat došlo k poklesu korelace oproti laboratornímu stěru mezi luminometry s různým typem stěrovek. V případě luminometru č. 1 a 2 se jednalo o 4,79 % ($rP = 0,776$), v případě luminometru č. 1 a 3 se jednalo o 4,71 %. Mezi luminometry č. 2 a 3 se stejným typem stěrovek byl pokles o 3,21 % ($rP = 0,965$).

Při odběru stěrů ze stěny porodního kotce bylo snížení závislosti mezi luminometry s různým typem stěrovek ještě vyšší. V případě luminometru č. 1 a 2 byl pokles o 21,59 % ($rP = 0,639$), v případě luminometru č. 1 a 3 pak o 27,89 % ($rP = 0,597$). Mezi luminometry č. 2 a 3 se stejným typem stěrovek byl pokles rovněž pouze o 3,21 % ($rP = 0,965$).

Nejvýraznější pokles korelace mezi luminometry s odlišnými typy stěrovek byl pozorován na betonové podlaze provozní chodby. V případě luminometrů č. 1 a 2 se jednalo o 29,57 % ($rP = 0,574$), v případě luminometrů č. 1 a 3 pak o 27,54 % ($rP = 0,600$). Mezi luminometry č. 2 a 3 se stejným typem stěrovek byl pokles rovněž pouze o 3,21 % ($rP = 0,965$).

Dále bylo posouzeno, zda mezi naměřenými hodnotami luminometrů (RLU) jsou statisticky významné rozdíly. Pro srovnání byl využit neparametrický Kruskal-Wallisův test a následně jako post hoc Dunnův test. Výsledky statistické významnosti (p) jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Z výsledků je patrné, že v rámci měření nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly mezi luminometrem č. 1 a 2 a luminometrem č. 2 a 3 (RLU) a rozdílnými povrchy, na kterých bylo měření prováděno. Luminometry č. 1 a 3 vykazovaly statisticky významné rozdíly v naměřených hodnotách RLU v případě měření alikvotu sbírkové kultury *E-coli*, při stěru sbírkové kultury v laboratoři a v terénu při stěru ze stěny kotce ($p < 0,05$).

Tabulka č. 5. Rozdíly statistické významnosti (p) v naměřených hodnotách RLU mezi luminometry v závislosti na podmínkách měření

Podmínky měření		Rozdíly statistické významnosti (p)		
		mezi luminometry		
		Luminometr 1 x 2	Luminometr 1 x 3	Luminometr 2 x 3
Laboratorní monitoring	Sbírková kultura E-coli (aliquot)	NS	0,0419	NS
	Inokulace sbírkové kultury na povrch	NS	0,0404	NS
Terénní monitoring	Podlážka pro selata	NS	NS	NS
	Stěna porodního kotce	NS	0,0103	NS
	Provozní chodba porodní sekce	NS	NS	NS

Pozn.: NS (p > 0,05)

Diskuze

O potenciálním využití rychlých detekčních testů na principu bioluminiscence jsou k dispozici studie z různých odvětví (Aycicek et al., 2006; Letsch et al., 2024; Rodrigues et al., 2018). V zemědělství nachází luminometrie uplatnění především na jatkách (Rodrigues et al., 2018) a v prvovýrobě mléka v souvislosti se zajištěním hygieny syrového mléka (Heinemann et al., 2020b). Pouze málo je známo o plošném využití luminometrie v chovech hospodářských zvířat, kde tato rychlá metoda může nalézt svůj potenciál pro monitoring čistoty a celkové hygieny prostředí chovu zvířat (Johnson et al., 2024). Předmětem této studie bylo posouzení potenciálu luminometrie v chovech zvířat.

Podmínky, ve kterých se zvířata chovají, mají svá specifika, která mohou mít vliv na možnosti využití luminometrie. V prostředí, kde jsou zvířata ustájena, dochází stále ke kontaminaci živým i neživým organickým materiálem obsaženým ve výkalech, moči a v dalších tělesných tekutinách (Mannion et al., 2007). Při interpretaci výsledků luminometrie je nutné počítat s možnými limitacemi této metody, které byly touto studií sledovány.

Pro účely této studie byly využity 3 typy luminometrů, které mají zpracovány metodiky použití výrobci primárně pro potravinářské provozy (3M, 2013; Hygiena, 2020).

V rámci této studie bylo provedeno měření celkového ATP (stanovení RLU) pomocí luminometrie, nepřímé stanovení mikrobiální kontaminace s využitím systému MicroSnap (stanovení RLU a přepočítání na KTJ) a dále bakteriální kultivace na plotnových metodách (stanovení KTJ). Potenciál využití luminometrie pro rychlý monitoring hygieny prostředí byl posouzen následovně.

Luminometrie a její využití pro hodnocení celkového ATP

Primárním účelem luminometru je jeho využití pro testování přítomného organického znečištění, kdy výsledky RLU poukazují na množství ATP, které je přítomno v dané vyšetřované matrici. Část tohoto organického znečištění pak může být mikrobiálního původu (Lindell et al., 2018). Výsledky získané luminometrií se tak nemusí shodovat s výsledky dosaženými bakteriální kultivací, jak uvádějí Bakke a Suzuki (2018). Vždy se tak jedná o nepřímé stanovení počtu buněk, kterými mohou být v různém poměru mikroorganismy a organické nečistoty, a to v závislosti na charakteru vzorku.

Z tohoto důvodu byla v této studii nejprve ověřena schopnost luminometru detekovat čistou bakteriální kulturu (*E. coli* CCM 3988), která byla připravena v koncentracích od 10^9 do 10^0 KTJ/1 ml. Naměřené hodnoty celkového ATP luminometry byly srovnány s výsledky kultivace na krevním agaru (neselektivní médium) a HiCrome agaru (selektivní médium).

Renaud et al. (2017) ve své studii prokázali silnou pozitivní korelaci mezi naměřenými hodnotami RLU a celkovým počtem mikroorganismů v KTJ ($r_P = 0,81$; $p < 0,01$), kdy pro luminometrii byly využity stěrovky AquaSnap. V naší studii byly tyto stěrovky rovněž využity pro měření suspenze bakteriálního kmene u luminometru č. 2 a 3. Na rozdíl od studie prováděné Renaud et al. (2017) se ale nepotvrdila závislost mezi naměřenými hodnotami RLU a počtem bakterií v KTJ, a to u žádného s použitých luminometrů. Možnostmi detekce čisté bakteriální kultury se zabývali také Turner et al. (2010), a to u následujících bakteriálních kultur (*E-coli*: americký kmen 25922; *Staphylococcus aureus*: americký kmen 29213). Autoři dospěli k závěru, že pro detekci čisté bakteriální kultury má metoda měření ATP nízkou citlivost, jak pro grampozitivní tak pro gramnegativní bakterie. Možnosti detekce s využitím luminometrie dále ovlivňuje sonikace. Výsledky studie prováděné Turner et al. (2010) ukázaly, že narušení bakteriálních membrán *E-coli* zvýšilo citlivost luminometru z 10^4 KTJ na 10^3 KTJ. V rámci diagnostiky v této studii nebyla sonikace, jejímž účelem je narušení bakteriálních membrán a tím pádem získání maximálního množství ATP v buňkách, prováděna. Cílem bylo přiblížit se reálným podmínkám v chovech, kde míru poškození buněk nelze předem předpokládat. Dalším důvodem bylo ověření limitů samotných měřicích přístrojů při stanovování dané bakteriální kultury. Příčinu nepotvrzených závislosti mezi naměřenými hodnotami RLU a počtem buněk v KTJ tak lze hledat nejen v absenci sonikace buněk, ale také v charakteru bakteriálního kmene, kdy Turner et al. (2010) uvádějí, že citlivost luminometrie je nižší vůči gramnegativním buňkám, a to kvůli horší schopnosti lyzovat jejich membrány. Výsledný signál je tak slabší, čímž lze rovněž vyvodit absenci samotné korelace.

Dále byly sledovány možnosti luminometrie pro detekci čisté bakteriální kultury, která byla inokulovaná na modelový povrch (PVC). Vysoká korelace mezi naměřenými hodnotami RLU a počtem kolonií v KTJ narostlých na krevním agaru byla potvrzena u luminometru č. 2 ($r_P = 0,783$) a č. 3 ($r_P = 0,806$). Pozitivní korelaci mezi měřením ATP a mikrobiální kultivací zmiňují ve svých studiích i Buczinski et al. (2022). Pozitivní, ale na rozdíl od naší studie slabou korelaci ($r_P \geq 0,10$) mezi počtem bakterií a výsledky ATP ve své studii dále popisují Letsch et al. (2024). Důvodem silné korelace v naší studii může být skutečnost, že na daném modelovém povrchu byly přítomny pouze mikroorganismy bez dalších organických nečistot, které by zvyšovaly hladinu ATP (povrch byl před inokulací důkladně ošetřen a vysterilizován). K obdobnému závěru dospěli na mléčných farmách v dojrnách i Lindell et al. (2018).

Statisticky významná korelace s bakteriální kultivací však nebyla potvrzena pro všechny luminometry. V případě luminometru č. 1 nebyla potvrzena. Rozdílnou účinnost luminometrů zmiňují i Johnson et al. (2024). Nízkou, ale statisticky významnou korelaci ($r_P = 0,17$; $p = 0,02$) popisují u tohoto přístroje (3M Clean-Trace) Letsch et al. (2024). V naší studii byla korelace s bakteriální kultivací potvrzena pouze u luminometrů, kde byly využity stěrové tampóny Ultrasnap. Výsledky tohoto měření tak navíc potvrzují závěry studie prováděné Chancy et al. (2023), kteří rovněž s využitím těchto stěrovek zjistili

pozitivní korelace mezi hladinami celkového ATP a bakteriální kultivací. Na rozdíl od výsledků naší studie, však byly tyto závěry zjištěny v terénních podmínkách. V terénních podmínkách se pouze s čistou bakteriální kulturou nikdy nesetkáme. V terénu je také při hodnocení výsledků nutné zohlednit přítomnost dalších organických nečistot (trus, moč, případně i krev), které mohou detekční schopnost luminometrie ovlivnit, jak uvádějí Turner et al. (2010).

V rámci této studie byly dále posouzeny možnosti měření celkového ATP v terénních podmínkách, a to na porodně prasat. Vzorky byly odebírány záměrně z různých typů povrchů (vyhřívaná podlážka pro selata, stěna porodního kotce a provozní chodba). Podlážka pro selata byla hladká a plastová, stěny kotce byly hladké a kovové. Provozní chodba měla porézní betonovou podlahu. Charakter povrchů může být faktorem, který ovlivňuje nejen samotnou perzistenci a přežívání mikroorganismů, ale také možnosti stěru mikroorganismů (Chancy et al., 2023).

Praktické použití luminometrie v porodních kotcích prasat sledovali i Yi et al. (2020) a Johnson et al. (2024). Výsledky naměřeného celkového ATP luminometry srovnávali s běžnou kultivací, kdy zjistili pozitivní korelaci mezi těmito metodami. Výsledky této studie ukázaly následující. Výsledky z podlážky a provozní chodby poukázaly na střední až vysokou závislost mezi naměřenými výsledky celkového ATP (RLU) u všech tří luminometrů a CPM (KTJ) narostlých na krevním agaru. Z výsledků této studie je dále zřejmé, že výsledky korelací nejsou silné. Slabou korelací v rozmezí ($rP = 0,32-0,48$) ve své studii popisují i Johnson et al. (2024). To poukazuje na skutečnost, že luminometr nedetekuje pouze mikrobiální ATP, ale veškerou ATP z prostředí, jak uvádějí Chancy et al. (2023) a také van Arkel et al. (2021). Přítomnost dalších organických nečistot může vést k výrazně vyšším hodnotám ATP, kdy savčí buňky a také buňky kvasinek obsahují až 100krát více ATP ve srovnání s buňkami bakterií (Mildenhall and Rankin, 2020). Proto kdykoliv jsou v prostředí organické nečistoty, tak lze předpokládat větší odchylky v korelaci s bakteriální kultivací (Efremenko et al., 2022).

Je tak zřejmé, že na rozdíl od laboratorních podmínek na modelovém bakteriálním kmeni je v terénních podmínkách závislost mezi hodnotami celkového ATP a výsledky bakteriální kultivace snížena v důsledku přítomného organického znečištění. Toto je popisováno i v řadě dalších studií, které potvrzují korelace mezi celkovou ATP a bakteriální kultivací, která je však nízká (Nante et al., 2017).

V případě monitoringu na ošetřených plochách (po mechanické očištění na porodnách prasat) budou naměřené hodnoty odrážet přítomnou mikrobiální kontaminaci s větší závislostí oproti fázi před čištěním, kdy zjištěné ATP odráží množství dalších organických nečistot mimo přítomné mikrobiální znečištění, jak potvrzují Yi et al. (2020a). Po mechanickém čištění, kdy se na porodnách prasat využívá tlakové mytí, mohou na površích zůstat zbytky fekálií. Tyto fekálie nejsou vizuálně patrné, ale luminometrií mohou být potvrzeny. Výsledky této studie tak potvrzují závěry jiných prací, kdy luminometrií lze použít hlavně jako test k určení čistoty povrchů (Alvarado et al., 2020; Heinemann et al., 2020b; Letsch et al., 2024). Pro hodnocení hygieny a tedy míry mikrobiální kontaminace je nutné vždy posoudit, zda celkovou ATP neovlivňuje další přítomné organické nečistoty, jak uvádějí Heinemann et al. (2020b).

Typ luminometru jako faktor ovlivňující výsledky měření organického znečištění

Na trhu je k dispozici několik přístrojů pro měření luminometrie s různou detekční citlivostí (Johnson et al., 2024; Mildenhall and Rankin, 2020). Ve srovnání s velkým množstvím fyzikálních hodnot, nejsou jednotky RLU standardizovány soustavou SI. Z tohoto důvodu se získané výsledky v RLU mohou u stejného typu vzorku dle autorů významně lišit. V této studii také bylo potvrzeno, že v rámci výsledků hrají významnou roli i použité odběrové systémy. U stěrovek se lze setkat s různou koncepcí stěrových tampónů, což může ovlivnit postup stírání a efektivitu samotného stěru (kvantita získaného

materiálu). Vždy je proto nutné se řídit metodikou daného výrobce (3M, 2013; Hygiena, 2020). V rámci této studie byly porovnány 3 přístroje, které jsou v monitoringu hygieny prostředí běžně užívány (Johnson et al., 2024; Letsch et al., 2024). Pro účely práce se jednalo o luminometr č. 1 - luminometr Clean-Trace™ LM1 (3M Health Care, USA), luminometr č. 2 – luminometr EnSure (Hygiena LLC, USA) a luminometr č. 3 – luminometr SystemSURE Plus (Hygiena LLC, USA). Záměrně byly vybrány 2 typy luminometrů, které sdílí stejný odběrový systém a luminometr s odlišným odběrovým systémem. Korelace a rozdíly v naměřených hodnotách celkové ATP byly mezi luminometry sledovány v různých matricích pro vyšetření (suspenze, stěr z modelového inokulovaného povrchu a stěr z povrchu v terénu).

Pro vyšetření suspenze definovaného bakteriálního kmene byly využity odběrovky 3M Clean-Trace Water Plus-Total ATP pro luminometr č. 1 a odběrovky AquaSnap Total pro luminometr č. 2 a 3 dle metodik výrobců (3M, 2013; Hygiena, 2020). Výsledky ukázaly, že při vyšetřování suspenzí byla zjištěna vysoká závislost mezi luminometry s odlišným typem odběrovek: luminometr 1 x 2 ($rP = 0,853$) a luminometr 1 x 3 ($rP = 0,888$). V případě použití stejných odběrovek (luminometr 2 x 3), byla korelace velmi vysoká ($rP = 0,997$). Nižší korelaci ($rP = 0,59$) mezi dvěma typy luminometrů (3M Clean-Trace a Neogen AccuPoint) popisují ve své studii i Letsch et al. (2024).

Pro vyšetření stěrů v laboratoři i v terénu byly využity CleanTrace Surface ATP Test Swab UXL100 (3M, 2013) pro luminometr č. 1 a stěrové tampóny Ultrasnap (Hygiena, 2020). Obdobně jako při vyšetření suspenze i vyšetření stěrů z modelového povrchu potvrdilo vysoké korelace u luminometrů s odlišnými stěrovkami (luminometr 1 x 2: $rP = 0,815$; luminometr 1 x 3: $rP = 0,828$) a velmi vysokou korelaci u luminometrů se stejným typem stěrovek (luminometr 2 x 3: $rP = 0,997$).

Sílu závislosti tak může vedle detekční citlivosti přístroje ovlivnit i typ použitých odběrovek a stěrovek, jak potvrdily i naměřené hodnoty celkového ATP v terénních podmínkách.

V případě plastové podlahy byl pokles korelace mezi luminometry s různým typem stěrovek o 4,71 – 4,79 %. V případě stěny kovového kotce byl pokles závislosti mezi luminometry s různým typem stěrovek vyšší, a to o 21,59 – 27,89 %. Nejvýraznější pokles závislosti byl sledován na betonové podlaze, a to 27,54 – 29,57 %. V případě luminometrů, které využívaly stejný typ stěrovek, byl pokles síly korelace vlivem terénních podmínek pouze nepatrný, a to 3,21 % bez ohledu na místo měření.

Z výsledků této studie je tak zřejmé, že při porovnávání naměřených dat různých luminometrů je nutné brát v úvahu nejen detekční citlivost samotných přístrojů, ale také použitý typ stěrovek, který může ovlivnit možnosti získání vzorků z různých typů povrchů.

Dále bylo sledováno, do jaké míry se naměřené hodnoty luminometry ve výše definovaných matricích v různých podmínkách liší. Výsledky této studie ukázaly, že mezi luminometry č. 2 a 3, u kterých byly využity stejné typy odběrovek pro suspenzi (AquaSnap Total, Hygiena) a stěrovek (Ultrasnap, Hygiena) nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v naměřených hodnotách celkového ATP, a to ve všech sledovaných matricích. Obdobně ani mezi luminometry č. 1 a 2, které se již liší použitými odběrovkami a stěrovkami, nebyly v naměřených hodnotách potvrzeny statisticky významné rozdíly. Jejich detekční citlivost je však bližší ve srovnání s luminometry č. 1 a 3. Zde byly potvrzeny statisticky významné rozdíly v laboratorních podmínkách, kde se využívala čistá bakteriální kultura a dále pak v terénu na stěně porodního kotce, který měl oproti ostatním místům hladký a kovový povrch.

Z výsledků této studie je zřejmé, že přístroje s podobnou detekční citlivostí dosahují v různých podmínkách shody v naměřených hodnotách. Rozdíly lze sledovat mezi přístroji s různou detekční citlivostí. Tyto rozdíly však nevylučují možnost využití přístroje s nižší citlivostí, jak potvrzují i zjištěné závislosti mezi naměřenými hodnotami luminometrů. Pro analýzu dat je však nutné postupovat dle

metodiky výrobce. V případě specifických podmínek jako jsou chovy zvířat, je pak vhodné stanovit si škálu limitních hodnot pro daný typ luminometru obdobně jako v potravinářství (Heinemann et al., 2020b). Tuto škálu hodnocení lze získat opakovaným vzorkováním v průběhu času v daném provozu, jak uvádějí Lindell et al. (2018). Naměřené vysoké hodnoty by měly být indikací pro posouzení místa samotného odběru, pro opakovaný odběr v daném místě a zvážení odběru pro mikrobiologickou kultivaci (Efremenko et al., 2022).

Rychlá mikrobiální kultivace s využitím systému MicroSnap

Zlatý standard pro detekci mikroorganismů představují plotnové kultivační metody (Yi et al., 2020). Pro rychlé ověření čistoty nebo účinnosti provedených dezinfekčních postupů v chovech jsou však z pohledu časové náročnosti a dlouho trvající inkubace nepraktické (Chancy et al., 2023). Navíc v případě zjištěných nedostatků bakteriální kultivací, může být pro nápravná opatření již pozdě, protože v dané stáji již začíná nový turnus, jak uvádějí Heinemann et al. (2020b). Alternativou může být zrychlená mikrobiální kultivace s využitím luminometrie, kterou lze provádět přímo na farmě s minimálním vybavením, které je jinak nutné mít v mikrobiologické laboratoři (Meighan, 2014). Takovýto systém detekce poskytuje MicroSnap, jehož metodika zahrnuje pomnožovací fázi v inkubátoru a detekční fázi s využitím luminometru EnSure a přepočítání RLU na KTJ (Hygiene LLC, USA). Systém MicroSnap od společnosti Hygiene LLC (Camrillo, California, USA) je poměrně nedávnou inovací. Možnosti jeho aplikace jsou diskutovány v různých odvětvích. Samotné využití systému MicroSnap jako zrychlené detekční metody pro mikroorganismy je však předmětem pouze několika studií.

Meighan (2014) uvádí, že stěrovky MicroSnap mají prokázanou korelaci s odpovídající referenční metodou pro plotnové stanovení počtu koliformních bakterií a *E. coli*. Významnou informací je, že testy MicroSnap pro koliformní bakterie a *E. coli* prošly validací AOAC (Association of Official Analytical Collaboration), což je klíčové z pohledu budoucího využití a ověřování těchto systémů v praxi. Obdobně byla validace prostřednictvím AOAC provedena i v případě stěrůvek MicroSnap Total pro stanovení celkového počtu mikroorganismů (Meighan et al., 2016). Je však důležité uvést, že zpracované metody jsou validovány pro využití v potravinářském provozu. Navzdory této skutečnosti lze nalézt studie i z prostředí chovů zvířat, a to z oblasti hygieny napájení telat (Chancy et al., 2023; Renaud et al., 2017; Van Driessche et al., 2023).

V rámci této studie byly srovnány počty bakterií po zrychlené inkubaci stanovené luminometrií a počty bakterií narostlých na příslušných kultivačních půdách. Sledovány byly rychlou mikrobiální kultivací CPM, bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, koliformní bakterie, které jsou indikátorem znečištění prostředí a *E. coli* jako hlavní indikátor fekální znečištění (Rodrigues et al., 2018).

Tato studie potvrdila, že při hodnocení suspenze čisté bakteriální kultury (*E. coli* CCM 3988) je u MicroSnap systémů stanovujících bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* a *E. coli* významná korelace s výsledky dosaženými bakteriální kultivací. Korelace byla potvrzena vůči CPM stanoveným na krevním agaru (*Enterobacteriaceae*: $rP = 0,843$; *E. coli*: $rP = 1,000$), ale i vůči selektivnímu agaru pro stanovení *E. coli* (*E. coli*: $rP = 1,000$). Tyto výsledky tak reflektují validaci stěrůvek MicroSnap pro stanovení *E. coli* (Meighan, 2014).

Naše studie dále ukázala, že v případě inokulace modelového povrchu čistou bakteriální kulturou (*E. coli* CCM 3988) byla u všech systémů MicroSnap potvrzena významná střední až vysoká závislost (CPM: $rP = 0,866$; koliformní bakterie: $rP = 0,746$; *E. coli*: $rP = 0,756$) s CPM stanoveným na krevním agaru. Navíc byla potvrzena korelace MicroSnap pro stanovení *E. coli* i vůči selektivnímu stanovení *E. coli* pomocí HiCrome agaru ($rP = 0,756$). Výsledky tak reflektují validaci nejen stěrůvek MicroSnap pro stanovení *E. coli*, ale i pro koliformní bakterie a také pro CPM (Meighan, 2014; Meighan et al., 2016).

Navzdory potvrzeným korelacím je však nutné uvést, že koeficienty determinace (viz tabulka č. 2) byly střední, s výjimkou vztahu mezi počtem bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* a CPM stanovených na neselektivním agaru, kde byl koeficient vysoký. Je tak zřejmé, že reálné počty stanovených bakterií rychlou detekční metodou a tradiční kultivací se liší navzdory potvrzeným korelacím (posouzeno viz dále v terénních podmínkách). Příčinu lze hledat v kultivovatelnosti bakterií na plotnových metodách, kdy ne všechny bakterie porostou na vybraných médiích (Turner et al., 2010). Zatím co v případě rychlé detekční metody, luminometr po inkubaci potvrdí přítomnost ATP po rozrušení membrány všech vyselektovaných bakterií (Meighan, 2014).

Možnosti využití rychlé mikrobiální kultivace (Microsnap) byly dále ověřeny v terénních podmínkách na porodnách prasat. V terénu byly nejprve posouzeny korelace mezi počty CPM stanovené rychlou mikrobiální kultivací a počty CPM stanovené na krevním agaru, a to na 3 různých místech. Výsledky ukázaly, že u systémů MicroSnap pro stanovení CPM byly zjištěny střední korelace na podlázce ($rP = 0,619$) a stěně kotce ($rP = 0,589$) a vysoká korelace na provozní chodbě ($rP = 0,769$). K jinému závěru dospěli Meighan et al. (2016), kteří ve své studii popisují korelaci na úrovni 0,9184. Sledovanými matricemi však byly vybrané druhy potravin.

Dále byly sledovány korelace mezi počty bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, koliformních bakterií a *E-coli* stanovené rychlou mikrobiální kultivací (MicroSnap) a počty těchto bakterií stanovené příslušnými plotnovými metodami kultivace. Výsledky potvrdily rozdíly v přítomnosti korelací, a to v závislosti na sledovaném povrchu.

Výsledky ukázaly, že systémy Microsnap korelovaly s příslušnými selektivními agary bakteriální kultivace, a to v případě provozní chodby u všech sledovaných skupin gramnegativních bakterií: bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* ($rP = 0,777$), koliformní bakterie ($rP = 0,809$) i *E-coli* ($rP = 0,884$). V případě podlázky prasat korelovaly pouze u bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* ($rP = 0,843$) a koliformních bakterií ($rP = 0,698$). Na stěně kotce nebyla korelace systémů MicroSnap s plotnovými metodami potvrzena.

Z dostupných studií jsou k dispozici pouze údaje o korelacích mezi počtem koliformních bakterií stanovených stěrovkami MicroSnap a počtem koliformních bakterií stanovených klasickou kultivací. Na rozdíl od výsledků této studie byly zjišťovány nižší statisticky významné závislosti ($p < 0,01$): $rP = 0,366$ (Van Driessche et al., 2023); $rP = 0,42$ (Renaud et al., 2017); $rP = 0,569$ (Chancy et al., 2023).

Dále byly posouzeny rozdíly v množství detekovaných mikroorganismů mezi rychlou mikrobiální kultivací (MicroSnap) a tradičními plotnovými metodami, a to v terénních podmínkách. Srovnány byly výsledky po mechanické očištění, aby se vyloučila přítomnost silného organického znečištění, jak uvádějí Luyckx et al. (2015).

Výsledky potvrdily, že rychlou bakteriální kultivací s detekcí pomocí luminometrie (Microsnap) je zjišťován vyšší počet bakterií ve srovnání s tradiční kultivací. Tento počet byl v logaritickém vyjádření KTJ v průměru o 1,53 vyšší u bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, o 1,44 vyšší u koliformních bakterií a o 2,36 vyšší u *E-coli*. Příčinu lze hledat v selektivních médiích plotnových metod tradiční kultivace, kde růstová schopnost bakterií může být snížena (Turner et al., 2010). Naopak CPM stanovené rychlou bakteriální kultivací (MicroSnap) byly ve srovnání s tradičními metodami využívajícím neselektivní krevní agar nižší, a to v průměru o 0,35 log KTJ. To může být dáno skutečností, že pro rychlou mikrobiální kultivaci jsou používány k inkubaci pouze teploty 30 °C (dle metodiky výrobce), zatímco tradiční inkubace CPM na krevním agaru je při teplotě 36 °C. V případě, že byly výsledky CPM stanovené pomocí MicroSnap srovnány s výsledky tradiční kultivace psychrofilních bakterií při teplotě 22 °C, byly naopak výsledky naměřené pomocí MicroSnap vyšší, a to v průměru o 2,88 log KTJ. Příčinou je skutečnost, že při této teplotě rostou na PCA agaru pomalu

rostoucí plísně a kvasinky, což vede k mírně odlišnému spektru mikroorganismů od spektra mikroorganismů rostoucích při 30 °C. Výsledky CPM stanovené rychlou bakteriální kultivací s využitím MicroSnap a zvolenými metodami tradiční kultivace CPM tak nemohou být srovnatelné.

Závěr

V této studii byly posouzeny možnosti praktického použití luminometrie pro monitoring hygieny prostředí zvířat. Z výsledků této studie vyplývá, že metody měření celkového ATP a rychlé mikrobiální kultivace (systém MicroSnap) mohou být v chovech uplatňovány. V rámci hodnocení je ale nutné zvážit všechny faktory a tím i limitace, které mají vliv na získané výsledky. Tato studie dokládá, že luminometrie představuje k bakteriální kultivaci terénní metodu rychlého ověření organické kontaminace, která může zahrnovat i mikrobiální znečištění. Použití luminometrů v monitoringu čistících a sanitačních úkonů, které se provádějí v turnusových systémech chovů prasat na porodnách lze tak s ohledem na výsledky této studie doporučit. Rychlá detekce čistoty prostředí může přispět ke zlepšení hygieny chovů a zdraví zvířat v chovu díky včasné reakci na nedostatky zjištěné měření bezprostředně po provedených úkonech sanitace. Pro plošné využití na porodnách prasat je ale nutné stanovit pro každý přístroj kritické limity obdobně jako v potravinářských provozech. Závěrem je nutné uvést, že systém měření celkového ATP nelze využít jako plnohodnotnou náhradu za bakteriální kultivaci. Rovněž zrychlenou mikrobiální kultivaci (systém MicroSnap) nelze zcela nahradit tradiční plotnové metody. Oba tyto systémy mohou být dílčí metodou, která by měla být v případě významných nedostatků zjištěných měření podpořena výsledky plotnové kultivace. Námětem pro další studii jsou možnosti použití dalšího z rychlých detekčních přístrojů, a to mobilního průtokového cytometru pro monitoring hygieny prostředí zvířat.

Poděkování

Tímto bychom rádi poděkovali:

MVDr. Lenka Hromádková (Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Oddělení biologických metod) za zajištění sbírkové kultury *E. coli* CCM 3988 a cenné rady v rámci provádění mikrobiologického monitoringu v terénních podmínkách.

Ing. Vojtěch Kabrhel (ADDICOO GROUP s.r.o., Sanitace potravinářských provozů a farem) za zajištění vstupu do chovu prasat, zapůjčení luminometru Clean-Trace™ LM1 a spolupráci při odebírání vzorků pomocí luminometrů.

RNDr. Petra Šplíchalová, Ph.D. (BIO-RAD spol. s r.o., Aplikační specialista pro klinickou diagnostiku a kontrolu kvality) za cenné rady z oblasti mikrobiologie při provádění laboratorních a terénních odběrů vzorků.

Tato práce byla finančně podpořena ITA VETUNI (projekt č. 2024ITA26).

Literatura

- 3M, 2013. Product Instructions UXL100. [online]. [vid. 28. 11. 2024]. Dostupné z: https://www.scientificlabs.co.uk/handlers/libraryFiles.ashx?filename=Manuals_F_FSA1094_B.pdf
- Alvarado, A.C., Cabahug, J., Predicala, B.Z., 2020. ATP bioluminescence method as a rapid tool for assessment of cleanliness of commercial animal transport trailers. *Canadian Biosystem Engineering Journal* 62: 1-7.
- Aycicek, H., Oguz, U., Karci, K., 2006. Comparison of results of ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing methods for the determination of surface cleanliness at a hospital kitchen. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 209: 203-206.
- Bakke, M., Suzuki, S., 2018. Development of a Novel Hygiene Monitoring System Based on the Detection of Total Adenylate (ATP+ADP+AMP). *Journal of Food Protection* 81: 729-737.
- Buczinski, S., Morin, M.-P., Roy, J.-P., Rousseau, M., Villettaz-Robichaud, M., Dubuc, J., 2022. Use of ATP luminometry to assess the cleanliness of equipment used to collect and feed colostrum on dairy farms. *Journal of Dairy Science* 105: 1638-1648.
- Cannon, J.L., Park, G.W., Anderson, B., Leone, C., Chao, M., Vinjé, J., Fraser, A.M., 2022. Hygienic monitoring in long-term care facilities using ATP, crAssphage, and human noroviruses to direct environmental surface cleaning. *American Journal of Infection Control* 50: 289-294.
- Chancy, A., Santschi, D.E., Paquet, É.R., Renaud, D.L., Gauthier, M.-L., Charbonneau, É., Barbeau-Grégoire, N., Van Driessche, L., Buczinski, S., 2023. Standardization and validation of ATP luminometry as a diagnostic tool to assess the cleanliness of feeding equipment in preweaning calves. *Journal of Dairy Science* 106: 6263-6274.
- Colquhoun, K.O., Timms, S., Fricker, C.R., 1998. A simple method for the comparison of commercially available ATP hygiene-monitoring systems. *Journal of Food Protection* 61: 499-501.
- E, S., Wang, Y., Egli, T., Hammes, F., 2008. Correlations between total cell concentration, total adenosine tri-phosphate concentration and heterotrophic plate counts during microbial monitoring of drinking water. *Drinking Water Engineering and Science Discussions* 1: 71-86.
- Efremenko, E., Senko, O., Stepanov, N., Maslova, O., Lomakina, G.Y., Ugarova, N., 2022. Luminescent Analysis of ATP: Modern Objects and Processes for Sensing. *Chemosensors* 10: 493.
- Hammes, F., Berney, M., Wang, Y., Vital, M., Köster, O., Egli, T., 2008. Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Research* 42: 269-277.
- Heinemann, C., Leubner, C.D., Hayer, J.J., Steinhoff-Wagner, J., 2020a. Hygiene management in newborn individually housed dairy calves focusing on housing and feeding practices. *Journal of Animal Science* 99: 1-13.
- Heinemann, C., Meyer, I., Bögel, F.T., Schmid, S.M., Hayer, J.J., Steinhoff-Wagner, J., 2020b. Individual training for farmers based on results from protein and ATP rapid tests and microbiological conventional cultural methods improves hygiene in pig fattening pens. *Journal of Animal Science* 98: 1-10.
- Hinkle, D.E., Wiersma, W., Jurs, S.G., 2003. *Applied Statistics for the Behavioral Sciences*. Boston, Mass., (etc.): Boston: Houghton Mifflin Co. 84-87 pp.

- Hygiena, 2024. ATP Monitoring. [online]. [vid. 28. 11. 2024]. Dostupné z: <https://www.hygiena.com/hygiene-monitoring>
- Hygiena, 2020. UltraSnap® Surface ATP Test. [online]. [vid. 28. 11. 2024]. Dostupné z: <https://www.hygiena.com/documents/64066/ultrasnap-instructions-en.pdf>
- Johnson, D.C., Leal, L.A., Perez, J.G., Segundo, D., Welch, M.W., Parr, E., Meyer, M., Hedblom, G.A., Lopez-Velasco, G., Mayo-Gibbons, M., Molitor, A., Classen, D.M., Dillard, M., Boler, D.D., 2024. Evaluation of ATP bioluminescence for rapid determination of farrowing room cleanliness after pressure washing at a commercial sow farm. *Translational Animal Science* 8: txae138.
- Letsch, F.G., Welch, M.W., Meyer, M., Hedblom, G.A., Parr, E., Classen, D.M., Dillard, M., Boler, D.D., 2024. Evaluation of ATP bioluminescence for rapid determination of cleanliness of livestock trailers after a commercial wash. *Translational Animal Science* 8: txae052.
- Lindell, I.C., Lundh, Å., Sjaunja, K.S., Cederholm, M., 2018. Adenosine triphosphate bioluminescence for hygiene testing of rubber liners and tubes on dairy farms. *Journal of Dairy Science* 101: 2438-2447.
- Luyckx, K., Dewulf, J., Van Weyenberg, S., Herman, L., Zoons, J., Vervae, E., Heyndrickx, M., De Reu, K., 2015. Comparison of sampling procedures and microbiological and non-microbiological parameters to evaluate cleaning and disinfection in broiler houses. *Poultry Science* 94: 740-749.
- Luyckx, Kaat, Dewulf, J., Van Weyenberg, S., Herman, L., Zoons, J., Vervae, E., Heyndrickx, M., Reu, K., 2015. Comparison of sampling procedures and microbiological and non-microbiological parameters to evaluate cleaning and disinfection in broiler houses. *Poultry Science* 94: 740-749.
- Mannion, C., Leonard, F.C., Lynch, P.B., Egan, J., 2007. Efficacy of cleaning and disinfection on pig farms in Ireland. *Veterinary Record* 161: 371-375.
- Meighan, P., 2014. Validation of the MicroSnap Coliform and E. coli Test System for Enumeration and Detection of Coliforms and E. coli in a Variety of Foods. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 97: 453-478.
- Meighan, P., Smith, M., Datta, S., Katz, B., Nason, F., 2016. The Validation of the MicroSnap Total for Enumeration of Total Viable Count in a Variety of Foods. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 99: 686-694.
- Microsnap, Hygiena, 2017. Microsnap - Rapid Microorganism Detection. [online]. [vid. 28. 11. 2024]. Dostupné z: <https://campaigns.hygiena.com/acton/media/38777/microsnap-indicator-organism-test>
- Mildenhall, K.B., Rankin, S.A., 2020. Implications of Adenylate Metabolism in Hygiene Assessment: A review. *Journal of Food Protection* 83: 1619-1631.
- Nante, N., Ceriale, E., Messina, G., Lenzi, D., Manzi, P., 2017. Effectiveness of ATP bioluminescence to assess hospital cleaning: a review. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene* 58: E177-E183.
- Osimani, A., Garofalo, C., Clementi, F., Tavoletti, S., Aquilanti, L., 2014. Bioluminescence ATP Monitoring for the Routine Assessment of Food Contact Surface Cleanliness in a University Canteen. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11: 10824-10837.

- Renaud, D.L., Kelton, D.F., LeBlanc, S.J., Haley, D.B., Jalbert, A.B., Duffield, T.F., 2017. Validation of commercial luminometry swabs for total bacteria and coliform counts in colostrum-feeding equipment. *Journal of Dairy Science* 100: 9459-9465.
- Rodrigues, L.B., Santos, L.R. dos, Rizzo, N.N., Ferreira, D., Oliveira, A.P. de, Levandowski, R., Webber, B., Nascimento, V.P. do, 2018. ATP-bioluminescence and conventional microbiology for hygiene evaluation of cutting room surfaces in poultry slaughterhouse. *Acta Scientiae Veterinariae* 46: 1534.
- Svoboda, T., Špelina, V., Petráš, P., Horová, V., Šerý, R., Vrkoslavová, J., 2019. Microbiological monitoring of laboratory mice environment in a barrier experimental facility. *Hygiene* 64: 105-111.
- Turner, D.E., Daugherty, E.K., Altier, C., Maurer, K.J., 2010. Efficacy and Limitations of an ATP-Based Monitoring System. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 49: 190-195.
- van Arkel, A., Willemsen, I., Kluytmans, J., 2021. The correlation between ATP measurement and microbial contamination of inanimate surfaces. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 10: 116.
- Van Driessche, L., Santschi, D.E., Paquet, É., Renaud, D., Charbonneau, É., Gauthier, M.-L., Chancy, A., Barbeau-Grégoire, N., Buczinski, S., 2023. Hygiene management practices and adenosine triphosphate luminometry of feeding equipment in preweaning calves on dairy farms in Quebec, Canada. *Journal of Dairy Science* 106: 8885-8896.
- Willis, C., Morley, R., Westbury, J., Greenwood, M., Pallett, A., 2007. Evaluation of ATP bioluminescence swabbing as a monitoring and training tool for effective hospital cleaning. *British Journal of Infection Control* 8: 17-21.
- Yi, S.-W., Cho, A., Kim, E., Oh, S.-I., Roh, J.H., Jung, Y.-H., Choe, C., Yoo, J.G., Do, Y.J., 2020. Evaluation of adenosine triphosphate testing for on-farm cleanliness monitoring compared to microbiological testing in an empty pig farrowing unit. *Journal of Animal Science and Technology* 62: 682-691.

Cíl 3: Zhodnocení welfare psů využívaných při canisterapii na základě analýzy chování v průběhu trvání terapeutické intervence

BEHAVIORÁLNÍ PROJEVY PSŮ V PRŮBĚHU CANISTERAPEUTICKÉ PRAXE

Dominik Vacuška, Zdeňka Vacušková, Lucia Kotianová, Lucie Kováčová, Eva Voslářová, Vladimír Večerek

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

Abstrakt

Canisterapeutická praxe je pro psy potenciálně stresovou činností. Cílem studie bylo zhodnocení dopadu délky trvání canisterapeutické práce psů na jejich behaviorální projevy. Na základě odborných článků a vědecké literatury byly pro analýzu vybrány nejčastěji využívané behaviorální projevy psů. Pro analýzu chování zvířat bylo sledováno 10 terapeutických psů se splněnými canisterapeutickými zkouškami při pětiminutových intervencích u každého klienta během celkové hodinové návštěvy domova seniorů. Četnosti sledovaných prvků chování z jednotlivých časových intervalů byly následně analyzovány. Psi v průběhu jednotlivých pravidelných návštěv zařízení navštěvovali klienty na pokojích s vybavením pro udržování stálého mikroklimatu a vždy pracovali u lůžek i na lůžkách totožných klientů, vždy ve stejném časovém zastoupení. Z analyzovaných prvků chování psi nejčastěji vykazovali olizování se a takzvané velrybí oko. Ve srovnání s ostatními behaviorálními projevy byly četnosti zmíněných prvků statisticky vysoce významně využívanější ($p < 0,01$). Na základě četností sledovaných prvků chování bylo zjištěno, že se zvyšující se dobou trvání výkonu činnosti rostou četnosti behaviorálních projevů, které jsou u psů spojované se stresem ($p < 0,01$). Vysoce významně se v průběhu času zvyšovaly četnosti projevů chování označovaných jako olizování se ($p = 0,0007$), velrybí oko ($p = 0,0063$), uhýbání pohledem ($p = 0,0014$) a hledání majitele ($p = 0,0003$). Dle zjištěných výsledků lze usuzovat, že doba trvání canisterapeutických intervencí ovlivňuje behaviorální projevy psů a má tak vliv na jejich pohodu v průběhu výkonu činnosti.

Úvod

Zapojení zvířat do procesů humánní terapie je v současné době běžnou praxí. Zvířata jsou hojně využívána v mnoha odvětvích animoterapie a popularita intervencí za pomoci zvířat celosvětově stoupá (Palley et al., 2010; Fine et al., 2019). Nevelké množství studií však bylo zaměřených na zkoumání dopadu takových intervencí na terapeutická zvířata, a to i přes jejich značný stresový potenciál (McCullough et al., 2018; Cortesi et al., 2024).

Vědci v současné době pro výzkum animoterapie navrhují postupovat v souladu s konceptem One Health, který popisuje, za jakých okolností nedochází k žádnému kompromisu mezi prospěchem člověka a zdravím a pohodou zvířat a za jakých okolností by zvířata mohla mít z takových interakcí prospěch (Hediger et al., 2019; Menna et al., 2019). Dosud však bylo provedeno a publikováno malé

množství studií o dopadech na psy účastnících se intervencí (Glenk, 2017). Se stoupající popularitou intervencí za pomoci zvířat a v rámci aplikace konceptu One Health pro animoterapii je potřeba konkrétněji identifikovat přínosy a rizika v oblasti zdraví a pohody všech účastníků, lidí i zvířat (Fine et al., 2019; Gallagher et al., 2021; Hediger et al., 2019; Menna et al., 2019).

Nejen díky své dostupnosti, ale především díky dobrým předpokladům pro výcvik a trénink a také předvídatelnému chování jsou v oblasti animoterapie hojně využíváni právě psi (Glenk, 2017). Značné využívání zvířat v této oblasti stoupá s publikováním současných výzkumů o pozitivním dopadu na klienty. Popisovány jsou fyzické, emocionální, sociální i psychologické výhody (Braun et al., 2009; Beggs and Townsend, 2021). Pro psy však může být práce v prostředí canisterapeutických intervencí spojená s rizikem naplnění stresového potenciálu této činnosti (Yong and Ruffman, 2014; Glenk, 2017; McCullough et al., 2018).

Nejen změny v mimice tváře, ale také změny pohybu a postoje těla se řadí mezi citlivé indikátory emočního stavu daného jedince (Hall et al., 2018; Bremhorst et al., 2019; Flint et al., 2024). Jsou popsány různé kombinace jednotlivých prvků chování, různé frekvence využívání v závislosti na okolních podmínkách nebo také takzvaný syndrom vyhoření (Bremhorst et al., 2019; Cortesi et al., 2024). Řada studií zaměřených na behaviorální známky stresu u psů uvádí jako nejčastěji vykonávané prvky chování spojené se stresovou situací zvýšenou lokomoční aktivitu, úlekové reakce, lapání po dechu, rozšíření zornic či takzvané velrybí oko, uhýbání pohledem, chvění, kňučení, nadměrné olizování, zívání, schovávání se, zdvihání končetiny a snížené držení těla (Beerda et al., 1999; Beerda et al., 2000; Dreschel and Granger, 2005). Byly provedeny studie, které popisují propojení určitých prvků chování s určitými situacemi. Psi vystavení sociálnímu a prostorovému omezení vykazovali zvýšenou frekvenci lokomoce, zdvihání končetiny, zívání a otřepání se (Beerda et al., 2000). Otřepání se a zívání bylo společně s olizováním identifikováno jako průvodní projevy stresu při výcviku pracovních psů, zatímco zvedání končetiny bývá spojeno se stavem konfliktu a strachem z trestu (Schilder and van der Borg, 2004; Bellaiio et al., 2009). Odpověď organismu je však výsledkem kombinace individuálního vnímání dané situace a dalších faktorů včetně genetické výbavy, povahy jedince či dřívějších zkušeností, a proto je i přes zmíněné výsledky studií nutné brát v potaz individualitu každého jedince a tím vzniklé možné rozdíly v průběhu vyhodnocování dat (Haubenhofer and Kirchengast, 2007; McCullough et al., 2018). Vliv na četnosti behaviorálních projevů stresu u canisterapeutických psů, rovněž jako na hladiny slinného kortizolu může mít věk, zkušenosti a trénink psa včetně jeho navykání na dané situace nebo také předvídatelné prostředí či naopak nové sociálně-ekologické okolnosti, také věk klientů a s ním spojené chování a v neposlední řadě mikroklima pracovního prostředí (Haubenhofer et al., 2005; Marinelli et al., 2009; King et al., 2011; Glenk et al., 2013; Glenk et al., 2014; Ng et al., 2014). Je tedy nezbytné, aby chovatel měl dostatečné znalosti nejen o individualitě svého psa, ale zejména musí porozumět jeho chování prostřednictvím mezidruhové komunikace, jako jsou pohyby, mimika a držení těla (Kaminski and Nitzscher, 2013; Walsh et al., 2024).

Stávající literatura dosud přináší nejednotné výsledky na poli emočního stavu a pohody terapeutických zvířat (Clark et al., 2020). Předmětem studií v současné době zůstává, do jaké míry jsou určité behaviorální projevy pracovních psů spojeny s negativním stresem či pozitivním vzrušením (Haubenhofer and Kirchengast, 2006; Edgar et al., 2012). Některé formy canisterapie dokonce mohou mít za důsledek i uvolnění psa (Clark et al., 2020). Zohlednění celosvětově rostoucího zájmu a počtu takto využívaných psů, zajištění jejich pohody a identifikace situací a okolností, které mohou ohrozit dobré životní podmínky zvířat, zůstává klíčovou oblastí vědeckého úsilí (Glenk and Foltin, 2021).

Materiál a metodika

Pro zhodnocení welfare psů využívaných při canisterapii na základě behaviorálních projevů v průběhu trvání terapeutické intervence bylo využito 10 terapeutických psů se splněnými canisterapeutickými zkouškami. Na základě odborných článků a vědecké literatury byly vybrány analyzované behaviorální projevy psů. Do hodnocení byly zařazeny následující prvky chování – olizování, otřepání se, velrybí oko, zívání, zdvihání končetiny, uhýbání pohledem, hledání majitele a snaha uniknout ze situace. Psi byli sledováni v průběhu pětiminutových intervalů u každého klienta (práce u lůžka a na lůžku) během celkové hodinové návštěvy zařízení a následně byly vyhodnocovány četnosti vybraných prvků chování. Sledování behaviorálních projevů bylo prováděno během jednotlivých pravidelných návštěv zařízení u totožných klientů v místnostech s vybavením pro udržování stálého mikroklimatu. Po celou dobu sledování chování psů byly pořizovány videozáznamy paralelně na dvě přenosné kamery Niceboy Vega X Pro (NICEBOY s.r.o., ČR) pro pozdější vyhodnocení. Následná analýza videozáznamů byla provedena pomocí specializovaného software pro analýzu chování The Observer XT (Noldus Information Technology, Nizozemsko). Statistické zpracování získaných dat proběhlo v programu UNISTAT 6.5 pro Excel (UnistatLtd., London, UK) s využitím korelační analýzy a chí-kvadrát testu. Hodnota $p < 0,05$ byla vyhodnocena jako statisticky významná a hodnota $p < 0,01$ jako statisticky vysoce významná.

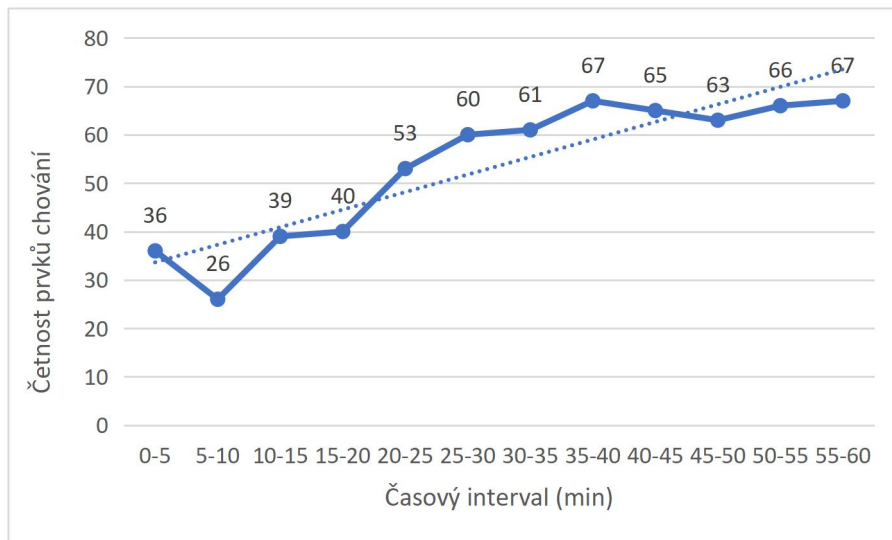
Výsledky a diskuze

Z analyzovaných prvků chování psi nejčastěji vykazovali olizování se a takzvané velrybí oko. Ve srovnání s ostatními behaviorálními projevy byly četnosti těchto prvků statisticky vysoce významně vyšší ($p < 0,01$). Mezi využíváním zmíněných dvou etologických projevů pak byl také zaznamenán rozdíl, kdy bylo více projevováno olizování ($p = 0,0000$). Orální behaviorální projevy, zejména pak právě olizování, bývají u psů často jedny z nejvyužívanějších (Beerda et al., 1999; McCullough et al., 2018). Zmíněné prvky chování bývají také často spojovány se stresovou situací nebo také s frustrací psů (Beerda et al., 2000; Bremhorst et al., 2019).

Na základě četností sledovaných prvků chování znázorněných v grafu č. 1 bylo zjištěno, že se zvyšující se dobou trvání výkonu činnosti rostou četnosti behaviorálních prvků, které jsou u psů spojované se stresem ($p < 0,01$). Tyto výsledky odpovídají i dřívějším studiím, které mezi vlivy na behaviorální projevy psů v průběhu praxe řadí mimo jiné délku činnosti, denní dobu či počet jednotlivých aktivit za jednotku času (Haubenhofers and Kirchengast, 2006; Haubenhofers and Kirchengast, 2007).

V průběhu času se vysoce významně zvyšovaly četnosti projevů chování označovaných jako olizování se ($p = 0,0007$), velrybí oko ($p = 0,0063$), uhýbání pohledem ($p = 0,0014$) a hledání majitele ($p = 0,0003$). Zmíněné prvky chování byly již dříve spojeny s vystavením psů sociálnímu či prostorovému omezení či s výcvikem pracovních psů (Beerda et al., 2000; Schilder and van der Borg, 2004). Z poměrně značného zastoupení chování označeného jako hledání majitele lze vyvozovat důležitost vazby psa s chovatelem během praxe a podtrhává tak důležitost seřazenosti canisterapeutického týmu pes – chovatel. Důležitost této vazby podtrhávají odlišnosti mezi komunikací psa se svým majitelem a psa s cizí osobou, a v neposlední řadě pak také samotných psů mezi sebou (Walsh et al., 2024). Psovod by měl být současně také schopný ovlivnit prožívání psa při konkrétní situaci v prostředí a tím i míru stresu prostřednictvím vytváření řízených a předvídatelných interakcí (Ng et al., 2014).

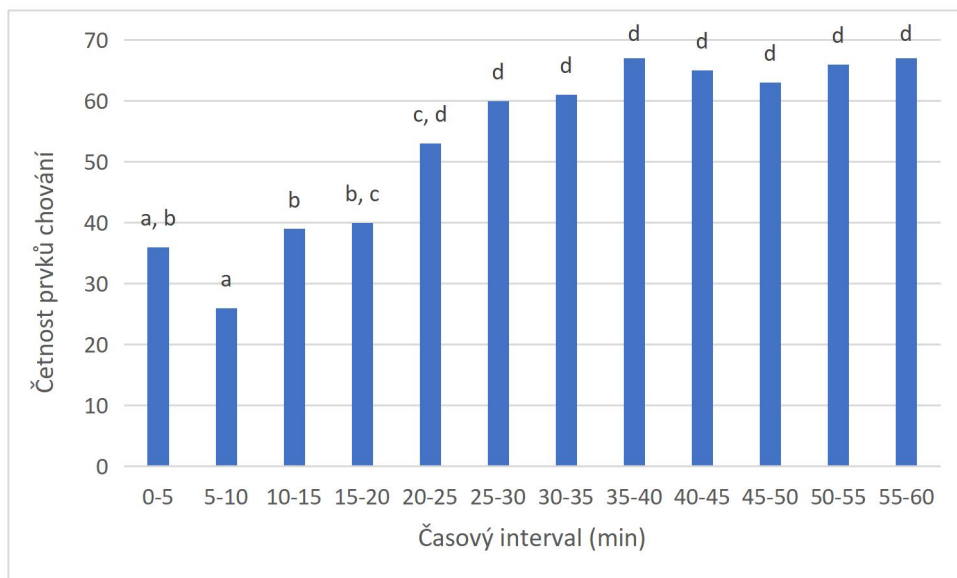
Graf č. 1. Četnosti behaviorálních projevů psů v průběhu času



Z grafu č. 2 obsahujícím znázornění statistických významností rozdílů v četnostech sledovaných prvků chování v nadefinovaných časových intervalech je patrné, že k významnému nárůstu behaviorálních projevů, jež lze spojovat se snížením pohody psů docházelo zejména v průběhu časového intervalu 20 - 25 minut délky činnosti. Tento časový interval se v rámci hodnocení četností chování statisticky významně nelišil od sousedních intervalů ($p = 0,0566$ pro interval 15 - 20 min; $p = 0,3517$ pro interval 25 - 30 min). Mezi těmito dvěma intervaly již však byl prokázán statistice vysoce významný rozdíl ($p = 0,0047$). Tuto časovou hranici však nelze univerzálně aplikovat na veškeré činnosti, které canisterapie zahrnuje s ohledem na vlivy odlišných prostředí, mikroklimatu, skupiny klientů, věku a zkušeností psů (Haubenhofer et al., 2005; Marinelli et al., 2009; King et al., 2011; Glenk et al., 2013; Glenk et al., 2014; Ng et al., 2014). Důležitým faktorem, který znemožňuje pevné stanovení zmíněné časové hranice napříč všemi odvětvími canisterapie je také individualita každého psa. Publikované studie se proto mohou v závislosti na výše uvedeném výsledkově rozcházet (Haubenhofer and Kirchengast, 2007; McCullough et al., 2018).

Po dosažení zvýšených hodnot s časovou hranicí 25 minut výkonu činnosti se již četnosti analyzovaných prvků chování statisticky významně nezvyšovaly ($p > 0,05$). Je však nutné zmínit, že s ohledem na velké množství faktorů ovlivňujících terapeutické psy, nemusí překročení či nepřekročení této časové hranice vést ke snížení či zachování optimální úrovně welfare zvířat (Cortesi et al., 2024). Nejen zvyšující se četnosti uváděných prvků chování mohou odkazovat na sníženou úroveň pohody psů. I jejich různé kombinace či dokonce absence může odkazovat na snížení welfare (Bremhorst et al., 2019).

Graf č. 2. Porovnání četností behaviorálních projevů psů v pětiminutových intervalech



a,b,c,d hodnoty s rozdílným indexem indikují statisticky významný ($p < 0,05$) rozdíl

Závěr

Dle zjištěných výsledků lze usuzovat, že doba trvání canisterapeutických intervencí ovlivňuje behaviorální projevy psů a má tak vliv na jejich pohodu v průběhu výkonu činnosti. I přes individualitu jednotlivých psů a multifaktorialitu aspektů welfare studie podtrhává důležitost volby vhodného časového režimu praxe. Dle výsledků této studie by psi s ohledem na jejich pohodu neměli překračovat časovou hranici 25 minut. Překročení tohoto času je pak na zvážení a odpovědnosti chovatele, který by měl umět vyhodnotit konkrétní situaci, prostředí a konkrétní vykonávanou činnost. Využívání psů pro účely canisterapie lze tedy považovat za činnost se stresovým potenciálem pro zvířata a jejich přetěžování může značně ovlivnit jejich pohodu. Další studie by se tak v tomto směru měly zaměřit na upřesnění časové hranice i v jiných oblastech canisterapie s výsledným doporučením časového režimu využívání psů při této praxi. Pro podrobné zanalyzování dopadů canisterapeutické praxe na welfare těchto zvířat je tedy potřeba pokračovat ve výzkumné činnosti v této oblasti.

Tato práce byla finančně podpořena ITA VETUNI (projekt č. 2024ITA26).

Literatura

- Beerda, B., Schilder, M.B.H., Van Hooff, J.A.R.A.M., De Vries, H.W., Mol, J.A. 1999. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. I. Behavioral responses. *Physiology & Behavior* 66: 233-242.
- Beerda, B., Schilder, M.B.H., Van Hooff, J.A.R.A.M., De Vries, H.W., Mol, J.A. 2000. Behavioural and hormonal indicators of enduring environmental stress in dogs. *Animal Welfare* 9: 49-62.
- Beggs, S., Townsend, R. 2021. The role of connection in the efficacy of animal-assisted therapies: A scoping review. *Aotearoa New Zealand Social Work* 33: 34-47.
- Bellaio, E., Normando, S., Bono, G. 2009. Stress assessment in rescue dogs during routine training sessions. *Journal of Veterinary Behavior* 4: 83.
- Braun, C., Stangler, T., Narveson, J., Pettingell, S. 2009. Animal-assisted therapy as a pain relief intervention for children. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 15: 105-109.
- Bremhorst, A., Sutter, N.A., Würbel, H., Mills, D.S., Riemer, S. 2019. Differences in facial expressions during positive anticipation and frustration in dogs awaiting a reward. *Scientific Reports* 9: 19312.
- Clark, S.D., Martin, F., McGowan, R.T.S., Smidt, J.M., Anderson, R., Wang, L., Turpin, T., Langenfeld-McCoy, N., Bauer, B.A., Mohabbat, A.B. 2020. Physiological state of therapy dogs during animal-assisted activities in an outpatient setting. *Animals* 10: 819.
- Cortesi, B.C., Palestini, C., Buttram, D., Cannas, S. 2024. Stress and burnout in dogs involved in animal assisted interventions: A survey of Italian handlers' opinion. Available at SSRN 4870618.
- Dreschel, N.A., Granger, D.A. 2005. Physiological and behavioral reactivity to stress in thunderstorm-phobic dogs and their caregivers. *Applied Animal Behaviour Science* 95: 153-168.
- Edgar, J.L., Nicol, C.J., Clark, C.C.A., Paul, E.S. 2012. Measuring empathic responses in animals. *Applied Animal Behaviour Science* 138: 182-193.
- Fine, A.H., Beck, A.M., Nh, Z. 2019. The state of animal-assisted interventions: Addressing the contemporary issues that will shape the future. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16: 3997.
- Flint, H.E., Weller, J.E., Parry-Howells, N., Ellerby, Z.W., McKay, S.L., King, T. 2024. Evaluation of indicators of acute emotional states in dogs. *Scientific Reports* 14: 6460.
- Gallagher, C.A., Keehner, J.R., Hervé-Claude, L.P., Stephen, C. 2021. Health promotion and harm reduction attributes in one health literature: A scoping review. *One Health* 13: 100284.
- Glenk, L.M. 2017. Current perspectives on therapy dog welfare in animal-assisted interventions. *Animals* 7: 7.
- Glenk, L.M., Foltin, S. 2021. Therapy dog welfare revisited: A review of the literature. *Veterinary Sciences* 8: 226.
- Hall, C., Randle, H., Pearson, G., Preshaw, L., Waran, N. 2018. Assessing equine emotional state. *Applied Animal Behaviour Science* 205: 183-193.
- Haubehofer, D.K., Kirchengast, S. 2006. Physiological arousal for companion dogs working with their owners in animal-assisted activities and animal-assisted therapy. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 9: 165-172.
- Haubehofer, D.K., Kirchengast, S. 2007. Dog handlers' and dogs' emotional and cortisol secretion responses associated with animal-assisted therapy sessions. *Society & Animals* 15: 127-150.
- Haubehofer, D., Möstl, E., Kirchengast, S. 2005. Cortisol concentrations in saliva of humans and their dogs during intensive training courses in animal-assisted therapy. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 92: 66-73.
- Hediger, K., Meisser, A., Zinsstag, J. 2019. A one health research Framework for animal-assisted interventions. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16: 640.
- Kaminski, J., Nitzschner, M. 2013. Do dogs get the point? A review of dog-human communication ability. *Learning and Motivation* 44: 294-302.
- King, C., Watters, J., Mungre, S. 2011. Effect of a time-out session with working animal-assisted therapy dogs. *Journal of Veterinary Behavior* 6: 232-238.

- Marinelli, L., Normando, S., Siliprandi, C., Salvadoretti, M., Mongillo, P. 2009. Dog assisted interventions in a specialized centre and potential concerns for animal welfare. *Veterinary Research Communication* 33: 93-95.
- McCullough, A., Jenkins, M.A., Rerhrdanz, A., Gilmer, M.J., Olson, J., Pawar, A., Holley, L., Sierra Rivera, S., Linder, D.E., Pichette, D., Grossman, N.J., Hellman, C., Guérin, N. A., O'Haire, M.E. 2018. Physiological and behavioral effects of animal-assisted interventions on therapy dogs in pediatric oncology settings. *Applied Animal Behaviour Science* 200: 86-95.
- Menna, L.F., Santaniello, A., Todisco, M., Amato, A., Borrelli, L., Scandurra, C., Fioretti, A. 2019. The human-animal relationship as the focus of animal-assisted interventions: A one health approach. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16: 3360.
- Ng, Z.Y., Pierce, B.J., Otto, C.M., Buechner-Maxwell, V.A., Siracusa, C., Werre, S.R. 2014. The effect of dog-human interaction on cortisol and behavior in registered animal-assisted activity dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 159: 69-81.
- Palley, L.S., O'Rourke, P.P., Niemi, S. 2010. Mainstreaming animal-assisted therapy. *ILAR Journal* 51: 199-207.
- Schilder, M.B.H., van der Borg, J.A.M. 2004. Training dogs with help of the shock collar: Short and long term behavioural effects. *Applied Animal Behaviour Science* 85: 319-334.
- Yong, M.H., Ruffman, T. 2014. Emotional contagion: Dogs and humans show a similar physiological response to human infant crying. *Behavioural Processes* 108: 155-165.
- Walsh, E.A., Meers, L.L., Samuels, W.E., Boonen, D., Claus, A., Duarte-Gan, C., Stevens, V., Contalbrigo, L., Normando, S. 2024. Human-dog communication: How body language and non-verbal cues are key to clarity in dog directed play, petting and hugging behaviour by humans. *Applied Animal Behaviour Science* 272: 106206.

Cíl 4: Posouzení faktorů ovlivňujících koncentraci kortizolu v srsti koček při hodnocení pohody zvířat

FAKTORY OVPLYVŇUJÚCE KONCENTRÁCIU KORTIZOLU V SRSTI MAČEK

Veronika Vojtkovská, Monika Šebánková, Naďa Konečná, Simona Kovaříková, Karla Štěpánková

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

Abstrakt

Vzhľadom k tomu, že chronický stres môže mať významný dopad na celkovú úroveň životných podmienok mačiek v záujmovom chove, je na mieste skúmanie metód, vďaka ktorým je možné objektívne zhodnotenie welfare. Cieľom tejto štúdie bola analýza hladín kortizolu v srsti mačiek za účelom objasnenia faktorov, ktoré môžu túto hladinu ovplyvňovať. Vzorky srsti boli získané od 66 mačiek (44 samíc a 22 samcov vo veku od 2 mesiacov do 8 rokov) holením z abdominálnej oblasti (u samíc) a z oblasti okolia mieška (u samcov) v celkovej anestézii pred plánovanou kastráciou. K extrakcii kortizolu a následnej detekcii hladín bol využitý komerčne dostupný ELISA kit. Chovatelia poskytli informácie o svojich mačkách prostredníctvom dotazníka, ktorý obsahoval otázky týkajúce sa základných charakteristík mačiek, spôsobu ich života a managementu chovu. Z výsledkov našej štúdie vyplýva, že faktory ako je pohlavie, plemeno, typ srsti a farba odoberanej srsti nemali štatisticky významný vplyv ($p > 0,05$) na hladinu kortizolu v srsti. Vplyv veku bol štatisticky významný – najvyššia hladina kortizolu bola nájdená u mačiek do 6 mesiacov veku. Spôsob života mačiek (držanie výlučne v domácnosti, držanie výlučne vo vonkajšom prostredí a kombinácia oboch spôsobov chovu) nemal z pohľadu štatistickej analýzy vplyv na hladinu kortizolu v srsti ($p > 0,05$). Rovnako prítomnosť iných zvierat a detí v domácnosti neovplyvnilo hladinu kortizolu, hoci priemerné hodnoty a mediány skupín zvierat, ktoré zdieľali domácnosť s inými zvieratami resp. deťmi boli vyššie. Medzi mačkami, ktoré vykazovali niektorú z foriem problémového správania uvedenú v dotazníku a mačkami, ktoré takýto typ správania nevykazovali, nebol v hladine kortizolu v srsti zaznamenaný štatisticky významný rozdiel ($p = 0,4298$), hoci priemerná hodnota a medián kortizolu u mačiek s problémovým správaním bola vyššia. Počet poskytovaných zdrojov v domácnosti (mačacích toaliet, úkrytov a škrabadiel) a miera ochoty kontaktu s človekom nevýznamne korelovala s detegovanou hladinou kortizolu. Výsledky tejto štúdie naznačujú potrebu ďalšieho skúmania neznámych faktorov súvisiacich s telesnými atribútmi a životným štýlom mačiek s ohľadom na ich individuálne charakteristiky a reakcie na stres.

Úvod

Detekcia hladiny kortizolu je najmä u cicavcov tradične využívaným biologickým ukazovateľom prebiehajúcej reakcie na stres a teda aktivácie osy hypotalamus-hypofýza-nadobličky. Vzhľadom k tomu, že sa dnešný prístup k detekcii stresu u zvierat sústreďuje na neinvazívne prístupy, sú matrice odoberané bez nutného zásahu do organizmu preferovanou voľbou. Srst, ktorú možno medzi dané

matrice zaradiť poskytuje retrospektívny náhľad na zvýšenie hladiny kortizolu v organizme v priebehu dlhšieho časového obdobia, pričom jeho hladina nie je ovplyvnená cirkadiánnymi rytmiami a krátkodobými výkyvmi v organizme. Chronický stres významne vplýva na mieru pohody zvierat, preto si zasluhuje o zvýšenú pozornosť. U mačiek dochádza dôsledkom chronického stresu k narušeniu prirodzených imunitných bariér (Fan et al., 2023) a k celkovému oslabeniu copingových stratégií.

Je známe, že výskyt kortizolu v srsti je pravdepodobným dôsledkom troch modelov inkorporácie, ktoré zahŕňajú 1.) pasívnu difúziu kortizolu z krvných kapilár okolo folikulu, čo sa deje v priebehu keratinizácie, v období rastu chlpu (Russell et al., 2012), 2.) difúziu z potu/mazu v priebehu tvorby vlasového stvolu (Henderson et al., 1993) a 3.) extraadrenálnu stereoidogenizáciu vlasového folikulu melanocytmi v koži a vo vlasovom folikule (Ito et al., 2005). Kortizol môže byť na srst prenesený i vonkajšou cestou, napr. prostredníctvom olizovania srsti (kortizol je obsiahnutý v slinách zvierata). Je však otáznosť či sa externý kortizol do srsti i skutočne inkorporuje (El Mlili et al., 2021).

Hlavnou výhodou využitia srsti je jednoduchý odber vzoriek (Heimbürge et al., 2019) a ich skladovanie. Vzhľadom k vysokej stabilite je srst možné skladovať pri izbovej teplote po dobu mesiacov až rokov bez zmeny v hladine kortizolu (Nejad et al., 2022). Srst sa zvyčajne odoberá holením vybranej oblasti za použitia metódy „shave-reshave“ teda oholením miesta na začiatku sledovaného obdobia a opätovne po obnovení pokrývky srsti (Meyer a Novak, 2012).

Hladina kortizolu v srsti mačiek môže byť pravdepodobne ovplyvnená niekoľkými faktormi, štúdie naznačujú vplyv farby srsti (Bowland et al. 2020), pohlavia zvierata (van der Laan et al., 2022), veku (Heimbürge et al., 2019), miesta odberu (Contreras et al., 2021), ročného obdobia (Sundman et al., 2019), zdravotného stavu (Bowland et al., 2020) a spôsobu chovu (Wojtaś, J., 2023). Vzhľadom na to, že problematika detekcie hladín kortizolu v srsti mačiek s ohľadom na potenciálne ovplyvňujúce faktory bola študovaná prostredníctvom relatívne malého počtu štúdií a komplexnejšia analýza chýba, bolo v našom záujme túto problematiku bližšie preskúmať. Cieľom tejto štúdie bola analýza hladín kortizolu u mačiek chovaných v záujmovom chove s dôrazom na ich fyzické a behaviorálne atribúty a tiež na spôsob a podmienky chovu.

Materiál a metodika

Za účelom získania vzoriek srsti boli oslovené súkromné veterinárne pracoviská zamerané na poskytovanie veterinárnej starostlivosti malým zvieratám. Vzorky srsti boli odoberané pomocou holiaceho strojčeka veterinárnym technikom po uvedení zvierat do celkovej anestézie v rámci prípravy operačného poľa pred kastráciou. U samíc boli vzorky získavané z abdominálnej oblasti v okolí *linia alba*, u samcov sa jednalo o oblasť v okolí mieška. Množstvo srsti získanej od jednotlivých zvierat zodpovedalo cca 5 x 5 cm u samíc a 2 x 2 cm u samcov. Vzorka srsti bola získaná od celkom 66 zvierat. Majitelia mačiek boli so zámerom použitia vzoriek pre vedecké účely oboznámený ústnou aj písomnou formou a svoj súhlas s použitím vzoriek (a tiež informácií týkajúcich sa ich mačiek) vyjadrili vyplnením krátkeho dotazníka. Ten obsahoval otázky týkajúce sa základných charakteristík mačky, otázky týkajúce sa chovu mačky, spôsobu života a správania (viď. príloha č. 1). Otázky obsiahnuté v dotazníku boli vybrané na základe poznatkov z predchádzajúcich štúdií týkajúcich sa dobrých životných podmienok mačiek a vzťahu medzi mačkou a človekom (Wojtaś, 2023; Rothlin-Zachrisson et al., 2024).

Bezprostredne po získaní boli vzorky srsti uložené do čistých uzatvárateľných ZIP vrecúšok, označené pre potreby spracovania číslami, popřípade ďalšími potrebnými údajmi, a spoločne s vyplnenými

dotazníkmi, transportované na Ústav ochrany a welfare zvierat a verejného veterinárneho lékařství, kde boli až do analýzy skladované bez prístupu slnečného žiarenia pri izbovej teplote.

Extrakcia kortizolu zo srsti a jeho následná detekcia prebiehala podľa pokynov výrobcu komerčne dostupného kitu Cortisol Express ELISA (Cayman Chemical, USA) s rozsahom 39,1-5000 pg/ml. V rámci extrakčnej fázy bolo navážených 40 mg srsti (± 5 mg), ku ktorým bolo pridaných 1,5 ml hexanu; zmes bola následne inkubovaná 2 minúty. Po uplynutí zmieneneho času bol hexan odstránený a jeho zvyškové množstvo vyparované pod prúdom dusíka až do úplného vysušenia vzoriek. Suché vzorky boli následne zmrazené v mrazničke pri teplote -20 °C po dobu dvadsiatich minút a podrvené v homogenizéry (Tissue Lyser II, Qiagen, Holandsko), aplikovaný bol protokol 10 cyklov trvajúcich 2 min. pri 30 rpm,. Výsledkom drvenia boli fragmenty srsti o veľkosti prachu, ku ktorým bolo pridaných 1,8 ml metanolu. Táto zmes bola vortexovaná a ponechaná k inkubácii v shakeri (Thermo-Shaker PST-100HL, Biostan, Lotyšsko) po dobu 15 hodín pri teplote 25 °C a 1030 rpm. Po uplynutí času bola zmes prefiltrovaná pomocou filtra (Syringe filters PTFE 25 mm, 0,22 μ m, Labicom s.r.o., ČR) za účelom oddelenia metanolu od pevných fragmentov srsti. Metanol bol po tomto kroku odparovaný pod prúdom dusíka pri teplote 37 °C. K produktu získanému odparovaním bolo pridaných 400 μ l ELISA pufru. Takto pripravené vzorky boli následne v triplikáte aplikované na mikrotitračnú doštičku spoločne s ďalšími reagensiami podľa pokynov výrobcu vyššie zmieneneho kitu a podrobené ELISA analýze. Absorbancia bola meraná v readri (Varioscan flash, Thermo Fisher Scientific, Fínsko) pri vlnovej dĺžke 405 nm.

Pre štatistickú analýzu dát bol využitý software Unistat 6.5 (Unistat Ltd., UK). Normalita dát bola overovaná Kolmogorov-Smirnovým testom. V prípade zistenia nepravidelnej distribúcie dát bol pre porovnanie dvoch kategoriálnych premenných v rámci jedného faktora využitý Mann-Whitneyov U test. Kruskal Wallis ANOVA bola využitá v prípade troch a viacerých kategoriálnych premenných v rámci faktora, neparametrický Tukey - typ test bol ako post hoc test využitý pre porovnanie dvojíc porovnávaných skupín. V rámci korelačnej analýzy bol využitý Spearmanov korelačný koeficient. Za štatisticky významnú bola považovaná hodnota $p \leq 0,05$.

Výsledky

1. Charakteristika sledovanej populácie mačiek

Vzorky srsti boli získané od 66 mačiek (44 samíc a 22 samcov) vo veku od 2 mesiacov do 8 rokov, ktoré podstúpili kastráciu v celkovej anestézii. Väčšina mačiek bolo domácich ($n=57$), 9 mačiek vykazovalo znaky plemena (jednalo sa o 4 mainské mývalie mačky, 3 britské krátkosrsté mačky, jednu ruskú modrú mačku a jednu exotickú mačku). 41 vzoriek srsti bolo od mačiek získaných v zimných a jesenných mesiacoch (september až február), 25 vzoriek v jarných a letných mesiacoch (marec až august).

59 mačiek bolo v čase odberu vzorky zdravých a neužívalo žiadny typ preparátu s liečivým či podporným efektom, ktorý by mohol mať vplyv na koncentráciu kortizolu v srsti. U 8 zvierat uviedli majitelia zdravotné problémy v čase odberu vzorky (1x cysta na vaječníku, 1x hluchota, 1x dermatofytóza, 1x otitída, 1x FeLV a 2x problémy bez bližšie určenej špecifikácie), resp. 3 mesiace pred odberom vzorky (prítomnosť kryštálov v moči). Štyri mačky užívali v čase odberu vzorky srsti preparát s liečivým resp. podporným efektom (1 x ofloxacinové kvapky, 1x ATB bez bližšej špecifikácie, vitamínové doplnky bez bližšej špecifikácie a prípravok VetoMune na podporu imunity).

Väčšina mačiek (n=53) zaradených do experimentu bola kŕmená kombináciou granulovanej a mokrej potraviny (konzervami, kapsičkami resp. surovým mäsom). Iný typ krmiva uviedli chovatelia u 14 mačiek (v dvoch prípadoch boli mačky kŕmené výlučne granulami, v jednom prípade výlučne mokrou potravou – kapsičkami a konzervami, v 4 prípadoch granulami a ďalšími prísadami – surovým kuracím mäsom, ľudskou potravou a zbytkami od stolu, jogurtom a sušenými šprotmi, v jednom prípade vegánskymi granulami a mäsovými konzervami). Takmer polovica chovateľov uviedla, že mačku získala od známych (28; 42,42 %), druhý najčastejší spôsob získania mačky bolo jej nájdenie a ponechanie si (18; 27,27 %). Sedem mačiek (10,60 %) získali chovatelia z chovateľskej stanice, 5 mačiek (7,57 %) sa narodilo chovateľom doma a 3 mačky (4,54 %) pochádzali z útulku. U 5 mačiek (7,57 %) chovatelia nevedeli pôvod mačky uviesť.

Dĺžka držania zvierat chovateľmi bola do 3 mesiacov u 9 mačiek (13,63 %), od 3-6 mesiacov u 33 mačiek (50 %) a od 6 mesiacov do 1 roka u 20 mačiek (30,30 %). Štyri mačky (6,06 %) boli v držaní chovateľov v rozmedzí od 1 do 8 rokov.

2. Vplyv fyzických atribútov (pohlavie, vek, plemeno, typ srsti, farba srsti, zdravotný stav) a ročného obdobia odberu vzorky na hladinu kortizolu v srsti mačiek

Celková priemerná hodnota kortizolu detegovaná v srsti 66 mačiek zaradených do štúdie bola 9,83 pg/mg (medián 5,23 pg/mg; min. 2,3732 pg/mg, max. 170,46 pg/mg). Hladiny kortizolu detegované v srsti mačiek s ohľadom na fyzické atribúty mačiek sú uvedené v tabuľke č. 1. Z pohľadu štatistickej analýzy nemali faktory ako pohlavie, plemeno, typ srsti a farba odoberanej srsti vplyv na hladinu kortizolu ($p > 0,05$). Hoci priemerná hladina kortizolu v srsti, ktorá bola odoberaná v jesenných a zimných mesiacoch bola vyššia v porovnaní s hladinou kortizolu detegovanou v srsti získanej v jarných a letných mesiacoch, rozdiel nebol štatisticky významný ($p > 0,05$). V prípade veku bol vplyv na hladinu kortizolu v srsti mačiek zaznamenaný; najvyššia hladina kortizolu bola zistená u mačiek do 6 mesiacov. Štatisticky významný rozdiel v hladine kortizolu v srsti bol zistený medzi mačkami do 6 mesiacov veku a mačkami vo veku nad 6 mesiacov do jedného roka ($p = 0,0051$). Medzi mačkami do 6 mesiacov a mačkami od 1 do 8 rokov nebol zistený štatisticky významný rozdiel ($p = 0,5595$), rozdiel nebol zaznamenaný ani v prípade porovnania skupiny mačiek vo veku nad 6 mesiacov do jedného roka a dospelých mačiek od jedného do ôsmich rokov ($p = 0,0679$). Priemerná hladina kortizolu v srsti mačiek, ktoré vykazovali zdravotné problémy bola 33,20 pg/mg (min. 3,94 pg/mg; max. 170,46 pg/mg), priemerná hodnota kortizolu u zdravých mačiek bola na úrovni 6,63 pg/mg (min. 2,37 pg/mg; max. 20,86 pg/mg). Zdravotný stav nemal významný vplyv na hladinu kortizolu v srsti mačiek ($p = 0,4902$).

Tabuľka č. 1. Hladina kortizolu v srsti s ohľadom na základné fyzické atribúty mačiek (pohlavie, vek, plemeno, typ srsti, farba odoberanej vzorky srsti) a ročné obdobie odberu vzorky srsti

Faktor	N (%)	Priemer (pg/mg)	Medián (pg/mg)	P - hodnota
pohlavie				
- samce	44 (66,7)	8,02	7,40	0,1343*
- samice	22 (33,3)	10,92	5,09	

vek				
- 0-6 mesiacov (vrátane)	14 (21,2)	22,58	7,93	0,0116**
- nad 6 mes. až 1 rok (vrátane)	42 (63,6)	4,30	4,06	
- 1 až 8 rokov	10 (15,2)	8,83	7,40	
plemeno				
- domáca mačka	57 (86,4)	9,58	5,22	0,9033*
- iné	9 (13,6)	11,43	6,10	
typ srsti				
- dlhá a polodlhá sršť	12 (18,2)	10,20	6,68	0,8289*
- krátka sršť	54 (81,8)	5,15	4,60	
farba vzorky srsti				
- svetlá (biela, ryšavá, krémová resp. kombinácia farieb)	18 (27,3)	8,38	5,15	0,6050**
- tmavá (čierna, hnedá, kombinácia farieb)	23 (34,8)	14,96	6,48	
- mix (kombinácia tmavej a svetlej srsti)	25 (37,9)	6,16	5,03	
ročné obdobie				
- zima a jeseň	41 (62,1)	12,87	5,24	0,8273*
- jar a leto	25 (37,9)	8,52	5,22	

Vysvetlivky: *Mann Whitney U test; ** Kruskal Wallis ANOVA

3. Vplyv spôsobu života mačiek na hladinu kortizolu v srsti

Bolo zistené, že spôsob života mačiek (držanie výlučne v domácnosti, držanie výlučne vo vonkajšom prostredí a kombinácia oboch spôsobov) nemal z pohľadu štatistickej analýzy významný vplyv na hladinu kortizolu v srsti ($p > 0,05$). Rovnako prítomnosť iných zvierat a detí v domácnosti štatisticky významne neovplyvnilo hladinu kortizolu v srsti, hoci priemerné hodnoty a mediány skupiny zvierat, ktoré zdieľali domácnosť s inými zvieratami resp. deťmi boli vyššie (Tabuľka č. 2). Rovnako nebola korelačnou analýzou potvrdená významná závislosť medzi počtom zvierat, ktoré zdieľali s mačkami domácnosť a hladinou kortizolu ($r_s = 0,1853$; $p = 0,1527$). Významná korelácia nebola nájdená ani v prípade kortizolu a počtu detí, ktoré s mačkami žijúcimi indoor zdieľali domácnosť ($r_s = 0,0675$; $p = 0,7329$). V prípade, že boli do analýzy zahrnuté iba indoor mačky a medzi zvieratá, ktoré zdieľali so sledovanými jedincami domácnosť, zaradené iba iné mačky, bol výsledok korelácie obdobne štatisticky nevýznamný ($r_s = 0,0542$; $p = 0,7840$). Významnosť korelácie medzi hladinou kortizolu v srsti mačiek a dĺžkou vlastníctva taktiež nebola zaznamenaná ($r_s = -0,1488$; $p = 0,2332$).

Kŕmenie mačiek (porovnanie 2 spôsobov kŕmenia - kombinácia granulovanej a mokrej potravy a iný typ potravy) nemalo vplyv na hladinu kortizolu detegovanú v srsti mačiek ($p=0,86502$).

Tabuľka č. 2. Hladina kortizolu v srsti s ohľadom na spôsob života mačiek

Faktor	N (%)	Priemer (pg/mg)	Medián (pg/mg)	P - hodnota
Spôsob života				
- indoor	28 (45,9)	7,08	5,76	0,2362**
- outdoor	11 (18)	7,63	7,42	
- kombinácia indoor a outdoor	22 (36,1)	15,54	5,12	
Prítomnosť ďalších zvierat v domácnosti				
- áno	46 (75,4)	11,58	5,98	0,1154*
- nie	15 (24,6)	6,10	4,80	
Prítomnosť ďalších zvierat v domácnosti (iba u indoor mačiek)				
- áno	18 (64,3)	7,39	6,72	0,4720*
- nie	10 (35,7)	6,53	5,01	
Prítomnosť detí v domácnosti				
- áno	25 (41,7)	6,94	13,71	0,6260*
- nie	35 (58,3)	4,94	5,03	
Prítomnosť detí v domácnosti (iba u indoor mačiek)				
- áno	17 (34)	6,90	4,92	0,7509*
- nie	33 (66)	4,68	4,66	

Vysvetlivky: *Mann Whitney U test; ** Kruskal Wallis ANOVA

4. Vplyv správania, počtu poskytovaných zdrojov a zmien v domácnosti na hladinu kortizolu v srsti mačiek

Medzi mierou sociability mačiek, ktorá bola chovateľmi hodnotená na 10 bodovej stupnici od stupňa 1 (extrémne nesociálna mačka – napr. extrémne plachá mačka, strániaca sa kontaktu popr. reagujúca vždy agresívne) po stupeň 10 (extrémne socializovaná mačka, prítulná až dotieravá, silno

naviazaná na človeka) a hladinou kortizolu v srsti mačiek nebola zistená významná závislosť ($r_s=0,2033$, $p=0,1131$). Medzi mačkami, ktoré podľa majiteľov vykazovali niektorú z foriem problémového správania uvedenú v dotazníku (značkovanie močom alebo močenie/defekácia mimo mačacie WC, agresívne správanie bez zjavnej príčiny, ničenie vybavenia domácnosti, schovávanie/vyhýbanie sa kontaktu, nechutenstvo) a mačkami, ktoré takýto typ správania nevykazovali, nebol v hladine kortizolu v srsti zaznamenaný štatisticky významný rozdiel ($p=0,4298$), hoci priemerná hladina kortizolu a medián u mačiek s problémovým správaním bol vyšší (priemer 7,03 pg/mg, medián 5,42 pg/mg verzus priemer 4,71 pg/mg, medián 4,55 pg/mg).

Počet poskytovaných zdrojov mačkám v domácnosti nekoreloval s detegovanou hladinou kortizolu v srsti. Prítomnosť štatisticky významnej závislosti nebola zistená v prípade korelačnej analýzy počtu úkrytov, ktoré chovatelia poskytujú mačkám v domácnosti a kortizolom v srsti ($r_s=-0,0046$; $p=0,9756$). Obdobný záver ($r_s=0,0435$; $p=0,7924$) bol zistený aj v prípade, že boli do analýzy zahrnuté len mačky žijúce výlučne vo vnútornom prostredí a mačky žijúce outdoor s prístupom do vnútorného prostredia. Závislosť nebola zistená ani v prípade korelácie počtu mačacích WC poskytovaných mačkám v domácnosti a hladiny kortizolu ($r_s=-0,0628$; $p=0,6548$), obdobný výsledok bol zistený pri zahrnutí iba mačiek žijúcich indoor resp. kombinovane ($r_s=0,1745$, $p=0,2516$). Počet škrabadiel poskytovaných mačkám žijúcich indoor resp. kombinovane nekoreloval s hladinou kortizolu v srsti ($r_s=0,1536$, $p=0,3195$).

Hladina kortizolu v srsti u mačiek, u ktorých v domácnosti neprebehla za posledných 3 mesiacov žiadna zmena, sa nelíšila významne ($p=0,0913$) od hladiny kortizolu v srsti u mačiek, u ktorých jedna zo zmien definovaných v dotazníku nastala (sťahovanie, prerábanie domácnosti resp. vonkajších priestorov, prírastok v rodine v podobe dieťaťa, nové zviera v rodine). Priemerná hodnota a medián hladiny kortizolu v srsti mačiek, v ktorých domácnosti prebehal zmena však bola vyššia, ako u mačiek v domácnosti bez zmien (priemer 10,15 pg/mg, medián 5,16 pg/mg verzus priemer 10,47 pg/mg, medián 7,37 pg/mg).

Diskusia

Srst' je v štúdiu dobrých životných podmienok mačiek dobre využiteľnou maticou k detekcii hladiny kortizolu a monitoringu chronického stresu. Cieľom tejto štúdie bolo analyzovať hladiny kortizolu v závislosti od fyzických, behaviorálnych a ďalších vybraných atribútov týkajúcich sa spôsobu života mačiek v záujmovom chove. K analýze bolo použitých spolu 66 vzoriek srsti pochádzajúcich od 66 mačiek, ktoré boli získané z abdominálnej oblasti (u samíc) a z okolia mieška (u samcov) holením pred kastráciou.

Priemerná hladina kortizolu zistená v rámci tejto štúdie bola 9,83 pg/mg (medián 5,23 pg/mg). K podobným záverom sa dopracovali Rothlin-Zachrisson et al. (2024), ktorý vo svojej štúdií zaznamenali medián hladiny kortizolu v srsti odobratej z abdomenu na úrovni 4,8 pg/mg. Vyššia hladina kortizolu bola zistená v prípade jej odberu z prednej končatiny (5,6 pg/mg) a vyčesávaním na chrbte, bočnej strane hrudníka a brucha (medián 7,2 pg/mg). Miesto odberu vzorky pravdepodobne môže zohrávať úlohu v zistenej hladine kortizolu v srsti. V štúdií od Contreras et al. (2021) bola zo sledovaných oblastí (dorzálna a ventrálna strana krku, lumbosakrálna oblasť, abdomen) u mačiek zistená najvyššia hladina na ventrálnej strane krku (medián 17,7 pg/mg; min. 3 pg/mg, max. 224,1 pg/mg) a najnižšia hladina v oblasti abdomenu (medián 5,5 pg/mg; min. 2,7 pg/mg, max. 10,8 pg/mg). Jedným z možných vysvetlení rozdielov v hladine je rôzny podiel vlasových folikulov v anagénnej, katagénnej a telogénnej fáze rastu a rytmus vypadávania srsti. Kortizol je do srsti zabudovaný najmä v priebehu anagénnej rastovej fázy. Vyššia hladina kortizolu by sa teda mala vyskytovať na

miestach tela s vyšším podielom folikulov v tejto fáze (Burnard et al., 2017). Potenciálnymi príčinami rozdielov v hladinách môžu byť aj ďalšie faktory, napr. kontaminácia trusom, rozdielna expozícia danej časti tela klimatickým podmienkam, starostlivosť o srst', rozdielna rýchlosť rastu a prekrvenia kože (Moya et al., 2013; Burnett et al., 2014; Carlitz et al., 2015; Casal et al., 2017; Acker et al., 2018).

Výsledky našej štúdie dokumentujú absenciu vplyvu pohlavia, plemena, typu srsti a farby odobratej srsti na hladinu kortizolu v srsti mačiek. Absencia vplyvu pohlavia na hladinu kortizolu v srsti bola rovnako dokumentovaná v štúdiách od Wojtaś (2023), Contreras et al. (2021), Galuppi et al. (2013) a Franchini et al. (2019). V štúdiu od Wojtaś et al. (2024), bol ale rozdiel medzi pohlaviami mačiek pochádzajúcich z útulku zaznamenaný. V období pred umiestnením mačiek do útulku bola vyššia hladina kortizolu v srsti zistená u samíc, po 4-5 týždňoch strávených v útulku bola vyššia hladina dokumentovaná u kocúra. Možné vysvetlenie pre tento jav však nebolo autormi štúdie komentované. K záveru, že samice, ktoré rodili resp. boli vo fáze po ruji, mali v srsti predných končatín vyššiu hladinu kortizolu oproti kastrovaným samiciam sa dopracovali Rothlin-Zachrisson et al. (2024). Zmienení autori tiež dokumentovali vyššiu hladinu kortizolu v srsti u samcov v prípade odberu srsti vyčesávaním oproti kastrovaným samiciam. Medzi navrhované príčiny vplyvu pohlavia na hladinu kortizolu v srsti uviedli autori vplyv sociálneho postavenia mačky, teritoriálne správanie, rozdiely v telesnej kondícii a vplyv pohlavných hormónov. Autori štúdie tiež v diskusii uviedli, že počas gravidity je kortizol rozhodujúcim faktorom pre vývoj plodu, čo vedie k jeho zvýšenej koncentrácii až do pôrodu (Braun et al., 2017). Graviditu a pôrod sprevádzajú hormonálne zmeny a sú tiež spojené s vyšším energetickým výdajom (Alekseva et al., 2020). U samíc hľadavcov a u žien sa naviac zistilo, že odpoveď HPA osi je vďaka estradiolu významnejšia (Oyola a Handa, 2017), čo by mohlo aj u samíc mačiek vysvetľovať zvýšené hladiny kortizolu v srsti. Každopádne je pre získanie presnejších záverov ideálne získať vzorky od väčšieho počtu mačiek.

Hoci vplyv farby na hladinu kortizolu bol popísaný u psov (Bennett a Hayssen, 2010; Bowland et al., 2020), v štúdiu od Contreras et al. (2021) nemala farba srsti mačiek vplyv na detegovanú hladinu. Proteín určujúci farbu srsti využíva melanokortínovú dráhu, ktorá reguluje produkciu kortizolu (Ghassemi Nejad a Lee, 2022). Základné mechanizmy zabudovania kortizolu do srsti rôznych farieb však nie sú stále jasné a vyžadujú ďalšie skúmanie (Nejad et al., 2022). Úlohu v hladine kortizolu v srsti môže hrať aj ročné obdobie, v ktorom je zvieratám odoberaná. Štúdie zamerané na psov zmieňujú vyššie hladiny kortizolu v srsti v zimnom období (Roth et al., 2016; Sundman et al., 2019). V našej štúdiu nebol rozdiel v hladine kortizolu v srsti mačiek odoberanej v jarných a letných mesiacoch a jesenných a zimných mesiacoch štatisticky významný, tendencia vyššej hladiny však bola zistená podobne ako u psov, vo vzorkách odoberaných na jeseň a v zime.

V rámci analýzy vplyvu veku na hladinu kortizolu u mačiek sme dospeli k záveru, že najvyššia hladina bola zaznamenaná u najmladšej vekovej kategórie mačiek (mačky do 6 mesiacov veku). Vek nemal vplyv na hladinu kortizolu v štúdiu od Galuppi et al. (2013). Heimbürge et al. (2019), ktorí sa venovali štúdiu hladiny kortizolu u kráv zistili vyššiu hladinu kortizolu u teliat oproti 6mesačným, 18mesačným a dospelým kravám. Vyššia hladina kortizolu u mláďat môže byť pravdepodobne spôsobená nižšími hladinami globulínu viažuceho kortikosteroidy, čo má za následok zvýšenie plazmatickej hladiny voľného kortizolu v krvnom riečisku. Ten sa následne vo zvýšenej miere zabudováva do srsti (Heimbürge et al., 2019).

Prítomnosť chronického ochorenia bola v štúdiu od Rothlin-Zachrisson et al. (2024) spojená s vyššou hladinou kortizolu v srsti. Vyššie hladiny kortizolu pravdepodobne súvisia s procesmi prebiehajúcimi v organizme počas ochorenia (De Lange et al., 2004) a udalosťami, ktoré sa s týmto stavom spájajú, napr. návštevy veterinárneho pracoviska, transport (Quimby et al., 2017) a podávanie liekov. Hoci boli i v našej štúdiu dokumentované vyššie hladiny kortizolu u mačiek so zdravotnými problémami (aj

keď rozdiel v hladine kortizolu medzi skupinou zdravých a chorých mačiek nebol štatisticky významný), bol počet mačiek so zdravotnými problémami príliš nízky k získaniu relevantných záverov. Navyiac, zdravotné problémy u väčšiny mačiek boli minoritné a pravdepodobne nemohli hladinu kortizolu v srsti významne ovplyvniť.

U mačiek, ktorým bol umožnený prístup do vonkajšieho prostredia resp. u mačiek žijúcich výlučne vonku, nebola v našej štúdii podobne ako v štúdii od Contreras et al. (2021) zaznamenaná nižšia hladina kortizolu v srsti oproti mačkám žijúcim výlučne vo vnútri. Výsledok je konzistentný i so štúdiou od Wojtaś (2023), ktorá sa venovala analýze hladiny kortizolu v srsti získanej z lumbosakrálnej oblasti u 55 mačiek žijúcich v záujmovom chove. Hoci hladina kortizolu v srsti mačiek bez prístupu a s prístupom do vonkajšieho prostredia sa v štúdii od Wojtaś (2023) líšila nevýznamne, tendencia k nižším hladinám kortizolu bola zistená u mačiek, ktorým bol prístup do vonkajšieho prostredia umožnený. Tento jav môže súvisieť s problémami s prispôsobením sa životu výlučne v prostredí domácnosti - mačky neboli ako druh selektívne chované, aby vykazovali charakteristiky vlastné spoločenským zvieratám a aby žili v uzatvorenom priestore a v tesnej blízkosti ľudí (Jongman, 2007). V prostredí domácnosti často chýbajú prvky, ktoré zvieratám umožnia prejavovať prirodzené správanie. Nesprávny management prostredia a nedostatočný počet a kvalita zdrojov potrebných pre zachovanie dobrých životných podmienok mačiek môže prispievať k rozvoju chronického stresu, ktorý sa môže odraziť na hladine kortizolu v organizme. Z tohto dôvodu sme sa v našej štúdii zamerali i na analýzu zdrojov, ktoré chovatelia poskytujú svojim mačkám v domácnosti – z našich výsledkov vyplýva, že počet kľúčových zdrojov (počet úkrytov, mačacích toaliet a škrabadiel) významne nekoreloval s hladinou kortizolu v srsti.

Hoci v našej štúdii neboli nájdené štatisticky významné rozdiely v hladine kortizolu v srsti mačiek, ktoré podľa chovateľov vykazovali problémové správanie a v srsti mačiek bez problémového správania, tendencia k vyšším hladinám bola dokumentovaná u mačiek s problémovým správaním. Tento záver je v súlade so zisteniami Wojtaś (2023), ktorá vo svojej štúdii konštatuje vyššie hladiny kortizolu v srsti u jedincov, ktorí eliminovali mimo mačaciu toaletu a jedincov prejavujúcich sa agresívne voči členom domácnosti.

Podobne ako v našej štúdii ani v štúdii od Wojtaś (2023) a Contreras et al. (2021) nesúvisela hladina kortizolu v srsti s počtom mačiek žijúcich v jednej domácnosti. K opačnému výsledku sa ale dopracovali Rothlin-Zachrisson et al. (2024); autori konštatujú, že u mačiek žijúcich v multi-cat domácnostiach bola zistená vyššia hladina kortizolu v srsti. Hoci sme v našej štúdii nezaznamenali štatisticky významne vyššiu hladinu kortizolu u mačiek žijúcich v multi-cat domácnosti, tendencia k nižším hladinám kortizolu bola nájdená u mačiek, ktoré nezdieľali domácnosť s inými zvieratami a deťmi. Bolo zdokumentované, že mačky, ktoré sú vystavené nepredvídateľnému správaniu detí a hluku môžu pociťovať zvýšený stres, ktorý sa môže manifestovať vo fyzickej rovine ako odmietanie potravy, zvracanie a hnačka (Stella et al., 2013). Autori štúdie od Hart et al. (2013) konštatujú, že vzťah mačka-dieťa je vnímaný ako problematickejší v porovnaní so vzťahom mačka- dospelá osoba. Je známe, že vzťah jednej mačky s dieťaťom bol menej priateľský v porovnaní so vzťahom, kedy bolo v domácnosti s deťmi viacero mačiek. V prípade, že je mačka jediným zvieratkom v domácnosti, je jej zvyčajne prirodzene venovaná väčšia pozornosť; mačky môžu mať problém vyhnúť sa zvýšenej pozornosti detí, čo im v konečnom dôsledku môže spôsobovať stres (Foreman-Worsley a Farnworth, 2019).

V našej štúdii tiež nebola potvrdená súvislosť medzi mierou ochoty mačky interagovať s chovateľom a hladinou kortizolu. Väčšina chovateľov u svojich mačiek uviedla vysokú ochotu k interakcii (priemerná známka ochoty interakcie u všetkých mačiek bola 8,4, min. 4,5, max. 10), hoci úroveň sociability mačiek voči iným zvieratám a ľuďom sa môže naprieč jedincami významne líšiť a odvíja sa

od faktorov ako je temperament, vplyv prostredia a ranné skúsenosti v senzitívnej perióde života. Hoci vymenované faktory významne formujú reakciu mačiek k iným členom domácnosti, dôležitejšiu úlohu v úrovni stresu ako samotný počet mačiek, môžu podľa Ramos et al. (2013) hrať environmentálne faktory (napr. dostupnosť zdrojov), ako už bolo načrtnuté vyššie. V multi-cat domácnostiach dochádza k zdieľaniu zdrojov medzi jedincami, čo môže vyústiť v agresivitu a viesť k ďalším typom správania, ktoré súvisia so stresom (Elzerman et al. 2020).

Záver

Chronický stres môže mať významný dopad na celkovú úroveň životných podmienok mačiek v záujmovom chove. Vzhľadom na to, že množstvo chovateľov nie je schopných objektívne zhodnotiť kvalitu života svojich zvierat z rôznych dôvodov (chovatelia majú napr. nedostatok poznatkov o potrebách a etológii mačiek, zvieratá antropomorfizujú, majú nerealistické očakávania alebo nemajú k mačkám vyvinutú silnú citovú väzbu, ktorá by ich motivovala sa o zvieratá bližšie zaujímať), je možnosť kvantifikácie kortizolu v srsti sľubným a ľahko využiteľným nástrojom pre objektívne zhodnotenie životných podmienok. Výsledky tejto štúdie je potrebné interpretovať s ohľadom na limitujúce faktory (relatívne nízky počet vzoriek, subjektivita hodnotenia vlastných zvierat chovateľmi v dotazníku, nevyrovnanosť počtu mačiek v rámci niektorých vytvorených skupín z dôvodu daných atribútov mačiek podstupujúcich kastráciu, mierne odlišnosti v holenej oblasti srsti u mačiek a kocúrov). Niektoré faktory ovplyvňujúce hladinu kortizolu v srsti zostávajú stále neznáme; ďalšie štúdie by sa mohli sústrediť na analýzu hladín kortizolu v srsti s ohľadom na individuálne charakteristiky temperamentu jedincov, s ktorými pravdepodobne súvisí i široká variabilitu reakcií na stres.

Táto práca bola financovaná ITA VETUNI - grantom č. 2024ITA26.

Literatúra

- Acker, M., Mastro Monaco, G., Schulte-Hostedde, A.I. 2018. The effects of body region, season and external arsenic application on hair cortisol concentration. *Conservation Physiology* 6: p.coy037.
- Alekseeva, G.S., Loshchagina, J.A., Erofeeva, M.N., Naidenko, S.V. 2020. Stressed by maternity: Changes of cortisol level in lactating domestic cats. *Animals* 10: 903.
- Bennett, A., Hayssen, V. 2010. Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. *Domestic Animal Endocrinology* 39: 171-180.
- Bowland, G.B., Bernstein, R.M., Koster, J., Fiorello, C., Brenn-White, M., Liu, J., Schwartz, L., Campbell, A., von Stade, D., Beagley, J., Pomerantz, J. 2020. Fur color and nutritional status predict hair cortisol concentrations of dogs in Nicaragua. *Frontiers in Veterinary Science* 7: 702.
- Braun, U., Clavadetscher, G., Baumgartner, M.R., Riond, B., Binz, T.M. 2017. Hair cortisol concentration and adrenal gland weight in healthy and ill cows. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 159: 493-495.
- Burnard, C., Ralph, C., Hynd, P., Edwards, J.H., Tilbrook, A. 2016. Hair cortisol and its potential value as a physiological measure of stress response in human and non-human animals. *Animal Production Science* 57: 401-414.

- Burnett, T.A., Madureira, A.M., Silper, B.F., Nadalin, A., Tahmasbi, A., Veira, D.M., Cerri, R.L. 2014. Factors affecting hair cortisol concentrations in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 97: 7685-7690.
- Carlitz, E.H., Kirschbaum, C., Miller, R., Rukundo, J., van Schaik, C.P. 2015. Effects of body region and time on hair cortisol concentrations in chimpanzees (*Pan troglodytes*). *General and Comparative Endocrinology* 223: 9-15.
- Casal, N., Manteca, X., Peña, R., Bassols, A., Fàbrega, E. 2017. Analysis of cortisol in hair samples as an indicator of stress in pigs. *Journal of Veterinary Behavior* 19: 1-6.
- Contreras, E.T., Vanderstichel, R., Hovenga, C., Lappin, M.R. 2021. Evaluation of hair and nail cortisol concentrations and associations with behavioral, physical, and environmental indicators of chronic stress in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 35: 2662-2672.
- de Lange, M.S., Galac, S., Trip, M.R., Kooistra, H.S. 2004. High urinary corticoid/creatinine ratios in cats with hyperthyroidism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 18: 152-155.
- Elzerman, A.L., DePorter, T.L., Beck, A., Collin, J.F. 2020. Conflict and affiliative behavior frequency between cats in multi-cat households: a survey-based study. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 22: 705-717.
- Fan, Z., Bian, Z., Huang, H., Liu, T., Ren, R., Chen, X., Zhang, X., Wang, Y., Deng, B., Zhang, L. 2023. Dietary strategies for relieving stress in pet dogs and cats. *Antioxidants* 12: 545.
- Foreman-Worsley, R., Farnworth, M.J. 2019. A systematic review of social and environmental factors and their implications for indoor cat welfare. *Applied Animal Behaviour Science* 220: 104841.
- Franchini, M., Prandi, A., Filacorda, S., Pezzin, E.N., Fanin, Y., Comin, A. 2019. Cortisol in hair: a comparison between wild and feral cats in the north-eastern Alps. *European Journal of Wildlife Research* 65: 90.
- Galuppi, R., Leveque, J.F.C., Beghelli, V., Bonoli, C., Mattioli, M., Ostanello, F., Tampieri, M.P., Accorsi, P.A. 2013. Cortisol levels in cats' hair in presence or absence of *Microsporum canis* infection. *Research in Veterinary Science* 95: 1076-1080.
- Ghassemi Nejad, J.G., Lee, H.G. 2023. Coat color affects cortisol and serotonin levels in the serum and hairs of Holstein dairy cows exposed to cold winter. *Domestic Animal Endocrinology* 82: 106768.
- Hart, L.A., Hart, B.L., Thigpen, A.P., Willits, N.H., Lyons, L.A., Hundenski, S. 2018. Compatibility of cats with children in the family. *Frontiers in Veterinary Science* 5: 278.
- Heimbürge, S., Kanitz, E., Otten, W. 2019. The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals. *General and Comparative Endocrinology* 270: 10-17.
- Henderson, G.L. 1993. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Science International* 63: 19-29.
- Ito, N., Ito, T., Kromminga, A., Bettermann, A., Takigawa, M., Kees, F., Straub, R.H., Paus, R. 2005. Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and synthesize cortisol. *The FASEB Journal* 19: 1332-1334.
- Jongman, E.C. 2007. Adaptation of domestic cats to confinement. *Journal of Veterinary Behavior* 2: 193-196.

- Meyer, J.S., Novak, M.A. 2012. Minireview: hair cortisol: a novel biomarker of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity. *Endocrinology* 153: 4120-4127.
- El Mlili, N., Ahabrach, H., Cauli, O. 2021. Hair cortisol concentration as a biomarker of sleep quality and related disorders. *Life* 11: 81.
- Moya, D., Schwartzkopf-Genswein, K.S., Veira, D.M. 2013. Standardization of a non-invasive methodology to measure cortisol in hair of beef cattle. *Livestock Science* 158: 138-144.
- Nejad, J., Ghaffari, M.H., Ataallahi, M., Jo, J.H., Lee, H.G. 2022. Stress concepts and applications in various matrices with a focus on hair cortisol and analytical methods. *Animals* 13: 3096.
- Rothlin-Zachrisson, N., Röcklinsberg, H., Jettel, E., Bergqvist, F.J., Stadig, S., Öhlund, M., Mariti, C., Holst, B.S. 2024. Hair cortisol concentrations in clipped and combed hair and associations with characteristics, health status and stress in domestic cats. *Scientific Reports* 14: 21846.
- Oyola, M.G., Handa, R.J. 2017. Hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress* 20: 476-494.
- Quimby, J.M., Smith, M.L., Lunn, K.F. 2011. Evaluation of the effects of hospital visit stress on physiologic parameters in the cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 13: 733-737.
- Ramos, D., Reche-Junior, A., Fragoso, P.L., Palme, R., Yanasse, N.K., Gouvêa, V.R., Beck, A. Mills, D.S. 2013. Are cats (*Felis catus*) from multi-cat households more stressed? Evidence from assessment of fecal glucocorticoid metabolite analysis. *Physiology & Behavior* 122: 72-75.
- Roth, L.S., Faresjö, Å., Theodorsson, E., Jensen, P. 2016. Hair cortisol varies with season and lifestyle and relates to human interactions in German shepherd dogs. *Scientific Reports* 6: 19631.
- Russell, E., Koren, G., Rieder, M., Van Uum, S. 2012. Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology* 37: 589-601.
- Stella, J., Croney, C., Buffington, T. 2013. Effects of stressors on the behavior and physiology of domestic cats. *Applied Animal Behaviour Science* 143: 157-163.
- Sundman, A.S., Van Poucke, E., Svensson Holm, A.C., Faresjö, Å., Theodorsson, E., Jensen, P., Roth, L.S. 2019. Long-term stress levels are synchronized in dogs and their owners. *Scientific Reports* 9: 1-7.
- van der Laan, J.E., Vinke, C.M., Arndt, S.S. 2022. Evaluation of hair cortisol as an indicator of long-term stress responses in dogs in an animal shelter and after subsequent adoption. *Scientific Reports* 12: 5117.
- Wojtaś, J. 2023. Hair cortisol levels in cats with and without behavioural problems. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 25: 1098612X221150624.

Cíl 5: Posouzení vlivu enrichmentu v chovech morčat na jejich behaviorální projevy

POSOUZENÍ VLIVU ENRICHMENTU NA BEHAVIORÁLNÍ PROJEVY MORČAT DOMÁCÍCH

Zdeňka Vacušková, Dominik Vacuška, Lucie Kováčová, Lucia Kotianová, Eva Voslášková, Vladimír Večerek

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

Abstrakt

Neoptimální chovné podmínky mohou negativně ovlivnit welfare zvířat a mít zásadní dopad na jejich chování. Cílem této studie bylo posoudit, zda velikost chovného prostoru a jeho vybavení v podobě přístřešků a úkrytů ovlivňuje chování morčat domácích v zájmovém chovu. Předpokládali jsme, že umístění morčat do obohaceného prostředí povede ke zvýšení jejich aktivity a exploračního chování, snížení výskytu negativních sociálních interakcí a že místa s poskytnutým obohaceným prostředím budou preferována pro odpočinek zvířat. Do studie bylo zařazeno 10 jedinců – 6 samic a 4 samci plemene US Teddy ve stáří 3-4 let. Byl zjištěn statisticky vysoce významně vyšší ($p = 0,000$) výskyt ležení u morčat v neobohacené chovné kleci. Rovněž výskyt příjmu potravy byl vysoce významně vyšší ($p = 0,000$) v neobohacené chovné kleci. V obohacené kleci došlo ke statisticky vysoce významnému navýšení stání ($p = 0,000$) a exploračního chování ($p = 0,000$). Oproti očekávání nevedlo umístění jedinců do obohaceného prostředí ke statisticky významnému snížení výskytu negativního sociálního chování ($p > 0,05$). Jedinci trávili v obohacené kleci statisticky vysoce významně více času ležením s využitím prvků obohacení prostředí než ležením bez využití prvků obohacení prostředí ($p = 0,000$).

Úvod

Existuje řada faktorů, které ovlivňují welfare morčat. Z těch nejvýznamnějších jsou to chovné podmínky včetně sociálního prostředí, stravy a zdravotní péče (Harrup and Rooney, 2020). Většina zdravotních problémů, které se u morčat vyskytují, souvisí se špatnými podmínkami chovu nebo nevhodnou výživou (Garner-Richardson, 2012). Podmínky pro chov morčat často nevyhovují specifickým behaviorálním potřebám tohoto druhu, zejména s ohledem na utváření vhodné sociální skupiny (Dawkins, 2004) a velikost životního prostoru (Rowland, 2020; Cameron et al., 2022). Například u králíků bylo zjištěno, že malé chovné prostory a nedostatek příležitostí k sociálním interakcím s jinými jedinci mohou vést k dlouhým obdobím nečinnosti, nárůstu hmotnosti a zdravotním problémům, což negativně ovlivňuje jejich životní pohodu (Rooney et al., 2014).

Jakožto neinvazivní metoda se pozorování behaviorálních projevů zvířat stalo významným nástrojem v hodnocení welfare zvířat (Dawkins, 2004). Posuzování dobrých životních podmínek zvířat spočívá v analýze přirozeného chování i výskytu abnormálního chování, jako je např. agresivita nebo stereotypní chování (Rushen et al., 2012).

Jedním z přístupů ke zlepšení prostředí ustájení je jeho obohacení (Newberry, 1995). Obohacení prostředí neboli enrichment má za cíl zvýšit výskyt rozmanitosti v prvcích přirozeného chování, snížit projevy abnormálního chování (Newberry, 1995) a zlepšit schopnost zvířete úspěšně se vyrovnat se stresem (Mellen and MacPhee, 2001). Strategie obohacování prostředí se používají ke zlepšení fyziologických funkcí i psychické pohody zvířat chovaných v zajetí (Claxton, 2011) tak, aby zvíře mělo více možností k různým aktivitám a větší kontrolu nad svým sociálním a prostorovým prostředím (Stauffacher, 1995). Konkrétně u hlodavců by měl enrichment zohledňovat jejich behaviorální potřeby, jako jsou odpočinek, stavba hnízd, možnost úkrytu, vyhledávání potravy, hlodání, péče o srst, sociální chování (Baumans, 2005; Huang et al., 2021). Dle Haemisch (1990) se u morčat zvyšují hladiny stresových hormonů po jejich umístění do neznámého a chudého prostředí. Proto by měli být umístěni v bezpečném, komplexním a podnětném prostředí, které mohou ovládat (Poole, 1998). Mezi možné obohacení prostředí lze zařadit zvětšení chovného prostoru (Funabashi et al., 2023) a poskytnutí přístřešků (Gut et al., 2018). Přístřešky napodobují nory či tunely, tedy úkryty ve volné přírodě (Rood, 1972) a poskytují příležitost k odpočinku a úkrytu před otevřeným prostorem (Olsson et al., 2003). Kromě toho mohou tyto přidané předměty motivovat zvířata k exploračnímu chování, protože poskytují aspekt novosti (Veissier et al., 2024).

Vlivu velikosti ubikace na chování morčat není věnována dostatečná pozornost. U jiných druhů zvířat bylo zjištěno, že zvířata umístěná v kleci s menší plochou vykazují snížený repertoár přirozeného chování a nárůst četností prvků chování abnormálního (Dixon et al., 2010; Harrup and Rooney, 2020). Naopak výskyt přirozeného chování úměrně roste se zvětšující se plochou, kterou mohou zvířata využít. Výsledky různých studií dokazují, že po úpravě chovného prostoru došlo ke zvýšení obecné aktivity zvířat (Kitchen and Martin, 1996; Sha et al., 2016; Sládek et al., 2022; Łapiński et al., 2023). Také komplexita výběhu nabízí možnost pro pozitivní využití prostoru. Přidání druhého patra přístupného jedincům pomocí rampy může zvýšit pohybovou aktivitu (Begum-Diamond et al., 2022).

Materiál a metodika

Zvířata a ustájení

Posouzení vlivu enrichmentu na behaviorální projevy morčat domácích proběhlo v chovatelské stanici zabývající se chovem morčat plemene US Teddy. Do studie bylo zařazeno 10 jedinců – 6 samic a 4 samci – ve věku 3-4 let. Všechna morčata byla umístěna ve stejné místnosti a chována v klecích po dvou jedincích. Morčata měla možnost akustické komunikace s ostatními jedinci, vizuální komunikace byla umožněna pouze s jedincem, se kterým byla sdílena klec. Krmivo (zelenina a granule) bylo zvířatům předkládáno do misek každý den ve večerních hodinách – po 20:00.

Chovné neobohacené klece o rozměrech 70 x 40 cm, i obohacené klece o rozměrech 110 x 70 cm, byly vybaveny pevnou podlahou a jako podestýlka byly použity hobliny. Každá klec obsahovala jednu napáječku na vodu a seník, který zajišťoval morčatům adlibitní přístup k senu. Obohacené klece byly navíc vybaveny místem k odpočinku (závěsné hamaky) a dřevěným úkrytem.

Analýza chování

Pro každého jedince zapojeného do studie bylo pořízeno celkem 6 videozáznamů, které sloužily jako podklad pro behaviorální analýzu. První 3 videozáznamy byly pořízeny během tří po sobě jdoucích dnů v chovné neobohacené kleci. Následně byli jedinci přemístěni do obohacené klece, kde jim byla poskytnuta 24hodinová adaptace na nové prostředí. Poté byly v průběhu dalších tří dnů pořízeny

zbývající 3 videozáznamy. Sledovaná zvířata byla nahrávána každý den po dobu 12 hodin, vždy v časovém rozmezí 08:00-20:00.

Etogram (tabulka č. 1) byl vytvořen na základě existujících etogramů (Gut et al., 2018; Namiki et al., 2024) a vlastních pozorování. Videozáznamy byly pořízeny pomocí videokamer Sony AX 53 (HANDYCAM® 4K se snímačem CMOS EXMOR R®) a Niceboy Vega X Pro (NICEBOY s.r.o., ČR). Následně byly záznamy analyzovány kódováním pomocí software Noldus Observer XT 17 (Noldus Information Technology, Nizozemsko) s využitím okamžikového záznamu s nastaveným intervalem 5 minut.

Statistické vyhodnocení

Statistická analýza byla provedena pomocí statistického software Unistat for Excel s využitím chí kvadrát testu v rámci metodiky kontingenčních tabulek. Hodnota $p < 0,05$ byla brána jako statisticky významná a hodnota $p < 0,01$ jako statisticky vysoce významná. Pro statistickou analýzu byly všechny prvky ve skupině aktivní lokomoční chování brány jako jeden celek. Stejně tak v rámci komfortního chování, exploračního chování a sociálního chování pozitivního i negativního.

Tabulka č. 1. Prvky chování pozorované u morčat domácích

Individuální chování	Chování spojené s metabolickými procesy	Příjem potravy	Očichávání potravy; konzumace potravy	
		Příjem vody	Pít z dostupného zdroje vody	
		Cékotrofie	Sedící zvíře skloní hlavu k anální oblasti, pak zvedne hlavu a jsou vidět žvýkací pohyby	
	Aktivní lokomoční chování	Chůze	2 nebo více končetin udělá kroky	
		Běh	Rychlý přesun z jednoho místa na druhé; všechny 4 končetiny v pohybu	
	Neaktivní lokomoční chování	Ležení	Zvíře leží na zemi při relaxaci nebo spánku; břicho na zemi nebo do boku; není viditelná mezera mezi podestýlkou a břichem	
		Stání	Zvíře klidně stojí alespoň 3 končetinami na jednom místě	
	Komfortní chování	Otřepání	Rychlý pohyb tělem nebo částí těla ze strany na stranu (např. zatřepání hlavou)	
		Protahování	Prodloužení (protáhnutí) celého těla nebo její části	
		Očista obličeje	Olíznutí předních tlapek a jejich přetáhnutí od oka nebo ucha až k nosu; použití obou předních tlapek nebo pouze jedné	
		Škrábání	Rychlé pohyby zadní končetinou; poškrábání hlavy, zad, boku	
		Okusování, olizování	Očista těla pomocí zubů nebo jazyka	
		Explorační chování	Ohryzávání předmětů	Ohryzávání předmětů v kleci, bez konzumace
			Posunování předmětů	Přemísťování předmětů v kleci pomocí nosu
	Pozorování okolí		Zvíře se aktivně rozhlíží po okolí	
Hrabání	Zvíře používá tlapy k odhrabání podestýlky			
Sociální chování	Sociální chování pozitivní	Nos na nos	Zvířata se při střetnutí dotýkají nosy	
		Očichávání	Zvíře očichává druhého jedince	
		Vzájemná péče o srst	Zvířata vzájemně pečují o svou srst nebo jedno zvíře pečuje o srst druhého jedince; okusování, olizování, drbání bradou	
	Sociální chování negativní	Ústup	Náhly pohyb směrem od jiného zvířete; zvětšení vzdálenosti o délku těla	
		Hlava nahoře	Hlava i nos zvířete směřuje vzhůru	
		Útok, výpad	Krátký rychlý pohyb (běh, skok) na jiné zvíře	
		Pronásledování	Pronásledování zvířete, které se vzdaluje	
		Hrozící postoj	Zakřivené držení těla dvou zvířat proti sobě	

Výsledky

U sledovaných jedinců bylo porovnáno zastoupení aktivního lokomočního chování, ležení a stání v chovné a obohacené kleci (tab. 1). Statistická analýza ukázala, že morčata trávila v chovné kleci vysoce významně více času ležením ve srovnání s obohacenou klecí ($p = 0,000$). Naopak stáním trávila morčata vysoce významně více času v obohacené kleci ($p = 0,000$). Mezi četnostmi aktivního lokomočního chování v chovné a obohacené kleci nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly ($p > 0,05$).

Tabulka č. 2. Procentuální zastoupení aktivního lokomočního chování, ležení a stání v chovné a obohacené kleci

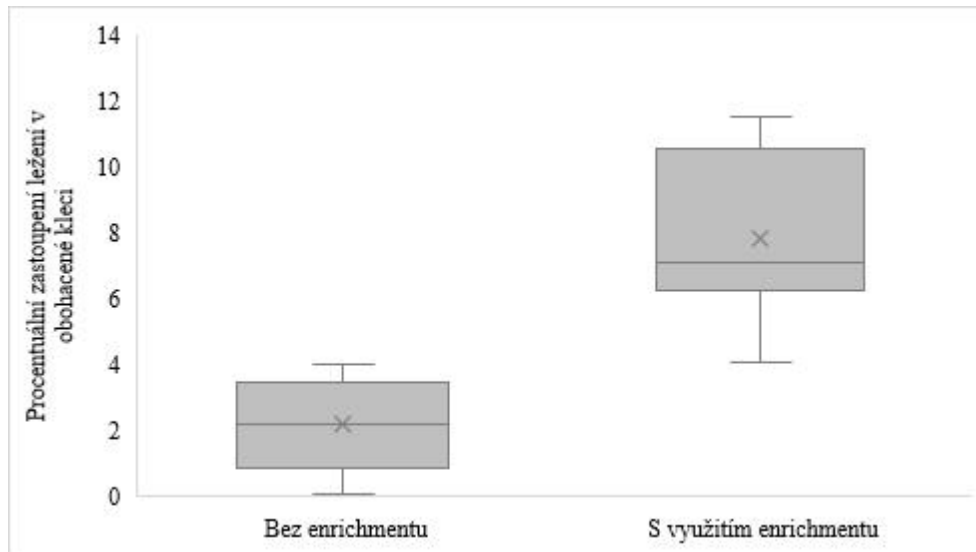
	Chovná klec	Obohacená klec
Aktivní lokomoční chování	2 %	3 %
Ležení	49 %	42 %
Stání	49 %	55 %

Graf č. 1 znázorňuje výskyt ležení v obohacené kleci s využitím a bez využitím obohacení prostředí.

Analýza zaznamenaných četností ukázala, že sledovaní jedinci trávili v obohacené kleci statisticky vysoce významně více času ($p = 0,000$) ležením s využitím prvků obohacení prostředí, konkrétně ležením pod dřevěným úkrytem nebo v hamace.

Tabulka č. 3 zobrazuje procentuální zastoupení prvků chování v chovné a obohacené kleci bez aktivního lokomočního chování, ležení a stání.

Graf č. 1. Využití obohacení prostředí při ležení v obohacené kleci



Tabulka č. 3. Procentuální zastoupení prvků chování v chovné a obohacené kleci

	Chovná klec	Obohacená klec
Příjem potravy	72,5%	63,1%
Příjem vody	8,6%	6,2%
Cékotrofie	0,2%	0,0%
Komfortní chování	9,7%	10,4%
Explorační chování	5,8%	18,3%
Sociální chování pozitivní	1,7%	1,1%
Sociální chování negativní	1,5%	0,9%

Během sledovaného období patřil mezi nejvíce pozorované prvky chování příjem potravy, a to jak v chovné, tak i obohacené kleci. Rozdíl v četnostech příjmu potravy byl zjištěn jako statisticky vysoce významný ($p = 0,000$). Znamená to, že v chovné kleci morčata přijímala potravu více než v kleci obohacené. Rovněž i příjem vody byl zaznamenán častěji v chovné kleci ($p = 0,005$). Rozdíly v četnostech byly zjištěny také u exploračního chování. Pozorovaní jedinci se statisticky vysoce významně více ($p = 0,000$) věnovali exploračnímu chování v obohaceném prostředí. Umístění morčat do obohacených klecí vedlo ke snížení výskytu nejen sociálně negativního chování, ale také sociálně pozitivního chování. Rozdíly v četnostech nicméně nebyly vyhodnoceny jako statisticky významné ($p > 0,05$).

Diskuze

V naší studii byla zjištěna nižší aktivita u morčat v chovné neobohacené kleci oproti kleci obohacené. Nedostatek stimulů a omezený prostor k pohybu mohou souviset s vyšším výskytem ležení (Rowland, 2020). Vliv zvětšení chovného prostoru na aktivitu jedinců byl studován u různých zvířecích druhů. Kitchen and Martin (1996) zjistili zvýšení obecné úrovně aktivity při rozšíření klece a zvýšení její složitosti u kosmana obecného. Sha et al. (2016) ve své studii na tamarínech a kalimiko naznačuje, že komplexnost prostředí a/nebo obohacení potravy může mít větší vliv na celkovou úroveň aktivity než pouhé zvětšení rozměrů chovného prostoru. U králíků bylo zjištěno snížení výskytu ležení z 22 % na 7 % po jejich přemístění z kotce do výběhu (Sládek et al., 2022). Dle van der Harst et al. (2003), kteří zkoumali vliv obohacení prostředí u potkanů, může být zvýšení obecné aktivity efektem vzrušení způsobené odlišným prostředím. Pro ležení si morčata v naší studii vybírala statisticky vysoce významně více prostor s poskytnutým enrichmentem. Také Helbing et al. (2023) ve své studii zjistili, že morčata trávila většinu doby pozorování v poskytnutém přístřešku. Tato skutečnost může být způsobena tím, že přístřešek poskytuje zvířatům bezpečné útočiště v podobě krytého místa v jinak otevřené kleci (Olsson et al., 2003), a proto využívají k ležení a s ním spojenému odpočinku právě prostor pod přístřeškem. Tato zjištění potvrzují závěry Gut et al. (2018), že přístřešky představují klíčový prvek obohacení prostředí morčat.

Obohacení chovného prostoru podporuje také explorativní chování zvířat (Veissier et al., 2024). V naší studii bylo prokázáno, že umístění morčat do obohaceného prostředí vedlo ke statisticky vysoce významnému zvýšení exploračního chování a to z 5,8 % v chovné kleci na 18,3 % v obohacené kleci. Očekávali jsme však ještě výraznější nárůst exploračního chování. Tento nesoulad by mohl být způsoben tím, že zvířatům bylo poskytnuto pouze jedno obohacení v podobě zvětšení chovného prostoru a přidání místa k odpočinku a úkrytu, což zvířata pravděpodobně nestimulovalo k vyšší míře explorační. Zhang et al. (2022) a Clark et al. (2023) uvádějí, že zvířata vykazují vyšší míru exploračního chování v prostředí, které je obohaceno rozmanitějšími typy enrichmentu.

Příjem potravy byl u morčat častěji zaznamenán v chovné neobohacené kleci. Ke stejnému výsledku došli také autoři u norků (Meagher and Mason, 2012) a činčil (Łapiński et al., 2023). Dle Łapiński et al. (2023) lze předpokládat, že zvířata příjmem potravy neplní pouze výživovou stránku, ale příjem potravy může představovat také určitou formu aktivity, pomocí které si kompenzují nedostatek prostoru a stimulů v neobohacené kleci.

Oproti očekávání nevedlo umístění morčat do obohaceného prostředí k významnému poklesu sociálně negativního chování. Výsledek této studie se shoduje se studií Smith and Corrow (2005).

Závěr

Umístění morčat do obohacených klecí ovlivnilo jejich behaviorální projevy. V chovných klecích trávili jedinci více času příjmem potravy a ležením. Také negativní sociální chování bylo v chovném prostředí zaznamenáno častěji, zvýšení velikosti a obohacení prostoru však nevedlo ke statisticky významnému snížení tohoto chování. V obohacených klecích morčata vykazovala častější stání a explorační chování. Pro ležení si pozorování jedinci vybírali především prostor pod přístřeškem, což ukazuje, že obohacení prostředí v podobě úkrytů je z pohledu zvířat nezbytným prvkem chovného zařízení. Naše výsledky naznačují, že obohacení prostředí podporuje vyšší aktivitu morčat, což může příznivě ovlivnit jejich psychickou pohodu i celkové zdraví.

Tato studie byla finančně podpořena ITA VETUNI (projekt č. 2024ITA26).

Literatura

- Baumans, V. 2005. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research. *Ilar Journal* 46: 162-170.
- Begum-Diamond, Z., Neuhauser, J.E., Cameron, K.E. 2022. Measuring ramp use in guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Journal of the Experimental Analysis of Behavior* 118: 292-301.
- Cameron, K.E., Holder, H.E., Connor, R.L. 2022. Cross-sectional survey of housing for pet guinea pigs (*Cavia porcellus*) in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* 70: 228-232.
- Clark, G.B., Díez-León, M., Meagher, R.K. 2023. Diversity and novelty in environmental enrichment increases enrichment use in juvenile American mink (*Neogale vison*). *Frontiers in Animal Science* 4: 1228533.
- Claxton, A.M., 2011. The potential of the human-animal relationship as an environmental enrichment for the welfare of zoo-housed animals. *Applied Animal Behaviour Science* 133: 1-10.
- Dawkins, M.S. 2004. Using behavior to assess animal welfare. *Animal Welfare* 13: S3-S7.
- Dixon, L., Hardiman, J., Cooper, J. 2010. The effects of spatial restriction on the behaviour of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Veterinary Behavior* 5: 302-308.
- Funabashi, D., Tsuchida, R., Matsui, T., Kita, I., Nishijima, T. 2023. Enlarged housing space and increased spatial complexity enhance hippocampal neurogenesis but do not increase physical activity in mice. *Frontiers in Sports and Active Living* 5: 1203260.
- Garner-Richardson, V. 2012. Guinea pig nutrition. *The Veterinary Nurse* 3: 274-282.
- Gut, W., Crump, L., Zinsstag, J., Hattendorf, J., Hediger, K. 2018. The effect of human interaction on Guinea pig behavior in animal-assisted therapy. *Journal of Veterinary Behavior* 25: 56-64.
- Haemisch, A. 1990. Coping with social conflict and shortterm changes of plasma cortisol titers in familiar and unfamiliar enrichments. *Physiology & Behaviour* 47: 1265-1270.
- Harrup, A.J., Rooney, N. 2020. Current welfare state of pet guinea pigs in the UK. *Veterinary Record* 186: 282.
- van der Harst, J.E., Baars, A.M., Spruijt, B.M. 2003. Standard housed rats are more sensitive to rewards than enriched housed rats as reflected by their anticipatory behaviour. *Behavioural Brain Research* 142: 151-156.
- Helbing, J., Spittler, A.P., Sadar, M.J., Santangelo, K. 2023. Optimization of overhead enclosure monitoring in juvenile male Dunkin Hartley Guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Laboratory Animals* 57: 552-564.
- Huang, Y., Bréda, J., Saviotto, D., Debrusse, A.M., Bonnemère, J.M., Gidenne, T., Combes, S., Fortun-Lamothe, L. 2021. Effect of housing enrichment and type of flooring on the performance and behaviour of female rabbits. *World Rabbit Science* 29: 275-285.
- Kitchen, A.M., Martin, A.A. 1996. The effects of cage size and complexity on the behaviour of captive common marmosets, *Callithrix jacchus jacchus*. *Laboratory Animals* 30: 317-326.

- Łapiński, S., Niedbała, P., Markowska, K., Rutkowska, A., Lis, M.W. 2023. The effects of age, size and cage complexity on the behaviour of farmed female chinchillas (*Chinchilla lanigera*). *Scientific Reports* 13: 6108.
- Meagher, R.K., Mason, G.J. 2012. Environmental enrichment reduces signs of boredom in caged mink. *PLoS ONE* 7.
- Mellen, J., MacPhee, M.S. 2001. Philosophy of Environmental Enrichment: Past, Present, and Future. *Zoo Biology* 20: 211-226.
- Namiki, M., Fukayama, T., Suzuki, T., Masaiwa, A. 2024. Relationship between ear temperature, behaviour and stress hormones in Guinea pigs (*Cavia porcellus*) during different interactive activities in zoos. *Animals* 14: 1111.
- Newberry, R.C. 1995. Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environments. *Applied Animal Behaviour Science* 44: 229-243.
- Olsson, I.A.S., Nevison, C.M., Patterson-Kane, E.G., Sherwin, C.M., van de Weerd, H.A., Würbel, H. 2003. Understanding behaviour: The relevance of ethological approaches in laboratory animal science. *Applied Animal Behaviour Science* 81: 245-264.
- Poole, T.B. 1998. Meeting a mammal's psychological needs: Basic principles. In: Shepherdson, D.J., Mellen, J.D., Hutchins, M., eds. *Second Nature: Environmental Enrichment for Captive Animals*. Washington: Smithsonian Institution Press.
- Rood, J.P. 1972. Ecological and behavioural comparisons of three genera of argentine caviés. *Animal Behaviour Monographs* 5: 3-83.
- Rooney, N.J., Blackwell, E.J., Mullan, S.M., Saunders, R., Baker, P.E., Hill, J.M., Sealey, C.E., Turner, M.J., Held, S.D.E. 2014. The current state of welfare, housing and husbandry of the English pet rabbit population. *BMC Research Notes* 7: 942.
- Rowland, M. 2020. Veterinary care of Guinea pigs. *In Practice* 42: 91-104.
- Rushen, J., Chapinal, N., de Passillé, A.M. 2012. Automated monitoring of behavioral-based animal welfare indicators. *Animal Welfare* 21: 339-350.
- Sha, J.C.M., Ismail, R., Marlina, D., Lee, J.L. 2016. Environmental complexity and feeding enrichment can mitigate effects of space constraints in captive callitrichids. *Laboratory Animals* 50: 137-144.
- Sládek, L., Střeštková, Y., Filipčík, R., Mikule, V., Sobotková, E., Kuřítková, D. 2022. Vliv technologie ustájení králíka domácího na životní projevy v podmínkách drobnochovu. In: 49. konference České a Slovenské etologické společnosti. Praha, s. 68.
- Smith, A.L., Corrow, D.J. 2005. Modifications to husbandry and housing conditions of laboratory rodents for improved well-being. *ILAR Journal* 46: 140-147.
- Stauffacher, M. 1995. Environmental enrichment, fact and fiction. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science* 22: 39-42.
- Veissier, I., Lesimple, C., Brunet, V., Aubé, L., Botreau, R. 2024. Review: Rethinking environmental enrichment as providing opportunities to acquire information. *Animal* 18: 101251.

Zhang, C., Juniper, D.T., McDonald, R., Parsons, S., Meagher, R.K. 2022. Holstein calves' preference for potential physical enrichment items on different presentation schedules. *Journal of Dairy Sciences* 105: 8316-8327.

Cíl 6: Hodnocení akutní stresové reakce u alpak (*Vicugna pacos*) pomocí neinvazivních metod

VYUŽITÍ INFRAČERVENÉ TERMOGRAFIE PŘI HODNOCENÍ AKUTNÍ STRESOVÉ REAKCE U ALPAK (*VICUGNA PACOS*) – PILOTNÍ STUDIE

Gabriela Kadlecová, Monika Šebánková, Eva Voslářová, Vladimír Večerek

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

Abstrakt

Alpaky jsou důležitým hospodářským druhem v místě svého výskytu, avšak také zájem o jejich chov jako společníka člověka vzrůstá, a to především v Evropě, kam byl tento druh importován. Alpaky jsou odolné vůči nepříznivým podmínkám v Jižní Americe, původnímu místu jejich výskytu, a k těmto specifickým vlastnostem se musí přihlížet při krmení nebo péči o vlnu stejně jako na fakt, že se jedná o zvířata náchylná ke stresu více, než je obvyklé u jiných druhů pet zvířat. Stanovením akutní stresové reakce u tohoto druhu lze odhalit stresové faktory související s chovem. Samotný sběr dat by však měl být také šetrný, aby nezvyšoval stresovou zátěž, a proto je vhodné zvolit zejména neinvazivní metody, jako je snímání termokamerou a získání dat o povrchové tělesné teplotě. Stejně jako u dalších druhů zvířat, i u alpak byly potvrzeny vzrůstající hodnoty ($p < 0,05$) tělesné teploty v koutku oka během akutní stresové reakce, v tomto případě během běžné veterinární prohlídky spojené s injekční aplikací vitamínu a odběru vzorku trusu z rekta. Infračervená termografie je v oblasti hodnocení welfare realitně novou metodou, která se může využít nejen jako vhodný nástroj ke sledování stresu, ale také k časné diagnostice zdravotních poruch, bolesti či dalších emocí.

Úvod

Alpaka patří v některých zemích světa mezi důležitá hospodářská zvířata, ze kterých se využívá mnoho produktů jako jsou maso, kůže či vlna (Zarrin et al., 2020), v posledních letech se z ní však v evropských státech stávají také oblíbená zvířata zájmová. Alpaky mají určitá specifika, která souvisí s oblastmi, ze kterých pochází. Chudá pastva a střídání vysokých a nízkých teplot během dne způsobily, že alpaky mají vyvinuté jedinečné termoregulační mechanismy, a rovněž jejich trávicí systém je uzpůsoben chudé potravě (Van Saun, 2008; Hongo et al., 2007). V porovnání s některými jinými býložravci tak mají alpaky vyvinuté efektivnější trávení a lepší vstřebávání živin z chudé potravy jako je například seno (Sponheimer et al., 2003). Přemíra sacharidů a dalších energeticky bohatých látek u těchto zvířat způsobují zdravotní problémy. Ještě více mohou být lamy a další velbloudovití náchylní k těmto problémům během březosti (Anderson et al., 1994), v některých případech může při vystavení dlouhodobému stresu docházet i k jaterní lipidóze (Van Saun et al., 2009) ohrožující prospívání i život zvířat.

Z pohledu welfare zvířat mohou být alpaky vystaveny mnoha stresovým faktorům během svého života, ať už v souvislosti s přepravou, manipulací, veterinární prohlídkou či některými dalšími

zákroky. V souvislosti s monitoringem stresu je u zvířat využíváno několik metod, řadících se mezi metody invazivní, při kterých je potřeba zásah do integrity zvířete jako je například vpich jehly při odběru krve, tak i metody neinvazivní, jejichž použití je v souladu se zachováním vysoké úrovně welfare a zejména u zvířat citlivějších vůči stresovým faktorům, jako jsou právě alpaky, může být jejich výběr vhodnější. U alpak již bylo využito stanovení fekálního kortizolu (Arias et al., 2013) nebo stanovení kortizolu v krvi (Anderson et al., 1999) při měření stresu. Jednou z neinvazivních metod je využití infračervené termografie, kdy lze díky snímání a detekci infračerveného záření termokamerou zjistit povrchovou teplotu zvířete z distanční vzdálenosti, bez nutnosti manipulace nebo fixace. Tato metoda byla využita u mnoha hospodářských, zájmových i volně žijících zvířat při zkoumání akutní stresové reakce (Abdel-Hamid and Dawod, 2020; Jerem et al., 2015; Travain and Valsecchi, 2021).

Cílem této práce bylo zhodnotit možnosti využití infračervené termografie při hodnocení akutní stresové reakce u alpak před a po veterinární prohlídce.

Materiál a metodika

Zvířata

Data o povrchové teplotě byla získána od 8 jedinců alpak v různém staří chovaných k zájmovým účelům, poměr pohlaví byl 4 samci a 4 samice. Ustájení sestávalo z volného výběhu s pastvou, přístřešku se slámou a krmení lučným senem ad libitum, voda byla rovněž v neomezeném množství. Alpaky byly navyklé na přítomnost návštěvníků i běžnou péči ze strany ošetřovatelů.

Sběr dat

Sběr dat probíhal nejdříve u všech zvířat v klidu na pastvě ze vzdálenosti do tří metrů. Osoba s termokamerou nejdříve strávila ve výběhu určitý čas, kdy si zvířata zvykla na její přítomnost a dále si jí již nevšímala. Po snímání všech zvířat bylo přistoupeno k odchytu a fixaci postupně u všech jedinců. Fixaci prováděli dva ošetřovatelé, prohlídku veterinární lékařka. Během veterinární prohlídky byl každý jedinec zhodnocen po stránce celkového zdravotního stavu, byl mu injekčně aplikován vitamin A (Bioveta, Ivanovice na Hané, Česká republika), odebrán vzorek slin s využitím zkumavky Salivette (Sarstedt, Nümbrecht Německo) a vzorek trusu z rekta.

Ke snímání povrchové teploty byla využita termokamera testo 890-2 (Testo SE & Co. KGaA, Německo) s nastavenou emisivitou 0,97. Snímky byly pořizovány v pravém úhlu k hlavě alpak ze vzdálenosti cca 0,5 metru tak, aby vznikly ostré snímky zaměřující se na oblast oka. U každého zvířete vznikly tři snímky před manipulací (Výchozí hodnota) a tři snímky v průběhu veterinárního vyšetření (Fixace a vyšetření). Následně hodnoty povrchové teploty byly z jednotlivých termosnímků odečteny z vnitřního koutku oka v programu IRSofT (Testo SE & Co. KGaA, Německo) a pro každého jedince (samec 1-4 a samice 1-4) v každé fázi (Výchozí hodnota, Fixace a vyšetření) byla ze tří snímků vypočtena průměrná hodnota. Neostré snímky byly z hodnocení vyloučeny.

Statistické vyhodnocení

Statistické zpracování výsledků bylo provedeno pomocí statistického softwaru UNISTAT pro Excel verze 6.5 (Unistat Ltd., London, UK). Hodnoty povrchové teploty u zvířat před manipulací a po veterinárním ošetření byly porovnány pomocí párového Studentova t-testu. Rozdíly $p < 0,05$ byly stanoveny jako statisticky významné.

Výsledky

Tabulka č. 2 uvádí hodnoty povrchové teploty vnitřního koutku oka alpak před a po vyšetření veterinárním lékařem.

Tabulka č. 2. Povrchová teplota (°C) vnitřního koutku oka alpak před veterinárním vyšetřením a po něm

Alpaky n = 8	Povrchová teplota vnitřního koutku oka (°C)	
	Výchozí hodnota	Fixace a vyšetření
samec 1	36,90	39,30
samec 2	37,40	37,30
samec 3	36,65	38,93
samec 4	36,95	38,53
samice 1	36,40	36,60
samice 2	34,40	36,65
samice 3	36,10	37,90
samice 4	36,00	35,30
Průměr	36,35^a	37,56^b

^{a,b} Rozdílné indexy v řádku indikují statistickou významnost ($p < 0,05$)

U 8 lam alpak byl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) v povrchové teplotě vnitřního koutku oka u zvířat před manipulací a po veterinární prohlídce, jejíž průměrná hodnota byla 36,35 °C a po manipulaci významně vzrostla ($p < 0,05$) na 37,56 °C.

Diskuze

Nárůst povrchové teploty při akutní stresové reakci byl potvrzen u mnoha dalších druhů zvířat, u samotných alpak však tato metoda dosud využita nebyla. Nárůst teploty na povrchu těla je výsledkem spolupůsobení stresových hormonů, které zapříčiňují dilataci cév projevujících se na periferních částech těla přechodným zvýšením teploty (Cabezas et al., 2007; Bartolomé et al., 2019; Herborn et al., 2015). Při použití termokamery je třeba hledat na zvířeti neosrstěná místa, ze kterých lze snadno snímat teplotu samotné pokožky bez pokryvu vlny, srsti či peří, tzv. termální okna (Andrade, 2015; Lowe et al., 2019). Z tohoto pohledu se jeví vnitřní část koutku oka u alpak jako ideální, protože zde není vlna, která kůži izoluje a znemožňuje tak prostup tepla na povrch. Jako dalším vhodným místem by se mohla jevit termální okna v axilární oblasti, která slouží k ochlazení povrchu těla lam a jedná se o poměrně velkou plochu ztenčené kůže v oblasti břicha, axilární oblasti a vnitřní straně stehen (Gerken, 2010), nicméně ta jsou pro termokameru špatně dostupná a teplota v těchto místech může být ovlivněna třením pokožky o sebe. I v případě vnitřního koutku oka je nevhodné snímat zvířata slzící, ušpiněná nebo vyhřátá od slunce, tedy prostředí hraje při využívání termokamery velmi důležitou roli, kterou je nutné zohlednit (Jimoh and Ewuola, 2018).

Kromě samotného nárůstu teploty se někdy popisuje také krátkodobé snížení teploty s jejím následným nárůstem, kde rozdíl mezi nejnižší a nejvyšší hranicí může být až 3 °C (Bartolomé et al., 2019). Tento jev u alpak zjištěn nebyl, nicméně rozdíl teplot před a po veterinární prohlídce byl v průměru 1,21 °C. Tato přechodná vazokonstrikce může trvat velmi krátkou dobu a může být tak obtížněji zachytitelná, takže v takovém případě je ideální využití videa u termokamer, které toto umožňují. Zúžení průsvitu cév bezprostředně po působení silných stresových faktorů bylo popsáno například u králíků domácích (Blessing, 2003).

Z celkových hodnot nelze usuzovat, jak silně na zvíře daný stresor působí, neboť zde hraje roli individualita každého zvířete a vzestup teploty se může mezi jedinci lišit, nicméně snímky a jejich vyhodnocení mohou informovat o tom, jak dlouho zvíře pociťuje působení stresového faktoru podle toho, jak dlouho zvýšené hodnoty tělesné teploty přetrvávají, a zda dochází k návkyku na konkrétní faktor, a tedy přivyknutí zvíře na určité situace a zkrácení této doby návratu k výchozím hodnotám. Například u potkanů byla naměřena bazální hodnota až po 30 minutách od působení stresového faktoru (Vianna and Carrive, 2005), nicméně hlavní roli zřejmě bude hrát zkušenost s danou situací (Valera et al., 2012). Takové hodnocení může být užitečné například při výběru metod při některých chovatelských zásadách, které jsou nutné, například během stříhu vlny a přizpůsobit tak výběr fixace a vybrat tu nejšetrnější, která stresovou reakci vyvolává jen krátkodobě. Samotný návrat k bazálním hodnotám (tedy u zvířete v klidu), je také vhodným námětem na další výzkum. Je zřejmé, že manipulace nebo vyšetřování veterinárním lékařem je stresujícím zásahem nejen u alpak, jak jsme zjistili dle naměřených hodnot, ale rovněž u dalších druhů, například u koní (Yarnell et al., 2013), u psů (Travain et al., 2015) nebo u koz (Bartolomé et al., 2019).

Dalšími faktory, které byly termokamerou u jiných druhů zkoumány, byl vzestup teploty spojený s emocemi (Chotard et al., 2018), tepelným stresem (de Lima et al., 2013) nebo s bolestí (Fleischmann et al., 2009), tedy i v těchto oblastech by mohla termokamera u alpak najít své uplatnění. Kromě toho se termokamera jeví jako vhodný nástroj k časně detekci některých onemocnění spojených se zánětlivou reakcí. V rámci veterinárních vyšetření již byla prokázána vhodnost využití infračervené termografie v případě diagnostiky laminitid u koní (Rosenmeier et al., 2012) či mastitid u skotu (Colak et al., 2008). U zvířat citlivých na stres při manipulaci může být termokamera vhodnějším nástrojem pro zjištění výchozích hodnot, protože osoba provádějící sběr dat může být od zvířat vzdálená i několik metrů a je v porovnání s jinými metodami vhodnější k zjišťování bazálních hodnot. Stále se však jedná o metodu poměrně novou, u alpak zcela neprozkoumanou, a je vhodné tato data o povrchové teplotě a její změny srovnávat s dalšími metodami jako je například porovnání s markery oxidačního stresu (Jimoh et al., 2017) nebo hladinami stresových hormonů v různých matricích (Arias et al., 2013; Anderson et al., 1999).

Závěr

Alpaky jsou výborně vybaveny pro život v oblastech, odkud pochází, zároveň jsou však také vysoce vnímavé vůči stresu. Z toho důvodu je v případě tohoto druhu důležitá nejen samotná diagnostika stresu a zátěž zvířat při některých chovatelských úkonech, ale rovněž výběr samotné metody sběru vzorků. Neinvazivní sběr dat nezatěžuje zvířata a v případě využití termokamery ani nevyžaduje úzký kontakt a přísnou fixaci. Jako vhodné místo ke snímání termokamerou se jeví vnitřní koutek oka, který není pokrytý vlnou, a u kterého byl prokázán vzestup povrchové tělesné teploty během veterinárního ošetření zahrnujícího zhodnocení zdravotního stavu a injekční aplikaci vitamínového doplňku spolu s odběrem dalších vzorků. Další využívání termokamery může umožnit zhodnocení stresu při úkonech v chovech alpak a určit jaké faktory jsou pro tato zvířata zvláště stresující a náročné

a jaké jsou možnosti jejich zjemnění tak, aby byla zachována vysoká úroveň těchto čím dál více oblíbených pet zvířat.

Tato práce byla financována ITA VETUNI (projekt č. 2024ITA26).

Literatura

- Abdel-Hamid, T.M., Dawod, A. 2020. Breed effects on growth performance, blood parameters and the levels of metabolic hormones in rabbits under heat stress in Egypt. *Zagazig Veterinary Journal* 148: 284-295.
- Anderson, D.E., Constable, P.D., Yvorchuk, K.E., Anderson, N.V., St-Jean, G., Rock, L. 1994. Hyperlipemia and ketonuria in an alpaca and a llama. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 8: 207-211.
- Anderson, D.E., Grubb, T., Silveira, F. 1999. The effect of short duration transportation on serum cortisol response in alpacas (*Llama pacos*). *The Veterinary Journal* 157: 189-191.
- Andrade, D.V. 2015. Thermal windows and heat exchange. *Temperature* 2: 451-451.
- Arias, N., Requena, M., Palme, R. 2013. Measuring faecal glucocorticoid metabolites as a non-invasive tool for monitoring adrenocortical activity in South American camelids. *Animal Welfare* 22: 25-31.
- Bartolomé, E., Azcona, F., Cañete-Aranda, M., Perdomo-González, D.I., Ribes-Pons, J., Terán, E.M. 2019. Testing eye temperature assessed with infrared thermography to evaluate stress in meat goats raised in a semi-intensive farming system: a pilot study. *Archives Animal Breeding* 62: 199-204.
- Blessing, W.W. 2003. Lower brainstem pathways regulating sympathetically mediated changes in cutaneous blood flow. *Cellular and Molecular Neurobiology* 23: 527-538.
- Cabezas, S., Blas, J., Marchant, T.A., Moreno, S. 2007. Physiological stress levels predict survival probabilities in wild rabbits. *Hormones and Behavior* 51: 313-320.
- Colak, A., Polat, B., Okumus, Z., Kaya, M., Yanmaz, L.E., Hayirli, A. 2008. Short communication: early detection of mastitis using infrared thermography in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 91: 4244-4248.
- de Lima, V., Piles, M., Rafel, O., López-Béjar, M., Ramón, J., Velarde, A., Dalmau, A. 2013. Use of infrared thermography to assess the influence of high environmental temperature on rabbits. *Research in Veterinary Science* 95: 802-810.
- Fleischmann, T., Siewert, C., Staszuk, C., Schulze, M., Stadler, P., Seifert, H. 2009. Thermal imaging as an aid to the diagnosis of pain in horses – first results. In: Dössel, O., Schlegel, W.C. (Eds.), *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7-12, 2009, Munich, Germany, IFMBE Proceedings*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 277-280.
- Gerken, M. 2010. Relationships between integumental characteristics and thermoregulation in South American camelids. *Animal* 4: 1451-1459.
- Herborn, K.A., Graves, J.L., Jerem, P., Evans, N.P., Nager, R., McCafferty, D.J., McKeegan, D.E.F. 2015. Skin temperature reveals the intensity of acute stress. *Physiology and Behavior* 152: 225-230.

- Hongo, A., Toukura, Y., Choque, J.L., Aro, J.A., Yamamoto, N. 2007. The role of a cleft upper lip of alpacas in foraging extremely short grasses evaluated by grazing impulse. *Small Ruminant Research* 69: 108-114.
- Chotard, H., Ioannou, S., Davila-Ross, M. 2018. Infrared thermal imaging: Positive and negative emotions modify the skin temperatures of monkey and ape faces. *American Journal of Primatology* 80: e22863.
- Jerem, P., Herborn, K., McCafferty, D., McKeegan, D., Nager, R. 2015. Thermal imaging to study stress non-invasively in unrestrained birds. *Journal of Visualized Experiments* 105: 53184.
- Jimoh, O., Ewuola, E., Balogun, A. 2017. Oxidative stress markers in exotic breeds of rabbit during peak of heat stress in Ibadan, Nigeria. *Journal of Animal Behaviour and Biometrology* 12: 1-9.
- Jimoh, O.A., Ewuola, E.O. 2018. Thermophysiological traits in four exotic breeds of rabbit at least temperature-humidity index in humid tropics. *The Journal of Basic and Applied Zoology* 79: 18.
- Lowe, G., Sutherland, M., Waas, J., Schaefer, A., Cox, N., Stewart, M. 2019. Infrared thermography—a non-invasive method of measuring respiration rate in calves. *Animals* 9: 535.
- Rosenmeier, J.G., Strathe, A.B., Andersen, P.H. 2012. Evaluation of coronary band temperatures in healthy horses. *American Journal of Veterinary Research* 73: 719-723.
- Sponheimer, M., Robinson, T., Roeder, B., Hammer, J., Ayliffe, L., Passey, B., Cerling, T., Dearing, D., Ehleringer, J. 2003. Digestion and passage rates of grass hays by llamas, alpacas, goats, rabbits, and horses. *Small Ruminant Research* 48: 149-154.
- Travain, T., Colombo, E.S., Heinzl, E., Bellucci, D., Prato Previde, E., Valsecchi, P. 2015. Hot dogs: Thermography in the assessment of stress in dogs (*Canis familiaris*) - A pilot study. *Journal of Veterinary Behavior* 10: 17-23.
- Travain T, Valsecchi P. 2021. Infrared thermography in the study of animals' emotional responses: A critical review. *Animals* 11: 2510.
- Valera, M., Bartolomé, E., Sánchez, M.J., Molina, A., Cook, N., and Schaefer, A. 2012. Changes in eye temperature and stress assessment in horses during show jumping competitions. *Journal of Equine Veterinary Science* 32: 827-830.
- Van Saun, R.J. 2008. Effect of nutrition on reproduction in llamas and alpacas. *Theriogenology* 70: 508-514.
- Van Saun, R.J. 2009. Nutritional diseases of llamas and alpacas. *Food Animal Practice* 25: 797-810.
- Vianna, D.M.L., Carrive, P. 2005. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. *European Journal of Neuroscience* 21: 2505-2512.
- Yarnell, K., Hall, C., Billett, E. 2013. An assessment of the aversive nature of an animal management procedure (clipping) using behavioral and physiological measures. *Physiology and Behavior* 118: 32-39.
- Zarrin, M., Riveros, J.L., Ahmadpour, A., De Almeida, A.M., Konuspayeva, G., Vargas-Bello-Pérez, E., Faye, B., Hernández-Castellano, L.E. 2020. Camelids: New players in the international animal production context. *Tropical Animal Health and Production* 52: 903-913.

STANOVENÍ HLADINY KORTIZOLU ZE SLIN JAKO MOŽNOST MONITORINGU AKUTNÍ STRESOVÉ REAKCE U ALPAK (*VICUGNA PACOS*)

Monika Šebánková, Gabriela Kadlecová, Eva Voslářová, Vladimír Večerek

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

Abstrakt

Alpaky jsou v Evropě čím dál populárnějším zájmovým druhem, který má v rámci chovu nejen specifické potřeby v oblasti výživových nároků, ale rovněž při manipulaci a působení stresových faktorů, vůči kterým jsou alpaky, obdobně jako ostatní velbloudovití, velmi citlivé. Proto chovatelské zásahy jako je veterinární ošetření nebo stříhání vlny pro ně může být silně stresující záležitostí a chronický stres u těchto zvířat může navíc vyvolávat závažné zdravotní poruchy ovlivňující úroveň jejich welfare. Z tohoto důvodu je třeba nalézt a identifikovat, jaké situace či faktory spouští stresovou reakci, a pro tento účel zvolit vhodné a co nejméně invazivní postupy odběru vzorků. Jednou z možností je odběr slin pomocí speciálních odběrových sad, které vyžadují jen mírnou potřebu manipulace se zvířetem a jeho fixaci, ale samotný odběr nezpůsobuje žádnou bolest ani narušení integrity těla. Při odběru slin u 8 alpak před veterinárním odběrem a po něm nebylo zjištěno zvýšení ($p > 0,05$) hladiny kortizolu ve slinách. Tento výsledek může být ovlivněn tím, že daná zvířata nebyla zvyklá na odběr vzorků slin a při samotném odběru již byla do jisté míry stresována. Další odběr pro ně nemusel být již natolik stresující vzhledem k statisticky nevýznamným ($p > 0,05$) rozdílům v hladině kortizolu před a po ošetření veterinárním lékařem. Zatímco před veterinárním ošetřením byla průměrná hodnota kortizolu ve slinách 3 822,57 pg/ml, po veterinárním ošetření a injekční aplikaci vitamínu se zvedla hodnota na 4 064,60 pg/ml. Nadále je potřeba zdokonalovat tuto metodu a odběr slin u alpak a pracovat na zjištění bazální hodnoty kortizolu ve slinách alpak s využitím navyknutí na samotný odběr slin, aby se této metody mohlo využít v mnoha dalších stresujících situacích.

Úvod

Alpaky se řadí mezi jihoamerické velbloudy (Goñalons, 2008) a podle současných studií jejich domestikace proběhla před 6 000 - 7 000 lety v centrálních Andách (Goñalons, 2008; Fan et al., 2020) v oblasti severní Chile, pánve v okolí jezera Titicaca, středního Peru a pobřežní lokality severního a jižního Peru (McMullenová, 2008; Goñalons, 2008). Tato oblast má specifické klimatické podmínky, které jsou typické vysokými denními teplotami, které následně přes noc strmě klesají (McMullenová, 2008), a rovněž pastva je zde poměrně chudá na živiny. Chov alpak je pro místní obyvatele stěžejní z hospodářského hlediska - získává se z nich kvalitní vlákno pro oděvní průmysl, jsou poráženy k produkci masa, jejich trus lze využít jako palivo a mají významnou roli v tradiční kultuře (McGregor, 2006; Wheeler, 2012). Export alpak do dalších částí světa, zejména do Austrálie a na Nový Zéland, začal již v roce 1980 (McGregor, 2006). Cílem chovu v těchto destinacích byla tvorba dalších stád a zlepšení kvality vlákna. Do Evropy jsou alpaky dováženy od roku 1990 a v současnosti se zde chovají

k hospodářským účelům, nicméně v posledních letech se z nich stávají i oblíbená zájmová zvířata (Castilla-Castaño et al., 2021).

Morfologické znaky alpak včetně některých specifických fyziologických procesů a s tím související nároky na chov jsou důsledkem adaptace na jejich přirozené prostředí, pro které jsou typické velké výkyvy teplot a chudá potrava (Tynes, 2010). S výjimkou asi tří měsíce dlouhého období dešťů spojeného s dostatkem píče je po většinu roku k pastvě dostupná pouze suchá tráva (Van Saun, 2013), proto alpaky produkují větší množství slin a průchod gastrointestinálním traktem je pomalejší, což umožňuje vyšší využití živin při nižším denním příjmu (Duncanson, 2012). Hustá srst pomáhá alpakám překonávat chlad, naopak místa s tenčí kůží a řidším osrstěním v axilárním prostoru a na vnitřní straně stehien napomáhají ochlazování povrchu spolu s pocením (Norton et al., 2014). Pocení a další mechanismy ochlazení těla u alpak však nemusí být dostatečně efektivní, zejména pokud je teplota a vlhkost okolí příliš vysoká (Gerken, 2010). V těchto případech lze přistoupit ke stříhání srsti jako prevenci hypertermie, která se u alpak v našich oblastech může vyskytovat (Navarre et al., 2001).

Alpaky jsou stádová zvířata (Pollard and Littlejohn, 1995) a stejně jako další velbloudovití jsou výrazně citlivé vůči stresu (Whitehead, 2013). Fyziologická zátěž organismu jako je březost a laktace, onemocnění nebo další stresové faktory, včetně sociálního a environmentálního stresu, jejichž kompenzace vyžaduje zvýšené energetické nároky, vedou u těchto zvířat ke ztrátě chuti k jídlu, při delším působení stresových faktorů ke ztrátě hmotnosti a rozvoji jaterní lipidózy (Van Saun, 2006). Dalším negativním následkem stresu u alpak je výskyt ulcerací v třetím kompartmentu žaludku, které mohou být různé velikosti a hloubky (Whitehead, 2013).

Stres u alpak lze stanovovat mnoha metodami. Zjevné jsou změny chování jako jsou snahy o únik, dupání, kopání, plivání, nebo napjatý výraz ve tváři se sklopenými ušními boltci a s široce otevřenými očními víčky, dále je typická i vokalizace (Waiblinger et al, 2020; Kapustka and Garbiec, 2022). Další možností je určit stresovou zátěž hodnocením koncentrace stresových hormonů. Stres je fyziologický mechanismus, který umožňuje vyrovnávat se se změnami v prostředí (Möstl and Palme, 2002) a v průběhu stresové reakce dochází k uvolnění katecholaminů a glukokortikoidů (Marketon and Glaser, 2008), které lze stanovit v různých vzorcích (Sheriff et al., 2011). Některé vzorky však nejsou k odběru vhodné, protože odběr samotný je velkou stresovou zátěží a dochází tak ke zkreslení výsledků spolu s negativním ovlivněním welfare jedince, proto je vhodnější přistoupit k neinvazivním technikám sběru vzorků (Cook, 2012). Známou metodou, použitou například k hodnocení akutní stresové reakce u ovcí, je měření koncentrace hormonů ve slinách (Fell et al., 1985). Odběr vzorků slin byl využit i ve studiích prováděných na alpakách pro stanovení stresové zátěže při různých metodách fixace při stříhání vlny (Wittek et al., 2017; Prágai and Kovács, 2020).

Cílem této práce bylo zhodnotit možnosti využití odběru slin a stanovení slinného kortizolu při hodnocení akutní stresové reakce u alpak při manipulaci a veterinární prohlídce.

Materiál a metodika

Zvířata

Stádo alpak, od kterých byly vzorky odebírány, se skládalo z 8 jedinců ve věku od 9 měsíců do 16 let. Pohlaví bylo zastoupeno rovnoměrně v počtu 4 samic a 4 samců. Všichni jedinci byli ustájeni ve výběhu s pastvou s volně přístupným přístřeškem se slámou a krmením ad libitum lučným senem. Voda byla k dispozici rovněž ad libitum. Preventivní kontrola zdravotního stavu probíhá 2x ročně. Farma, na které je stádo chováno, pořádá pravidelné akce pro návštěvníky a exkurze pro školy.

Jedinci jsou zvyklí na pravidelný kontakt s návštěvníky a denní péči ošetřovatelů. Odchycení a fixaci jedinců prováděli ošetřovatelé.

Odběr a zpracování vzorků

Odběr vzorku slin byl proveden při fixaci zvířete před a po veterinárním ošetření. Odchyty byly provedeny v ohradě za přítomnosti dalších jedinců ze stáda, vizuální kontakt byl po celou dobu vyšetření zachován. Veterinární ošetření zahrnovalo zhodnocení celkového stavu, aplikaci vitamínu A (Bioveta, Ivanovice na Hané, Česká republika) a odběr vzorku trusu z rekta. Ke sběru vzorku slin byla využita sada Salivette (Sarstedt, Nümbrecht Německo). Sliny byly odebrány po vložení vatového tamponu uchyceného v peanu do tlamy zvířete, které jej žvýkalo po dobu 60 - 90 s.

Odběrové sady Salivette se vzorky byly v laboratoři centrifugovány (6000 ot. / 15 min při 21 °C). Získané vzorky slin byly uloženy do zkumavek Eppendorf a zmraženy na teplotu -80 °C. K detekci kortizolu ve slinách byl použit komerční kit Cortisol Express Elisa Kit (Cayman Chemical, USA). Detekční rozsah kitu byl 39,1–5 000 pg/ml. Hodnocení bylo provedeno na kalorimetrickém snímači při vlnové délce 420 nm a výsledky byly zjištěny pomocí tabulkového procesoru od výrobce kitu (Cayman Chemical, USA).

Statistické vyhodnocení

Statistické zpracování výsledků bylo provedeno pomocí statistického softwaru UNISTAT pro Excel verze 6.5 (Unistat Ltd., London, UK). Hodnoty slinného kortizolu u alpak před a po vyšetření byly porovnány pomocí párového Studentova t- testu. Rozdíly $p < 0,05$ byly stanoveny jako statisticky významné.

Výsledky

Tabulka č. 1 uvádí hodnoty koncentrace kortizolu ve slinách alpak před a po vyšetření veterinárním lékařem, injekční aplikaci vitamínu a odběru vzorku trusu z rekta.

Tabulka č. 1. Koncentrace kortizolu ve slinách (pg/ml) alpak před a po veterinární prohlídce

Alpaky n = 8	Koncentrace kortizolu ve slinách (pg/ml)	
	Před vyšetřením	Po vyšetření
samec 1	4 537,77	6 590,99
samec 2	3 616,85	3 456,25
samec 3	4 376,58	4 069,09
samec 4	3 431,69	3 939,39
samice 1	2 910,83	3 931,38
samice 2	-	4 677,70
samice 3	3 216,69	2 703,58

samice 4	4 667,57	3 148,40
průměr	3 822,57^a	4 064,60^a

^a Stejně indexy v řádku indikují statistickou nevýznamnost ($p > 0,05$)

Ačkoli koncentrace se mezi sebou liší mezi samci i samicemi a mezi koncentracemi před a po veterinární prohlídce, žádná z těchto změn ani průměr všech hodnot nebyly statisticky významné ($p > 0,05$). V případě samice 2 byl první z odebraných vzorků kontaminován a nebylo možné jej laboratorně vyhodnotit.

Diskuze

Metoda odběru slin v posledních letech získává na popularitě díky svému neinvazivnímu odběru vzorku a relativně snadnému a rychlému laboratornímu vyhodnocení, stejně jako možnost sliny po určitou dobu skladovat při nízkých teplotách ($- 80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Proto se tato metoda využívá u mnoha dalších druhů a v různých situacích, nicméně studie, která by hodnotila kortizol ve slinách u alpak v souvislosti s veterinárním vyšetřením, a poskytovala by hodnoty vhodné k porovnání, není autorům známa. Ovšem například autoři Prágai and Kovács (2020) se zaměřili na porovnání hodnot slinného kortizolu před, během a po stříhání vlny u alpak. Hodnoty zjištěné den před stříháním u alpak ustájených přes noc ve stáji byly od 0,6 - 3,81 nmol/l (tj. 217 - 1 381 pg/ml). Hodnoty zjištěné v naší studii před vyšetřením jsou vyšší než hodnoty zjištěné v této studii, ovšem jak vyplývá ze studie Raggi et al. (1994), hladina kortizolu u alpak je v ranních hodinách vyšší než ve večerních hodinách, tedy denní doba může ovlivnit absolutní hodnoty zjištěné ve vzorcích. Hodnoty zjištěné 30 minut před stříháním ve studii Prágai and Kovács (2020), kdy alpaky již byly fixovány, byly naměřeny v rozmezí 0,88 - 54,94 nmol/l (tj. 319 - 19 915 pg/ml), přičemž většina hodnot byla do 6,32 nmol/l (tj. 2 291 pg/ml). I tyto výchozí hodnoty jsou nižší než výsledky naší studie. Hodnoty u vzorků odebraných během stříhání se dále zvyšovaly v průběhu manipulace s jednotlivými zvířaty (Prágai and Kovács, 2020).

Hodnocením kortizolu ze slin během fixace alpak se zabývali i Wittek et al. (2017). Alpaky byly fixované po dobu 15 min buď ve stoje, vleže nebo ležící na stole. Odběr slin byl proveden v čase 0 a poté za 20, 40 a 60 minut. U všech skupin bylo zjevné zvýšení koncentrace po 20 a 40 minutách. V naší studii byla zvířata fixována ve stoje, ale druhý odběr byl proveden cca 10 minut po prvním odběru, což může být krátká doba k projevu výraznějších změn. Podle Majchrzak et al. (2015), kteří sledovali využití slinného kortizolu u dromedárů, je slinný kortizol vhodným indikátorem zejména při krátkodobých reakcích na stres. V této studii autoři sledovali stresovou zátěž v obdobích, kdy jsou dromedáři využíváni k jízdám o různé četnosti s obdobími mimo turistickou sezonu. Hodnoty slinného kortizolu byly v rozmezí 600 – 2 500 pg/ml. Nižší hodnoty z uvedeného rozmezí byly zjištěny v období turistické sezony, ve které jsou dromedáři využíváni k projížďkám. Taková srovnání mohou být velmi užitečná při hodnocení welfare zvířat v souvislosti s jejich komerčním využitím. Tyto hodnoty jsou výrazně nižší než zjištěné výsledky v naší studii, což může být dáno tím, že se jedná o jiný druh nebo z toho důvodu, že v případě alpak předcházelo vyšetření odchyt jedince ze stáda. Abychom omezili stres z odchytu a vyšetření, alpaky byly odchyceny a vyšetřovány v ohradě, ve které jsou celoročně ustájeny a za přítomnosti dalších alpak. Alpaky v tomto chovu jsou od prvních dní navykány na lidský kontakt, manipulaci, na pohyb neznámých lidí a se zvířaty bylo zacházeno šetrně. Je zřejmé, že u

alpak mají velký význam také zjištěné vysoké rozdíly mezi jednotlivými zvířaty v hodnotách kortizolu (Wittlek et al., 2017), což výsledky koncentrace kortizolu ve slinách rovněž potvrzují.

Ačkoli se v případě odběru slin jedná o neinvazivní odběr vzorku, i přes to zvířata musí být nejdříve odchycena a zafixována, což může být přímou příčinou zvýšení koncentrace kortizolu ve slinách, ovšem zatím nejsou u alpak studie, které by uváděly, za jak dlouhý čas se zvýšení kortizolu ve slinách projeví. Z tohoto důvodu se i koncentrace před veterinárním vyšetřením mohou považovat za hodnoty u jedinců při zvýšeném stresu právě z fixace, navíc zvířata zažívala odběr slin, a tedy neznámou situaci, poprvé v životě. Stresu, který může být vyvolán odběrem slin, se však dá předejít navyknutím zvířat na pravidelný odběr slin, který zahrnuje pouze krátkodobé žvýkání vatového tamponu.

Z našich výsledků se dá vyvodit, že samotné veterinární vyšetření již další nárůst slinného kortizolu nemusí způsobit. Studie zaměřující se na monitoring stresové zátěže v průběhu veterinárního vyšetření u alpak nebyly provedeny. Byla nalezena studie, zaměřující se na vliv různých úkonů u dojného skotu. Při hodnocení úkonů jako je umělá inseminace, embryotransfer, přirozená plemenitba a ošetření kopyt byly zjištěny statisticky významné rozdíly v hladině plasmatického kortizolu u experimentální a kontrolní skupiny. Naopak nebyly zjištěny významné změny plasmatického kortizolu při simulaci základního všeobecného klinického vyšetření ani při provedení transrektálního sonografického vyšetření (Koenneker et al., 2023). Tyto studie by byly velmi užitečné ke srovnání také v případě alpak a jejich další vyhodnocení mohou přinést data o tom, jaké metody v rámci chovatelských zásahů jsou u alpak nejšetrnější a jaký vliv může mít návyk na stresové situace.

Závěr

Odběr slin a stanovení parametrů, například kortizolu, je neinvazivní a spolehlivou metodou pro stanovení akutní stresové reakce u mnoha druhů zvířat včetně alpak. Při manipulaci však již mohou být zjištěny vyšší hodnoty kortizolu v závislosti na manipulaci se zvířaty nebo pozorování ostatních zvířat v této situaci, zejména u druhu natolik citlivého na stres, jako jsou alpaky. Pro další výsledky je třeba zvířata přivyknout odběru vzorku slin tak, aby nedošlo k ovlivnění sledovaných parametrů, a mohla se tato metoda využít v mnoha situacích, kdy je potřeba stanovit působení různých faktorů, včetně chovatelských zásahů, a jejich vliv na alpaky v zájmových chovech.

Tato práce byla financována ITA VETUNI (projekt č. 2024ITA26).

Literatura

- Castilla-Castaño, E., Herman, N., Martinelli, E., Lecru, L.A., Pressanti, C., Schelcher, F., Cadiergues, M.C. 2021. Treatment of sarcoptic and chorioptic mange in an alpaca (*Vicugna pacos*) herd with a combination of topical amitraz and subcutaneous ivermectin. *New Zealand Veterinary Journal* 69: 121-126.
- Cook, N.J. 2012. Review: Minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals. *Canadian Journal of Animal Science* 92: 227-259.

- Fan, R., Gu, Z., Guang, X., Marín, J.C., Varas, V., González, B.A., Dong, C. 2020. Genomic analysis of the domestication and post-Spanish conquest evolution of the llama and alpaca. *Genome biology* 21: 1-26.
- Fell, L.R., Shutt, D.A., Bentley, C.J. 1985. Development of a salivary cortisol method for detecting changes in plasma “free” cortisol arising from acute stress in sheep. *Australian Veterinary Journal* 62: 403-406.
- Gerken, M. 2010. Relationships between integumental characteristics and thermoregulation in South American camelids. *Animal* 4: 1451-1459.
- Goñalons, G.L.M. 2008. Camelids in ancient Andean societies: A review of the zooarchaeological evidence. *Quaternary International* 185: 59-68.
- Koenneker, K., Schulze, M., Pieper, L., Jung, M., Schmicke, M., Beyer, F. 2023. Comparative assessment of the stress response of cattle to common dairy management practices. *Animals* 13: 2115.
- Marketon, J.I.W., Glaser, R. 2008. Stress hormones and immune function. *Cellular immunology* 252: 16-26.
- McGregor, B.A. 2006. Production, attributes and relative value of alpaca fleeces in southern Australia and implications for industry development. *Small Ruminant Research* 61: 93-111.
- McMullen, C. 2008. Romancing the alpaca: Passionate consumption, collection, and companionship. *Journal of Business Research* 61: 502-508.
- Möstl, E., Palme, R. 2002. Hormones as indicators of stress. *Domestic animal endocrinology* 23: 67-74.
- Navarre, C.B., Heath, A.M., Wenzel, J., Simpkins, A., Blair, E., Belknap, E., Pugh, D.G. 2001. A comparison of physical examination and clinicopathologic parameters between sheared and nonshered alpacas (*Lama pacos*). *Small Ruminant Research* 39: 11-17.
- Norton, P.L., Gold, J.R., Russell, K.E., Schulz, K.L., Porter, B.F. 2014. Camelid heat stress: 15 cases (2003–2011). *The Canadian Veterinary Journal* 55: 992.
- Pollard, J.C., Littlejohn, R.P. 1995. Effects of social isolation and restraint on heart rate and behaviour of alpacas. *Applied Animal Behaviour Science* 45: 165-174.
- Prágai, A., Kovács, A. 2020. Stress of alpacas caused by shearing in Hungary. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 26: 207-212.
- Raggi, L.A., Crossley, J., Coppia, S., Ferrando, G. 1994. Características fisiológicas de la alpaca (*Lama pacos*) sometida a manejo extensivo en el altiplano chileno. *Archivos de zootecnia* 43: 201-206.
- Sheriff, M.J., Dantzer, B., Delehanty, B., Palme, R., Boonstra, R. 2011. Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* 166: 869-887.
- Tynes, V.V. 2010. *Behavior of exotic pets*. Wiley-Blackwell Publishing. Chichester, West Sussex.
- Van Saun, R.J. 2006. Nutritional diseases of South American camelids. *Small Ruminant Research* 61: 153-164.
- Van Saun, R.J., Herdt, T. 2013. Nutritional Requirements. In: Cebra, Ch., Anderson, D.E., Tibary A., Van Saun, R.J., Johnson, L.W. *Llama and Alpaca Care: Medicine, Surgery, Reproduction, Nutrition, and Herd care*. St. Louis: Elsevier.

- Waiblinger, S., Hajek, F., Lambacher, B., Wittek, T. 2020. Effects of the method of restraint for shearing on behaviour and heart rate variability in alpacas. *Applied Animal Behaviour Science* 223: 104918.
- Wheeler, J.C. 2012. South American camelids-past, present and future. *Journal of Camelid Science* 5: 1-24.
- Whitehead, C. 2013. Diseases in camelids 1. Common presentations. *In Practice* 35: 317-324.
- Wittek, T., Salaberger, T., Palme, R., Becker, S., Hajek, F., Lambacher, B., Waiblinger, S. 2017. Clinical parameters and adrenocortical activity to assess stress responses of alpacas using different methods of restraint either alone or with shearing. *Veterinary Record* 180: 568-568.
- Majchrzak Y.N., Mastromonaco, G.F., Korver, W.B.G. 2015. Use of salivary cortisol to evaluate the influence of rides in dromedary camels. *General and Comparative Endocrinology* 211: 123-130.
- Kapustka, J., Garbiec, A. 2022. Alpacas in Poland: health, welfare, and anti-parasitic prophylaxis. *Medycyna Weterynaryjna* 78: 68-73.
- Duncanson, G.R. 2012. Nutritional and metabolic diseases. In: Duncanson G.R. *Veterinary treatment of llamas and Alpacas*. Wallingford: CABI.

Cíl 7: Stanovení referenčních rozmezí poměru proteinu ke kreatininu v moči pro hodnocení zdravotního stavu a pohody koní

STANOVENÍ REFERENČNÍCH ROZMEZÍ POMĚRU PROTEINU KE KREATININU V MOČI PRO HODNOCENÍ ZDRAVOTNÍHO STAVU KONÍ

Simona Kovaříková, Jana Blahová

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

Abstrakt

Stanovení poměru proteinu ke kreatininu v moči (UPC, urine protein to creatinine ratio) je standardním krokem při hodnocení proteinurie u psů a koček. U koní však nemáme o tomto parametru dostatek informací. Cílem této práce bylo vytvořit referenční rozmezí UPC u klinicky zdravých koní a posoudit vliv věku a pohlaví. Během studie bylo odebráno celkem 126 vzorků moči, vstupní kritéria pak splnilo 93 vzorků, vzorky byly následně rozděleny do skupin podle věku koní. U hříbat mladších 0,5 roku byla zjištěna statisticky významně nižší ($p < 0,05$) koncentrace kreatininu a statisticky významně vyšší ($p < 0,05$) hodnota UPC ve srovnání s ostatními skupinami koní starších než půl roku. Nebyl zjištěn vliv pohlaví na UPC koní. Pro koně starší půl roku bylo stanoveno referenční rozmezí pro UPC 0,02–0,22. Využitelnost tohoto rozmezí v klinické praxi musí ověřit stanovování UPC u koní s různými zdravotními problémy.

Úvod

Ledviny hrají esenciální roli v udržování vody, elektrolytů a acidobazické rovnováhy. Odpovídají také za vylučování zplodin metabolismu a produkci a modifikaci některých hormonů. Zhoršení činnosti ledvin tak má za následek i vznik systémových klinických příznaků. Činnost ledvin může být hodnocena prostřednictvím různých markerů stanovovaných ve vzorcích krve a moči (Gratwick, 2021). Jedním ze sledovaných parametrů je množství proteinu v moči, které pomáhá při posuzování stavu a funkce glomerulární membrány. K měření proteinu je možné využít různé metody. Použití diagnostických proužků je velmi jednoduché a rychlé, nicméně vzhledem k fyziologicky alkalické moči koní a přítomnosti mukoproteinů jsou výsledky často falešně pozitivní (Hekmatynia et al., 2019). Další možností může být stanovení poměru proteinu ke kreatininu v moči (UPC, urine protein to creatinine ratio, UPC), které se běžně používá u psů a koček. U koní jsou ale na rozdíl od psů a koček informace o tomto parametru velmi kusé. Uberti et al. (2009) stanovili fyziologické rozmezí pro UPC u koní. Vyšetření ale bylo provedeno na velmi malé skupině koní pouze jednoho pohlaví. Poměr proteinu ke kreatininu v moči byl stanovován i v dalších studiích, kde byla sledována činnost ledvin u koní s kolikou nebo akutním poškozením ledvin. V těchto případech ale byly výsledky srovnávány pouze s kontrolní skupinou a ne s platným referenčním rozmezím (Arosalo et al., 2007, Siwinska et al., 2021). Vzhledem k tomu, že při onemocnění ledvin je nezbytná včasná diagnostika, je nutné znát i fyziologická rozmezí parametrů užívaných k hodnocení renálních funkcí, a to i pro různé kategorie koní (dle věku a pohlaví) pro možnost porovnání s výsledky pacientů. Cílem této práce je vytvoření

referenčního rozmezí poměru proteinu ke kreatininu v moči zdravých koní a posouzení vlivu věku a pohlaví na tento parametr. Druhým cílem bylo srovnání turbidimetrické a kolorimetrické metody stanovení koncentrace proteinu v moči případného vlivu na hodnotu UPC.

Materiál a metodika

Pro účely studie byly pomocí spontánní mikce získávány vzorky moči od klinicky zdravých koní. O dobrém zdravotním stavu bylo rozhodnuto na základě anamnézy poskytnuté majitelem a krátkého klinického posouzení zvířete. Koně, od kterých byl získán vzorek moči, byli prostí medikace s výjimkou prevence (odčervení) po dobu minimálně 3 měsíců.

Bezprostředně po odběru vzorku bylo provedeno základní vyšetření fyzikálních a chemických vlastností, vzorek byl následně zchlazen a do 24 hodin po odběru bylo provedeno mikroskopické vyšetření vzorku. Toto základní vyšetření moči sloužilo pro potvrzení dobrého zdravotního stavu koní, vzorky s abnormálním nálezem byly ze studie vyřazeny. Po odstředění byl uchován supernatant vzorku. Vzorky byly zamrazeny při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ maximálně po dobu 1 měsíce a pak byly podrobeny vyšetření.

Makroskopickým posouzením byla zaznamenána barva vzorku a přítomnost zákalu. Míra přítomného zákalu byla hodnocena pomocí tzv. čtecí zkoušky: za průhlednou zkumavku obsahující vzorek byl umístěn text a byla zjišťována čitelnost tohoto textu. Vzorek byl zcela průhledný bez přítomného zákalu, neovlivňoval čitelnost textu, nebo s mírným zákalem, kdy byla čitelná všechna písmena, nebo byl přítomen zákal střední intenzity, kdy byla čitelná pouze velká písmena a nebo se jednalo o vzorky s výrazným zákalem, který zcela znemožnil čitelnost textu.

Následně byla měřena specifická hmotnost vzorku s využitím ručního refraktometru (RUR5-ATC, Bellingham + Stanley). Základní chemické vlastnosti byly zjišťovány pomocí diagnostických proužků HeptaPHAN (Erba Lachema, Česká republika). Po nanesení vzorku moči na reakční plošky byla podle návodu výrobce srovnána barevná změna s dodanou stupnicí. Byly zaznamenány hodnoty pH, přítomnost bílkoviny, glukózy, ketolátek, bilirubinu a krve.

Pro mikroskopické vyšetření moči byl vzorek odstředěn při 3000 otáčkách za minutu po dobu 3 minut, přibližně 9/10 supernatantu bylo odpipetováno do zkumavky typu Eppendorf a zmrazeno pro další analýzu. Sediment pak byl rozmíchán ve zbylém supernatantu, přenesen do destičky na vyšetření moči (Vetriplast, Vacutest Kima, Itálie) a následně zhodnocen při malém a velkém zvětšení (100x, 400x). Vzorky, které byly výrazně zakalené, byly vyšetřovány i neodstředěné. Zaznamenána byla případná přítomnost buněk (erytrocytů, leukocytů, epitelii), krystalů, mikroorganismů a dalších příměsí moči.

Po rozmražení byl supernatant znovu odstředěn (3000 ot./min, 3 minuty) pro odstranění případných precipitovaných krystalů a pro analýzu byl použit pouze supernatant. Pro zjištění koncentrace proteinu a kreatininu v moči byl využit biochemický analyzátor Konelab 20i (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a komerční kity Urine/CSF Protein (Abbott GmbH, Wiesbaden, Německo) a Kreatinin (Biovendor, Brno, Česká republika). Před měřením koncentrace kreatininu byl vzorek moči naředěn (50 μl moči + 2450 μl ultračisté vody). Následně byl spočítán poměr proteinu ke kreatininu v moči. Prvním krokem byl převod výsledků na stejné jednotky požadované vzorcem (mg/dl). Koncentrace proteinu vyjádřená v mg/l byla dělena 10, koncentrace kreatininu vyjádřená v mmol/l byla násobena faktorem 11,3. Výsledkem výpočtu je bezjednotkové číslo.

Statistické zpracování dat bylo provedeno v programu Unistat for Excel 6.5. V první fázi hodnocení byl sledován vliv věku, kdy data byla rozdělena do pěti věkových kategorií (hříbata do půl roku, mladí koně ve věku 0,5 až 4 roky, dále koně ve věku 5 až 10 let, 11 až 17 let a staří koně ve věku 18 let a více). Nejprve bylo provedeno testování normality s využitím Shapiro-Wilkova testu. Protože nebyla splněna podmínka normality, bylo pro další testování využito neparametrického testu Kruskal-Wallis ANOVA a pro zjištění konkrétních rozdílů mezi testovaným skupinami bylo použito mnohonásobné porovnání pro t-rozdělení. V druhé fázi hodnocení byl sledován vliv pohlaví. Vzhledem k tomu, že při statistické analýze byly zjištěny u nejmladší skupiny testovaných zvířat (hříbata do 0,5 roku) statisticky významné rozdíly u většiny sledovaných parametrů v porovnání se skupinami starších jedinců, byl vliv pohlaví sledován samostatně u skupiny hříbat do 0,5 roku a pak u zbylých jedinců, mezi kterými rozdíly v analyzovaných parametrech prokázány nebyly. Jelikož data opět nevykazovala normální rozdělení, bylo pro zjištění rozdílů mezi pohlavími využito neparametrického Mann-Whitneyova testu. Z výsledků UPC u koní starších 0,5 roku byla dále zjištěna hodnota referenčního rozmezí. Pro výpočet referenčního rozmezí byla využita aplikace Reference Value Advisor, která pracuje v prostředí tabulkového procesoru Microsoft Excel (Geffre et al. 2011). Testování bylo provedeno na hladině významnosti $p < 0,05$.

V druhé části studie byly porovnávány dvě metody měření koncentrace proteinu v moči a jejich vliv na výslednou hodnotu UPC - metoda turbidimetrická a kolorimetrická. Kromě výše uvedeného postupu byla koncentrace proteinu v moči měřena také pomocí komerčního kitu Total protein - urine, liquor (Biovendor, Brno, Česká republika). I tyto hodnoty pak byly dosazeny do vzorce pro výpočet UPC. Výsledky získané s využitím kitu firmy Abbott byly označeny UPC-A (turbidimetrická metoda), výsledky získané s využitím kitu firmy Biovendor byly označeny UPC-B (kolorimetrická metoda). Normalita dat byla testována pomocí testu Kolmogorov-Smirnov. Srovnání obou metod měření koncentrace proteinu v moči pak proběhlo dle Bland-Altmana a metodou neparametrické regrese Passing-Bablok. Výsledky, které byly pod limitem detekce, nebyly do statistického hodnocení zařazeny.

Výsledky

Během studie bylo získáno celkem 126 vzorků moči klinicky zdravých koní. Po základním vyšetření moči bylo z dalšího vyšetření vyloučeno celkem 33 vzorků kvůli pozitivní reakci na přítomnost krve na diagnostickém proužku ($n=16$), nález leukocytů v počtu vyšším než 5 na zorné pole při velkém zvětšení ($n=9$), malému množství vzorku ($n=5$), nekompletním datům (2) a stopové pozitivní reakci na přítomnost glukózy ($n=1$). Následné stanovení poměru proteinu a kreatininu tak bylo provedeno u 93 vzorků koní.

Vzorky pocházely od koní různých plemen ve věku od 1 měsíce po 24 let, jednalo se o 55 samic a 38 samců. Bližší charakteristika je uvedena v tabulce 1, plemena zastoupená ve studii jsou uvedena v tabulce 2.

Tabulka č. 1. Charakteristika koní a jejich rozdělení do skupin podle věku

Věkové kategorie					
Věk	do 0,5 roku	0,5–4 roky	5–10 let	11–17 let	18 a více let

Počet koní	10	10	25	30	18
Samice	4	7	19	20	5
Samci	6	3	6	10	13

Tabulka č. 2. Plemena koní zastoupená ve studii

Plemeno	Počet koní
Český teplokrevník	45
Starokladrubský kůň	17
Anglický plnokrevník	11
Hafling	8
Slovenský teplokrevník	4
Shetlandský pony	2
Arabský plnokrevník	1
Welsh pony	1
Slezský norik	1
Holandský teplokrevník	1
Irský cob	1
Český sportovní pony	1

Mezi sledovanými skupinami koní nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly ($p > 0,05$) v koncentraci proteinu v moči. U hříbat do věku 0,5 roku byla zaznamenána statisticky významně ($p < 0,05$) nižší koncentrace kreatininu a vyšší hodnota UPC ve srovnání s ostatní skupinami starších koní. Podrobné výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Vzhledem k rozdílům v koncentraci kreatininu v moči a hodnotám UPC mezi hříbaty do 0,5 roku věku a staršími koňmi, byla při hodnocení vlivu pohlaví na UPC hodnocena zvlášť hříbata a zvlášť starší koně. V žádném z porovnání nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly ($p > 0,05$). Hodnoty jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka č. 3. Koncentrace proteinu a kreatininu v moči a vypočtená hodnota UPC (poměr proteinu ke kreatininu v moči) v jednotlivých skupinách koní dle věku

Věkové kategorie

Věk (roky)	do 0,5	0,5–4	5–10	11–17	18 a více
Počet koní	10	10	25	30	18
Protein v moči (mg/l)					
<i>průměr</i>	308,7	167,0	201,2	214,0	193,8
<i>medián</i>	142,4	123,0	154,6	209,0	203,9
<i>směrodatná odchylka</i>	273,2	112,6	141,7	194,0	121,0
<i>minimum</i>	89,7	79,5	< 68	< 68	< 68
<i>maximum</i>	860,1	459,4	600,8	886,5	462,5
Kreatinin v moči (mmol/l)					
<i>průměr</i>	9,4	19,2	22,4	21,0	20,6
<i>medián</i>	5,8	19,0	21,7	20,7	19,0
<i>směrodatná odchylka</i>	7,9	6,2	8,6	12,7	9,7
<i>minimum</i>	2,6	5,4	8,0	2,1	5,1
<i>maximum</i>	25,0	26,1	37,0	57,3	44,1
UPC					
<i>průměr</i>	0,285	0,084	0,079	0,094	0,089
<i>medián</i>	0,272	0,065	0,080	0,094	0,072
<i>směrodatná odchylka</i>	0,096	0,055	0,038	0,055	0,054
<i>minimum</i>	0,155	0,036	0,014	0,016	0,015
<i>maximum</i>	0,460	0,206	0,150	0,265	0,217

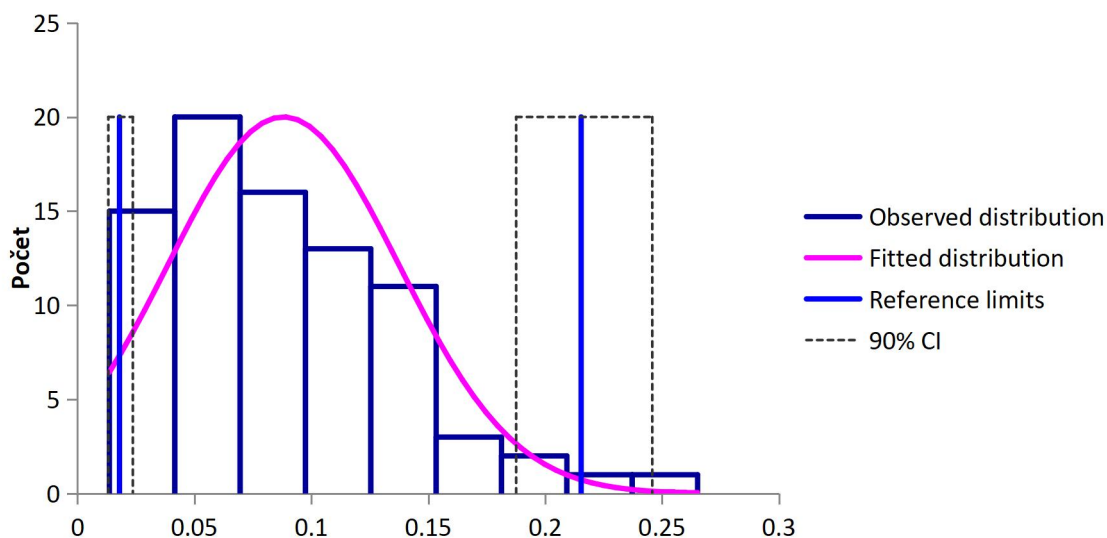
Tabulka č. 4. Koncentrace proteinu a kreatininu v moči a vypočtená hodnota UPC (poměr proteinu ke kreatininu v moči) u samců a samic hříbat a starších koní

	Hříbata do 0,5 roku		Koně starší 0,5 roku	
	Samci	Samice	Samci	Samice
Protein v moči (mg/l)				
<i>průměr</i>	375,6	208,3	237,2	208,8
<i>medián</i>	311,5	142,4	190,7	164,6
<i>směrodatná odchylka</i>	322,3	168,8	171,9	136,7
<i>minimum</i>	89,7	92,0	<68	<68

<i>maximum</i>	860,1	458,8	886,5	648,7
Kreatinin v moči (mmol/l)				
<i>průměr</i>	10,1	8,5	22,9	19,9
<i>medián</i>	8,8	4,6	20,3	19,7
<i>směrodatná odchylka</i>	8,2	8,7	12,1	8,7
<i>minimum</i>	2,6	3,4	3,5	2,1
<i>maximum</i>	25,0	21,4	57,3	52,8
UPC				
<i>průměr</i>	0,311	0,248	0,087	0,088
<i>medián</i>	0,323	0,238	0,084	0,079
<i>směrodatná odchylka</i>	0,112	0,056	0,040	0,055
<i>minimum</i>	0,154	0,190	0,031	0,014
<i>maximum</i>	0,460	0,325	0,185	0,265

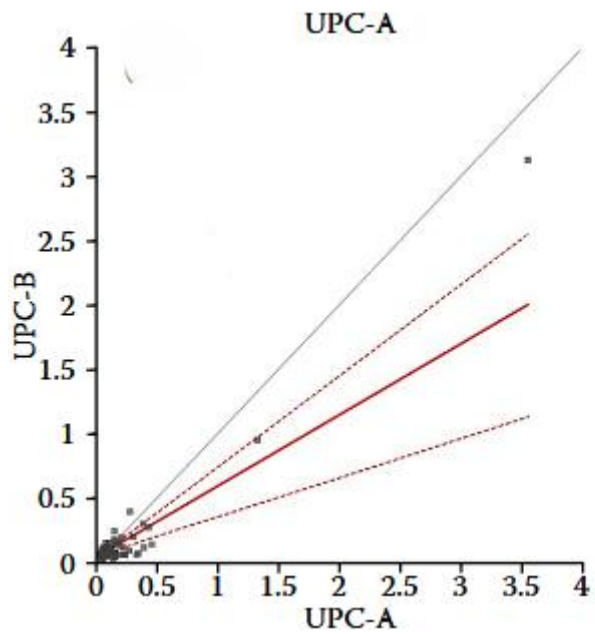
Vzhledem k rozdílům mezi hříbaty mladšími 0,5 roku a staršími koňmi, bylo referenční rozmezí stanovované pouze pro skupinu koní starších 0,5 roku a pro ně činí 0,02–0,22 (obr. 1).

Obrázek č. 1. Distribuce hodnot UPC a stanovení referenčního rozmezí pro klinicky zdravé koně starší 0,5 roku

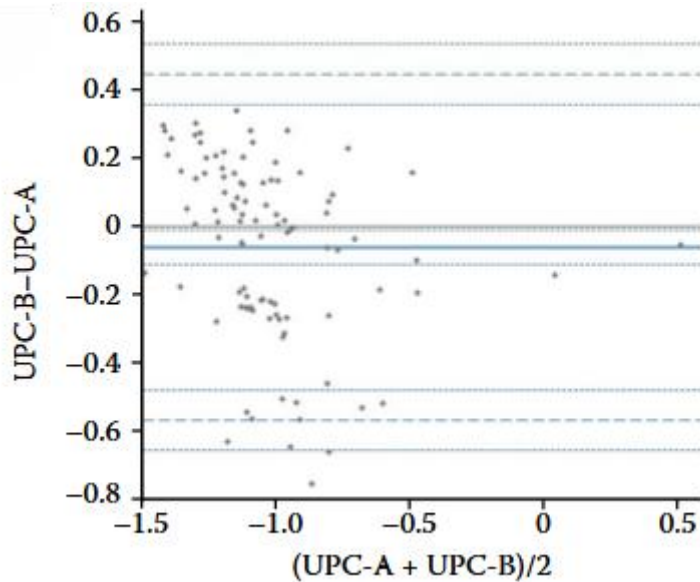


Do druhé části studie bylo zařazeno celkem 100 vzorků moči od koní různého věku a pohlaví. Statistické analýzy odhalily statisticky významnou konstantní a proporcionální odchylku mezi metodami určenými pro stanovení koncentrace proteinu v moči (obr. 2,3).

Obrázek č. 2. Srovnání turbidimetrické metody (UPC-A) a kolorimetrické metody (UPC-B) pomocí Passing-Bablock regrese. Červená linie označuje Passing Bablock shodu, šedá linie nejlepší shodu tečkované linie znamenají 95% konfidenční interval.



Obrázek č. 3. Srovnání turbidimetrické metody (UPC-A) a kolorimetrické metody (UPC-B) metodou Bland-Altman. Modrá linie je průměrem rozdílů UPC-B - UPC-A, šedá linie označuje rovnost, modrá tečkovaná linie pak limity shody a modrá čárkovaná linie označuje 95% konfidenční interval.



Diskuze

Stanovení poměru proteinu ke kreatininu v moči je již standardním a rutinně používaným nástrojem při hodnocení činnosti ledvin u psů a koček (Lees et al., 2005). Informace o zjišťování a kvantifikaci proteinurie u dalších živočišných druhů jsou poměrně kusé. Máme k dispozici referenční rozmezí pro morčata (Kovaříková et al., 2025), informace o UPC u králíků (Reusch et al., 2009), krav (Herman et al., 2019), nicméně informací o UPC u koní je poměrně málo.

Během této studie bylo spontánní mikcí získáno celkem 126 vzorků moči od klinicky zdravých koní, u kterých bylo provedeno základní zhodnocení fyzikálních a chemických vlastností a mikroskopické posouzení vzorku. Spontánní mikce představuje u koní nejjednodušší způsob získání vzorku moči, který je neinvazivní a není riziko poranění močového ústrojí koně. U psů, koček i morčat je spontánní mikce běžně používanou metodou pro odběr moči a následné zjištění UPC (Beatrice et al., 2010; Mortier et al., 2023; Kovaříková et al., in press). Z celkového počtu 126 odebraných vzorků moči bylo celkem 33 vzorků z další analýzy vyloučeno. U 16 vzorků to bylo z důvodu pozitivní reakce na přítomnost krve na diagnostickém proužku, v 9 vzorcích byly při mikroskopickém vyšetření nalezeny leukocyty v počtu vyšším, než 5 na zorné pole při velkém zvětšení. Hematurie (erythrocyturie i hemoglobinurie) a pyurie mohou ovlivňovat výsledek UPC u psů a koček (Vientós-Plotts et al., 2018; Jillings et al., 2019). Podle Jillings et al. (2019) vedl přídavek krve ke vzorku moči ke zvýšení UPC, nicméně žádný vzorek s mikroskopickou hematurií neměl UPC vyšší než 0,5. Mikroskopická hematurie byla v tomto případě definována jako makroskopicky žlutá moč. Pokud už došlo ke změně barvy moči (broskvová barva, oranžovo červená barva), v téměř jedné pětině případů došlo ke zvýšení UPC nad hodnotu 0,5. Vzorky s makroskopickou hematurií měly téměř ve ¾ případů UPC vyšší než 0,5. Jakmile se tedy barva moči psů neodchyluje od žluté barvy, je výsledek UPC relevantní. U koní tento závěr nemůžeme následovat, neboť barva moči koní fyziologicky kolísá od žluté, přes

běžovou až po hnědou. Z toho důvodu jsme do laboratorní analýzy vůbec nezařazovali vzorky, kde byla zjištěna pozitivní reakce na přítomnost krve.

Vliv na hodnotu UPC může mít i přítomnost bílých krvinek, z toho důvodu se pro stanovení referenčních rozmezí používají vzorky moči, kde se vyskytuje maximálně 5 leukocytů v zorném poli při velkém zvětšení (400x) (Meindl et al. 2019).

Vyřadili jsme i vzorky se stopovou pozitivní reakcí na přítomnost glukózy. Za normálních okolností se glukóza v krvi nevyskytuje, neboť je po filtraci glomerulární membránou kompletně reabsorbovaná v tubulech. Glykosurie pak může být hyperglykemická nebo normoglykemická. Nejčastější příčinou hyperglykemické glykosurie je diabetes mellitus nebo hyperadrenokorticismus. V obou případech se jedná o stavy, které jsou spojené s proteinurií (Mazzi et al., 2008; Herring et al., 2014).

Výsledky této studie ukázaly signifikantně ($p < 0,05$) vyšší UPC u hříbat mladších 0,5 roku. Tento výsledek je s největší pravděpodobností způsoben signifikantně nižší koncentrací kreatininu v moči u této věkové kategorie. Kreatinin je produktem svalového metabolismu, takže jeho množství v krvi a následně množství v moči odpovídá množství svalové hmoty, které je u mláďat nižší. Obdobné výsledky byly zjištěny i u mláďat morčat (Kovarikova et al., 2025).

V této studii nebyly zjištěny signifikantní ($p > 0,05$) rozdíly v UPC mezi samci a samicemi, a to ani u hříbat do věku 0,5 roku, ani u koní starších půl roku. Tyto výsledky jsou také v souladu s výsledky získanými u morčat (Kovarikova et al., 2025).

Stanovení UPC je relevantním způsobem hodnocení proteinurie u koní a dobře koreluje s množstvím proteinu vyloučeným močí za 24 hodin (Uberti et al. 2009). V této studii bylo také navrženo předběžné referenční rozmezí, které pro je koně 0,063–0,473 a pro pony 0,056–0,200. Výzkum byl ale prováděn na velmi malé skupině jedinců (11 koní a 6 pony) a jednalo se pouze o samice. Výsledky naší studie jsou srovnatelné a opřené o větší počet vzorků.

Hodnoty UPC se u koní zvyšují v důsledku laminitidy, nicméně v této studii nebyly výsledky srovnávány s referenčním rozmezím, ale v rámci opakovaných vyšetření vzorků odebraných v průběhu onemocnění (Uberti et al., 2010). Vyšší hodnoty UPC oproti kontrolní skupině byly zaznamenány i u koní s kolikou a koní s akutním poškozením ledvin (Arosalo, et al., 2007; Siwinska et al., 2021). Poměr proteinu ke kreatininu byl také hodnocen ve studii sledující vliv podávání hydroxyethylškrobu na parametry ledvin, zde byly srovnávány výsledky UPC před aplikací a po ní (Gratwick et al., 2017).

Při srovnání turbidimetrické a kolorimetrické metody stanovení proteinu v moči byly zjištěny signifikantní rozdíly mezi oběma metodami. Na základě této studie nemůžeme rozhodnout, která z metod je přesnější. Při opakovaných vyšetřeních pro sledování trendů je tak vhodné používat stejnou metodu.

Závěr

Vyšetřením vzorků poměrně velké skupiny klinicky zdravých koní bylo zjištěno, že poměr proteinu ke kreatininu v moči je u koní ovlivňován věkem, ale ne pohlavím. Námi navržené referenční rozmezí pro koně starší 0,5 roku je 0,02–0,22. V rámci ověření klinické využitelnosti tohoto rozmezí by bylo vhodné věnovat se stanovení UPC u pacientů s chorobami, u kterých víme, že u jiných živočišných druhů způsobují proteinurii.

Literatura

- Arosalo, B.M., Raekallio, M., Rajamäki, M., Holopainen, E., Kastevaara, T., Salonen, H., Sankari, S. 2007. Detecting early kidney damage in horses with colic by measuring matrix metalloproteinase - 9 and -2, other enzymes, urinary glucose and total proteins. *Acta Veterinaria Scandinavica* 49: 4.
- Beatrice, L., Nizi, F., Callegari, D., Paltrinieri, S., Zini, E., D'Ippolito, P., Zatelli, A. 2010. Comparison of urine protein-to-creatinine ratio in urine samples collected by cystocentesis versus free catch in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association* 236:1221-1224.
- Gratwick, Z., Viljoen, A., Page, P.C., Goddard, A., Fosgate, G.T., Lyle, C.H. 2017. A comparison of the effects of a 4% modified fluid gelatin and a 6% hydroxyethyl starch on haemodilution, colloid osmotic pressure, haemostasis and renal parameters in healthy ponies. *Equine Veterinary Journal* 49: 363-368.
- Gratwick, Z. 2021. An updated review: Laboratory investigation of equine renal disease. *Equine Veterinary Education* 33:546-555.
- Hekmatynia, F., Eskandarzadeh, N., Imani, M., Rezaei, M., Zamani-Ahmadm Mahmudi, M. 2019. The diagnostic performance of human urinary dipsticks to estimate urine pH, specific gravity (SpG), and protein in horses: are they reliable? *BMC Veterinary Research* 15: 242.
- Herman, N., Bourguès-Abella, N., Braun, J.P., Ancel, C., Schelcher, F., Trumel, C. 2019. Urinalysis and determination of the urine protein-to-creatinine ratio reference interval in healthy cows. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 33: 999-1008.
- Herring IP, Panciera DL, Werre SR. 2014. Longitudinal prevalence of hypertension, proteinuria, and retinopathy in dogs with spontaneous diabetes mellitus. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28: 488-495.
- Jillings, E., Squires, R.A., Azarpeykan, S., Lopez-Villalobos, N. 2019. Does blood contamination of urine compromise interpretation of the urine protein to creatinine ratio in dogs? *New Zealand Veterinary Journal* 67: 74-78.
- Kovarikova S., Blahova, J., Truhlarova, A., Baslerova, S., Krepinska, I., Jekl, V. 2025. Urinary protein-to-creatinine ratio in guinea pigs (*Cavia porcellus*): Reference range and the effect of age and sex. *Veterinary Record*, *in press*.
- Lees, G.E., Brown, S.A., Elliott, J., Grauer, G.F., Aden, S.L. 2005. Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM forum consensus statement (Small Animal). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19: 377-385.
- Mazzi, A., Fracassi, F., Dondi, F., Gentilini, F., Famigli Bergamini, P. 2008. Ratio of urinary protein to creatinine and albumin to creatinine in dogs with diabetes mellitus and hyperadrenocorticism. *Veterinary Research Communications* 32: S299-S301.
- Meindl, A.G., Lourenço, B.N., Coleman, A.E., Creevy, K.E. 2019. Relationships among urinary protein-to-creatinine ratio, urine specific gravity, and bacteriuria in canine urine samples. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 33: 192-199.
- Mortier, F., Daminet, S., Duchateau, L., Marynissen, S.J.J., Paepe, D. 2023. Comparison of cystocentesis versus home sampling to determine urinary protein: Creatinine ratio and urine specific gravity in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 37: 1401-1408.

- Reusch, B., Murray, J.K., Papasouliotis, K., Redrobe, S.P. 2009. Urinary protein:creatinine ratio in rabbits in relation to their serological status to *Encephalitozoon cuniculi*. *Veterinary Record* 164: 293-295.
- Siwinska, N., Zak, A., Paslawska, U. 2021. Detecting acute kidney injury in horses by measuring the concentration of symmetric dimethylarginine in serum. *Acta Veterinaria Scandinavica* 63: 3.
- Uberti, B., Eberle, D.B., Pressler B.M., Moore G.E., Sojka J.E. 2009. Determination of and correlation between urine protein excretion and urine protein-to-creatinine ratio values during a 24-hour period in healthy horses and ponies. *American Journal of Veterinary Research* 12: 1551-1556.
- Uberti, B., Pressler, B.M., Alkabes, S.B., Chang, C.Y., Moore, G.E., Lescun, T.B., Sojka, J.E. 2010. Effect of heparin administration on urine protein excretion during the developmental stage of experimentally induced laminitis in horses. *American Journal of Veterinary Research* 71: 1462-1467.
- Vientós-Plotts, A.I., Behrend, E.N., Welles, E.G., Chew, D.J., Gaillard, P.R., Busler, J.N., Lee, H.P. 2018. Effect of blood contamination on results of dipstick evaluation and urine protein-to-urine creatinine ratio for urine samples from dogs and cats. *American Journal of Veterinary Research* 79: 525-531.

Cíl 8: Zhodnocení zatížení hospodářských zvířat cizorodými látkami na základě monitoringu cizorodých látek v krmivech, u živých zvířat v hospodářstvích a v surovinách živočišného původu z pohledu dopadu na zdraví a pohodu zvířat

ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ MONITORINGU CIZORODÝCH LÁTEK VE VZTAHU KE ZDRAVÍ A WELFARE HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT

Petr Chloupek, Petra Mačáková, Jana Jozefová, Kamila Novotná Kružíková

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

Abstrakt

Tento příspěvek se zabývá hodnocením monitoringu cizorodých látek prováděných Státní veterinární správou v letech 2015 až 2022. Cizorodé látky byly rozděleny do dvou hlavních kategorií, a to na látky s anabolickým účinkem a nepovolené látky a na veterinární léčivé přípravky a látky kontaminující. Hodnocení trendu výskytu nevyhovujících vzorků bylo provedeno rozdělením dat do dvou stejně dlouhých časových úseků a porovnání relativních počtů nevyhovujících vzorků. Nevyhovující vzorky ve skupině A od 0 do 0,13 % a ve skupině B se pohybují od 0 do 1,7 %. V případě zakázaných látek skupiny A3 steroidy by prokázán pokles nevyhovujících vzorků v období 2019-2022, stejně tak byl prokázán pokles nevyhovujících vzorků ve skupinách B1, B2b, B2e, B3c.

Úvod

Státní veterinární správa (dále také „SVS“) provádí v rámci monitoringu každý rok vyšetřování reziduí a kontaminantů (tzv. „cizorodých látek“) u živých hospodářských zvířat, v surovinách a potravinách živočišného původu a v krmivech. Výsledky těchto vyšetření zveřejňuje formou informačních bulletinů, které jsou dostupné na webových stránkách Státní veterinární správy (<https://www.svscr.cz/category/dokumenty-a-publikace/prehled-podle-temat/kontaminace-potravnich-retezcu/>).

Sledování je prováděno podle vyhlášky č. 291/2003 Sb., o zákazu podávání některých látek zvířatům, jejichž produkty jsou určeny k výživě lidí, a o sledování (monitoringu) přítomnosti nepovolených látek, reziduí a látek kontaminujících, pro něž by živočišné produkty mohly být škodlivé pro zdraví lidí, u zvířat a v jejich produktech, kterou vydalo Ministerstvo zemědělství, a která je prováděcím předpisem k zákonu č. 166/1999 S., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon). Tato povinnost vyplývá z evropské legislativy, směrnic a rozhodnutí, které jsou zpracovány do této vyhlášky.

Ve vyhlášce č. 291/2003 Sb. jsou definovány tyto pojmy:

- rezidua – rezidua látek s farmakologickým účinkem, jejich metabolitů a jiných látek, které se dostaly do živočišných produktů a které by mohly být škodlivé pro zdraví lidí.

- kontaminujícími látky – látky, které se dostaly do živočišných produktů neúmyslně při výrobě, zpracování, balení, přepravě nebo skladování, mimo mechanické znečištění, mikroby, živé nebo mrtvé živočišné škůdce a části jejich těl,
- látky s farmakologickým účinkem – látky, které jsou farmakodynamicky aktivní v dávce, ve které jsou podávány zvířatům prostřednictvím veterinárních léčivých přípravků, v nichž jsou obsaženy,
- beta agonisty – agonisté adrenergních receptorů typu beta
- úřední vzorek – vzorek odebraný orgánem vykonávajícím státní veterinární dozor za účelem vyšetření na rezidua nebo na látky kontaminující, a to s uvedením typu, množství a způsobu odběru, jakož i druhu, pohlaví a původu zvířete anebo druhu a původu živočišného produktu či krmiva (Vyhláška č. 291/2003 Sb.).

Pro monitoring cizorodých látek jsou odbírány vzorky proškolenými úředními veterinární lékaři podle zásad odběru úředních vzorků, jež je v příloze č. 3 k vyhlášce č. 291/2003 Sb. Vzorky jsou odbírány v hospodářstvích, na jatkách, v podnicích pro ošetření mléka, v zařízeních na zpracování ryb a ve sběrnách a balírnách (třídírnách) vajec (Vyhláška č. 291/2003 Sb.).

Sledované látky jsou uvedeny v příloze č. 1 k vyhlášce č. 291/2003 Sb., a jsou zařazeny do dvou skupin označovaných jako skupina A a skupina B. Rozdělení látek do skupin A a B a jejich podskupin je uvedeno v tabu. č. 1. V případě skupiny A se jedná o látky s anabolickým účinkem a nepovolené látky, ve skupině B jsou Veterinární léčivé přípravky (včetně nepovolených látek, které by mohly být použity pro veterinární účely) a látky kontaminující.

U látek skupiny A jde o odhalení zakázaného podávání nepovolených látek a přípravků a případně nesprávného podávání povolených látek. U látek skupiny B jde hlavně o kontrolu dodržování maximálních limitů reziduí veterinárních léčivých přípravků stanovených nařízením Komise (EU) č. 37/2010, maximálních hladin pesticidů stanovených v nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005 a na sledování maximálních hladin kontaminujících látek v potravinách stanovených v nařízení Komise (EU) 2023/915.

V současné době nejsou známy trendy výskytu látek s anabolickým účinkem, nepovolených látek, veterinárních léčiv a kontaminantů v České republice a jejich hodnocení je vhodné s ohledem na zdraví zvířat vyplývající z úředních kontrol.

Cílem práce bylo na základě četnosti nevyhovujících vzorků z monitoringu cizorodých látek prováděných Státní veterinární správou zjistit, které cizorodé látky se vyskytují ve sledovaných skupinách nejčastěji a zhodnotit trend výskytu za období 2015–2022.

Materiál a metodika

Výsledky monitoringu cizorodých látek jsou ukládány do datové skladu Státní veterinární správy. Zde byly vyfiltrovány počty vyšetřených vzorků z monitoringu ve skupinách sledovaných látek, které byly členěny podle legislativně stanovených skupin sledovaných cizorodých látek (skupina A a B). Jednotlivé skupiny cizorodých látek jsou označeny jako A1–A6 a B1, B2a–B2f a B3a–B3f (tab. č. 1).

Tabulka č. 1. Zařazení sledovaných skupin látek do kategorií vycházející z legislativy

Látky s anabolickým účinkem a nepovolené látky		Veterinární léčivé přípravky (včetně nepovolených látek, které by mohly být použity pro veterinární účely) a látky kontaminující	
ZÁKAZ PODÁVÁNÍ		DODRŽOVÁNÍ MAXIMÁLNÍCH LIMITŮ REZIDUÍ	
A1	Stilbeny, deriváty stilbenů, jejich soli a estery	B1	Antibakteriální látky včetně sulfonamidů a chinolonů
A2	Látky s thyreostatickým účinkem	B2	Ostatní veterinární léčivé přípravky:
A3	Steroidy	B2a	Antihelmintika
A4	Laktony kyseliny resorcylové včetně zeranolu	B2b	Antikokcidika včetně nitroimidazolů
A5	Beta agonisté	B2c	Karbamáty a pyretroidy
A6	Látky s farmakologickým účinkem*	B2d	Sedativa
		B2e	Nesteroidní protizánětlivá léčiva
		B2f	Ostatní farmakologicky účinné látky
		B3	Látky kontaminující životní prostředí a ostatní látky
		B3a	Organochlorované sloučeniny včetně PCB
		B3b	Organofosfáty
		B3c	Chemické prvky
		B3d	Mykotoxiny
		B3e	Barviva
		B3f	Ostatní

*Látky s farmakologickým účinkem, pro které nemohou být stanoveny žádné maximální limity, seznam těchto zakázaných látek je uveden v tabulce 2 v příloze nařízení Komise (EU) č. 37/2010, o farmakologicky účinných látkách a jejich klasifikaci podle maximálních limitů reziduí v potravinách živočišného původu (jedná se o: podražec a přípravky z něj, chloramfenikol, chlorpromazin, kolchicin, dapson, dimetridazol, metronidazol, nitrofurany (včetně furazolidonu), ronidazol).

Byly zjištěny celkové počty vyšetřených vzorků, z toho počty nevyhovujících vzorků (skupina nevyhovujících–Nev) a vzorků vyhovujících nebo nehodnocených (skupina ostatní–Ost). Bylo zpracovááno období pro roky 2015–2022. Pro posouzení trendu vývoje relativních počtů sledovaných cizorodých látek bylo posouzeno období 2015–2018 proti období 2019–2022.

Data byla statisticky zpracována v programu Unistat for Excel 6.5. Pro zjištění rozdílů v četnostech nevyhovujících látek v jednotlivých obdobích byl použit Chí–kvadrát test s použitím kontingenčních tabulek.

Výsledky a diskuze

Výsledky posouzení výskytu látek s anabolickým účinkem a nepovolených látek jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2. Počty nevyhovujících vzorků a ostatních pro kategorii A – látky s anabolickým účinkem a nepovolené látky ve sledovaném období 2015–2022

	2015		2016		2017		2018		2019		2020		2021		2022	
	Nev	Ost	Nev	Ost	Nev	Ost	Nev	Ost	Nev	Ost	Nev	Ost	Nev	Ost	Nev	Ost
A1	0	201	0	501	0	505	0	509	0	489	0	477	0	481	0	961
A2	0	665	0	665	0	705	0	713	0	698	0	685	0	1377	0	2817
A3	3	2413	4	2487	1	2518	5	2793	0	2833	3	3008	1	3129	3	6364
A4	0	637	0	697	0	697	0	697	0	697	0	691	0	691	0	1405
A5	0	6387	0	6180	0	6107	0	6101	0	6073	0	6073	0	6085	0	12113
A6	0	4063	2	4175	0	4086	1	4260	0	4612	2	4424	1	4434	2	9247

Nev – nevyhovující Ost – ostatní

Ve sledovaném období byl zaznamenán výskyt pouze u kategorie A3 (steroidy) a A6 (látky s farmakologickým účinkem). U steroidů byl zaznamenán výskyt v každém roce sledovaného období s výjimkou roku 2019. Nejvyšší absolutní počet byl zaznamenán v roce 2018, kdy bylo zachyceno 5 nevyhovujících vzorků. I v tomto případě se však jednalo o relativní výskyt ve výši necelých dvou desetin procenta z celkového počtu kontrolovaných vzorků. Také u látek s farmakologickým účinkem byl výskyt nevyhovujících vzorků zaznamenán ve většině sledovaných roků. Maximální počet nevyhovujících vzorků byl 2, což představuje necelé půl promile z celkového počtu kontrolovaných vzorků.

Pro posouzení trendu výskytu látek s anabolickým účinkem a nepovolených látek bylo sledované období rozděleno do dvou stejných časových úseků. Výsledky tohoto posouzení jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3. Porovnání dvou období u látek s anabolickým účinkem a nepovolených látek

	2015-2018			2019-2022			p
	nevyhovuje	%	celkem	nevyhovuje	%	celkem	
A1	0	0,00	1716	0	0,00	2408	1
A2	0	0,00	2748	0	0,00	5577	1
A3	13	0,13	10224	7	0,05	15341	0,0398
A4	0	0,00	2728	0	0,00	3484	1
A5	0	0,00	24775	0	0,00	30344	1
A6	3	0,02	16587	5	0,02	22722	0,2715

Jak již bylo uvedeno, ze sledovaných látek byl zaznamenán výskyt nevyhovujících vzorků pouze u steroidů a látek s farmakologickým účinkem. U steroidů došlo k poklesu výskytu nevyhovujících vzorků ve druhém sledovaném období. Tento pokles byl jak v absolutních, tak v relativních počtech, a byl statisticky významný. U látek s farmakologickým účinkem došlo k navýšení počtu nevyhovujících vzorků. Vzhledem k vyššímu počtu odebraných vzorků však relativní výskyt nevyhovujících vzorků byl téměř shodný a nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. Zvýšený počet kontrolovaných vzorků ve druhé sledovaném období byl zaznamenán u všech sledovaných kategorií. Toto navýšení bylo způsobeno zejména rokem 2022, kdy došlo k výraznému navýšení počtu kontrolovaných vzorků. Tyto nevyhovující vzorky se vyskytovaly zejména u skotu a prasat. Co se týká konkrétních látek, jednalo se výhradně o 17-beta-19-nortestosteron a chloramfenikol.

Celkově lze pozitivně hodnotit nízký výskyt nevyhovujících vzorků látek s anabolickým účinkem a nepovolených látek, který je v případě steroidů podpořen prokázaným klesajícím trendem, a to i přes zvyšující se počty kontrolovaných vzorků.

Druhou sledovanou kategorií byly veterinární léčivé přípravky a látky kontaminující. Výsledky posouzení této skupiny jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Ve sledovaném období nebyl zaznamenán žádný výskyt nevyhovujících vzorků pouze u kategorií B2c (karbamáty a pyretroidy), B2f (ostatní farmakologicky účinné látky) a B3b (organofosfáty). Nejvyšší počet nevyhovujících vzorků byl zaznamenán v roce 2015 u skupiny B3c (chemické prvky). I když v dalších letech došlo k výraznému poklesu počtu nevyhovujících vzorků, je tato skupina nejhorší jak v absolutních, tak i v relativních počtech nevyhovujících vzorků. Druhou skupinou s vysokými počty nevyhovujících vzorků je B1 (antibakteriální látky včetně sulfonamidů a chinolonů). Tyto počty jsou však ovlivněny vysokým počtem kontrolovaných vzorků, takže relativní počty jsou naopak velmi nízké. U kategorie B3e (barviva) je situace opačná, kdy i přes nižší počty nevyhovujících vzorků jsou relativní počty druhé nejvyšší. Nevyhovující vzorky byly zjištěny napříč všemi druhy hospodářských zvířat včetně ryb a zvěřiny a nevyhovující byla také krmná směs pro drůbeže, jež může následně ovlivňovat zdraví drůbeže. V kategorii B1 se jednalo zejména o streptomyciny, benzylpenicilin a rezidua inhibičních látek, v kategorii B2 to byl narazin a salinomycin, v kategorii B3 nejvíce nevyhovujících vzorků byly zjištěny pro těžké kovy (kadmium, olovo a rtuť) a leukomalachitovou zeleň u ryb.

Tabulka č. 4. Počty nevyhovujících a ostatních vzorků pro kategorii B – Veterinární léčivé přípravky a látky kontaminující ve sledovaných letech

	2015		2016		2017		2018		2019		2020		2021		2022	
	Nev	Ost	Nev	Ost	Nev	Ost	Nev	Ost	Nev	Ost	Nev	Ost	Nev	Ost	Nev	Ost
B1	15	26718	21	26785	20	26817	34	33690	5	35210	4	39870	3	41063	14	84424
B2a	0	1371	0	1358	0	2967	0	3242	1	3356	0	3908	0	3889	0	7779
B2b	9	2874	10	2821	11	2789	8	2895	0	2484	4	2346	3	2375	5	4740
B2c	0	1950	0	1939	0	1950	0	3272	0	3726	0	2660	0	3331	0	6287
B2d	0	658	1	657	0	658	0	658	0	658	0	658	0	658	0	1333
B2e	0	1714	3	1685	1	1691	0	1795	0	1780	0	1695	0	1734	0	3589
B2f	0	97	0	97	0	105	0	355	0	351	0	103	0	331	0	631
B3a	3	16878	5	16006	1	14671	3	18279	1	17552	1	13935	2	13985	5	27720
B3b	0	490	0	490	0	1207	0	3590	0	3921	0	1993	0	3931	0	7197
B3c	105	2360	17	2207	24	2159	19	2339	11	2414	15	2316	9	2340	10	4647
B3d	1	554	0	555	0	419	0	464	0	510	0	507	0	506	1	1000
B3e	8	493	8	403	11	472	7	810	5	819	3	966	11	920	1	1870
B3f	0	323	0	1197	2	2069	8	3048	8	3946	8	6331	5	3475	10	7829

Nev – nevyhovující Ost – ostatní

Při posouzení trendu vývoje výskytu nevyhovujících vzorků byly data rozdělena do dvou stejných časových období (tabulka č. 5).

Tabulka č. 5. Porovnání dvou období u veterinárních léčivých přípravků a látek kontaminujících

	2015-2018			2019-2022			p
	nevyhovuje	%	celkem	nevyhovuje	%	celkem	
B1	90	0,08	114100	26	0,01	200593	0,000
B2a	0	0,00	8938	1	0,01	18933	0,679
B2b	38	0,33	11417	12	0,10	11957	0,000
B2c	0	0,00	9111	0	0,00	16004	1,000
B2d	1	0,04	2632	0	0,00	3307	0,443
B2e	4	0,06	6889	0	0,00	8798	0,037

B2f	0	0,00	654	0	0,00	1416	1,000
B3a	12	0,02	65846	9	0,01	73201	0,497
B3b	0	0,00	5777	0	0,00	17042	1,000
B3c	165	1,76	9230	45	0,38	11762	0,000
B3d	1	0,05	1993	1	0,04	2524	0,493
B3e	34	1,51	2212	20	0,43	4595	0,000
B3f	10	0,15	6647	31	0,14	21612	1,000

U většiny skupin s nenulovým výskytem došlo v druhém sledovaném období k poklesu relativních počtů nevyhovujících vzorků s prokázaným statisticky významným rozdílem. K navýšení došlo u skupiny B2a (antihelmintika), kde se však jednalo o jediný nevyhovující vzorek, takže rozdíl nebyl statisticky významný. Druhý nárůst absolutních počtů nevyhovujících vzorků byl u skupiny B3f (ostatní). Tento nárůst byl způsoben výrazně vyšším počtem kontrolovaných vzorků ve druhém sledovaném období, takže v relativních počtech nevyhovujících vzorků došlo naopak k nepatrnému poklesu, který však nebyl statisticky významný.

Závěr

Zhodnocením výsledku monitoringu cizorodých látek v období 2015 až 2022 v České republice jsme zjistili, že výskyt nevyhovujících vzorků se pohybuje v nízkých desetínách procent z kontrolovaných vzorků. Pouze u skupin chemické prvky a barviva dosahovaly relativní počty jednotek procent z vyšetřovaných vzorků s klesajícím trendem v průběhu sledovaného období. Tento klesající trend se potvrdil u většiny skupin s nenulovým výskytem nevyhovujících vzorků.

Tato práce byla finančně podpořena ITA VETUNI (projekt č. 2024ITA26).

Literatura

Nařízení Komise (EU) 2023/915 ze dne 25. dubna 2023 o maximálních limitech některých kontaminujících látek v potravinách a o zrušení nařízení (ES) č. 1881/2006. In: EUR-lex [právní informační systém]. Úřad pro publikace Evropské Unie [vid 09-07-2024]. Dostupné z <https://eur-lex.europa.eu/>.

Nařízení Komise (EU) č. 37/2010 ze dne 22. prosince 2009 o farmakologicky účinných látkách a jejich klasifikaci podle maximálních limitů reziduí v potravinách živočišného původu. In: EUR-lex [právní informační systém]. Úřad pro publikace Evropské Unie [vid 09-07-2024]. Dostupné z <https://eur-lex.europa.eu/>.

Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005 ze dne 23. února 2005 o maximálních limitech reziduí pesticidů v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu a na jejich povrchu a o změně směrnice Rady 91/414/EHS. In: EUR-lex [právní informační systém]. Úřad pro publikace Evropské Unie [vid 09-07-2024]. Dostupné z <https://eur-lex.europa.eu/>.

Vyhláška č. 291/2003 Sb., o zákazu podávání některých látek zvířatům, jejichž produkty jsou určeny k výživě lidí, a o sledování (monitoringu) přítomnosti nepovolených látek, reziduí a látek kontaminujících, pro něž by živočišné produkty mohly být škodlivé pro zdraví lidí, u zvířat a v jejich produktech. In: e-Sbírka [online]. Ministerstvo vnitra České republiky [vid 09-07-2024]. Dostupné z: <https://www.e-sbirka.cz>.

DLOUHODOBÁ STUDIE HLADIN KADMIA V TKÁNÍCH KŮZLAT A KOZ V ČESKÉ REPUBLICE (STŘEDNÍ EVROPA)

Kamila Novotná Kružíková¹, Danka Haruštiaková², Veronika Vlasáková³, Jana Jozefová¹, Zdeňka Svobodová¹, Petr Chloupek¹, Martin Svoboda⁴

¹Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, ²RECETOX, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, ³Státní veterinární správa, ⁴Klinika přežvýkavců a prasat, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno

Abstrakt

Tato studie se zaměřuje na hodnocení obsahu kadmia v orgánech koz a kůzlat pro lidskou spotřebu s využitím dat pocházejících z monitoringu prováděného Státní veterinární správou v letech 1993 až 2023 v České republice (střední Evropa). Během třicetiletého období bylo analyzováno celkem 26 koz a 4 kůzlaty na kadmium v ledvinách, játrech a svalech. U koz byl zjištěn vyšší průměrný obsah kadmia v ledvinách ($0,358 \pm 0,091 \text{ mg.kg}^{-1}$) a játrech ($0,100 \pm 0,022 \text{ mg.kg}^{-1}$) ve srovnání se svaly ($0,005 \pm 0,001 \text{ mg.kg}^{-1}$) ($P=0,006$ a $P=0,002$). U kůzlat byl obsah kadmia $0,009 \pm 0,002 \text{ mg.kg}^{-1}$, $0,012 \pm 0,003 \text{ mg.kg}^{-1}$, $0,005 \pm 0,001 \text{ mg.kg}^{-1}$ v játrech, ledvinách a svalech. Obsah kadmia v játrech i ledvinách se výrazně liší mezi kůzlaty a kozami, je vyšší u koz ($P = 0,004$ a $P = 0,007$). Nařízení 2023/915 nestanovuje maximální limit obsahu kadmia v játrech, ledvinách a svalovině koz pro lidskou spotřebu, ale Státní veterinární správa výsledky porovnává s "akčními limity", které jsou stejné jako u ovcí podle výše uvedeného nařízení 2023/915. Přestože kadmium bylo zjištěno ve všech zkoumaných vzorcích, "akční limit" pro lidskou spotřebu u kůzlat nebyl překročen u žádného vzorku. U koz byly překročeny u 4 z 26 vzorků ledvin, tj. u 15 % vzorků.

Úvod

Kadmium je kumulativní toxický kov s významnými zdravotními důsledky pro lidi i zvířata. Běžná populace je vystavena kadmium konzumací kontaminovaných potravin a vody, jakož i vdechováním výparů nebo kouře (Andrée et al., 2010). Kadmium se může dostat do stravy koz různými environmentálními a zemědělskými cestami (Li et al., 2019). Primární cesty, kterými může kadmium kontaminovat krmivo pro kozy, jsou: kontaminace půdy, kontaminace vody, kontaminace krmiva a atmosférická depozice. Kadmium se hromadí především v listech a výhoncích, dále pak v květenstvích různých druhů rostlin (Bosiacki, 2008). Protože kozy jsou býložravci, jejich hlavním zdrojem příjmu kadmia je konzumace rostlin. Kadmium lze nalézt v různých částech rostlin, včetně listů, stonků a plodů, které kozy konzumují jako součást své stravy. Podle Okoye a Ugwu (2010) tedy kozy jako pasoucí se zvířata mohou být dobrými indikátory obecného znečištění životního prostředí. Kadmium se hromadí ve zvířecích tkáních. Po absorpci je kadmium transportováno krví do jater, kde tvoří komplex s metalothioneinem. V ledvinách je metalothioneinový komplex kadmia filtrován

v glomerulích a poté reabsorbován v renálních tubulech (Järup et al., 1998). To je důvod hromadění se kadmia hlavně v játrech a ledvinách.

Příjem kadmia představuje potenciální hrozbu pro lidské zdraví. V ledvinách může kadmium po dosažení určitých koncentrací způsobit renální dysfunkci. Charkiewicz (2023) uvádí, že kadmium narušuje metabolismus vápníku, hořčíku, železa, zinku a mědi v buňkách. Několik studií prokázalo zvýšené riziko osteoporózy i při nízké expozici kadmia (Kazantzis 2004). Některé studie ukazují interferenci s parathormonem nebo ledvinovými enzymy, které se podílejí na aktivaci vitamínu D (Akesson et al., 2006). Parathormon má důležitou roli v homeostáze vápníku, protože stimuluje aktivaci vitamínu D v ledvinách, zvyšuje reabsorpci vápníku ledvinami v distálních tubulech a ovlivňuje kostní buňky, jako jsou osteoblasty, osteoklasty a stromální buňky (Potts, 2005).

Cílem této studie bylo zhodnotit obsah kadmia v tkáních koz na základě dat z monitoringu prováděného Státní veterinární správou v letech 1993 až 2023 v České republice (střední Evropě) a porovnat s ostatními zvířaty a dalšími zeměmi.

Materiál a metodika

Pro tuto studii byla použita data získaná z monitoringu hladin cizorodých látek prováděného Státní veterinární správou ČR. Monitoring je prováděn v souladu se směrnicí Rady 96/23/ES a od ledna 2023 také v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (EU) 2017/625 a nařízením Komise v přenesené pravomoci (EU) 2022/931 a prováděcím nařízením Komise (EU) 2022/932. Vzorky jater (25 koz a 4 kůzlata), ledvin (26 koz a 4 kůzlata) a svalů (26 koz a 3 kůzlata) byly analyzovány na obsah kadmia. Kozám byly 2 až 4 roky a kůzlatům asi 2 měsíce.

Analýzy byly prováděny v laboratořích státních veterinárních ústavů v České republice, které jsou akreditovány podle ČSN EN ISO/IEC 17025:2005. Všechny metody jsou validovány a laboratoře se pravidelně účastní kontrolních zkoušek v programech testování způsobilosti laboratoří (Státní veterinární správa, 2024).

Podrobný popis metody měření kadmia lze nalézt v práci Svoboda et al. (2020). V případě hodnoty kadmia pod limitem detekce byla pro výpočet použita polovina limitu detekce.

Statistická analýza

Rozdíly v obsahu kadmia mezi játry, ledvinami a svaly a mezi kůzlata a kozami byly analyzovány pomocí opakovaných měření ANOVA následovaných několika t-testy s Bonferroniho korekcí k identifikaci rozdílů mezi skupinami vzorku. $P < 0,05$ byl považován za významný ve všech testech. Manipulace s daty a statistická analýza byly provedeny pomocí programu Statistica, verze 14 (TIBCO Software Inc.).

Výsledky

Obsah kadmia v tkáních koz byl zkoumán v rámci monitoringu prováděného Státní veterinární správou České republiky v posledních 30 letech. Nejvíce vzorků bylo odebráno v roce 1996 (5 vzorků pro všechny tkáně), v letech 1994, 2003 a 2005 byly odebrány 2 kusy a v ostatních letech bylo k analýze kadmia 0 nebo 1 vzorek.

Obsah kadmia se pohyboval od 0,002 do 0,018 mg.kg⁻¹ u mláďat a pohyboval se od 0,002 do 1,612 mg.kg⁻¹ u koz. Nejvyšší průměrný obsah kadmia u koz byl zjištěn v ledvinách, dále v játrech a nejnižší průměrný byl zjištěn ve svalovině (viz tabulka 1). V případě kůzlat byl nejvyšší průměr zjištěn také v ledvinách, následovaných játry, s nejnižším obsahem ve svalech (viz tabulka 1).

Tabulka č. 1. Obsah kadmia v játrech, ledvinách a svalovině koz a kůzlat v letech 1993–2023

kůzlata/kozy	orgán	N	median mg.kg ⁻¹	průměr±SEM mg.kg ⁻¹
kůzlata	játra	4	0.009	0.009±0.002 ^{A, a}
	ledviny	4	0.013	0.012±0.003 ^{A, a}
	svalovina	3	0.005	0.005±0.001 ^{A, a}
kozy	játra	25	0.054	0.100±0.022 ^{A, b}
	ledviny	26	0.175	0.358±0.091 ^{A, b}
	svalovina	26	0.005	0.005±0.001 ^{B, a}

SEM= střední chyba průměru

^{A, B} Různý index značí rozdíl v obsahu kadmia mezi sledovanými tkáněmi (zvláště pro kůzlata a kozy)

^{a, b} Různý index značí rozdíl v obsahu kadmia mezi kůzlaty a kozami (zvláště pro játra, ledviny a svalovinu)

Koncentrace kadmia byla významně ovlivněna tkání (opakovaná měření ANOVA: vliv tkáně: $F(2,52)=10,638$, $P < 0,001$), vliv věkové kategorie (kůzlátka/kozy) nebyl v komplexním modelu potvrzen (opakovaná měření ANOVA: vliv věkové kategorie: $F(1,26)=2,255$, $P=0,145$). Podrobnější srovnání vzorkových skupin odhalilo významné rozdíly jak mezi tkáněmi, tak mezi kůzlaty a kozami. U koz byly zjištěny významné rozdíly v koncentraci kadmia mezi játry a svaly ($P=0,002$) a mezi ledvinami a svaly ($P=0,006$). Nebyl zjištěn žádný rozdíl v obsahu kadmia mezi játry a ledvinami ($p = 0,103$). U kůzlat nebyly rozdíly mezi tkáněmi statisticky významné ($P > 0,05$) (Tabulka 1). Obsah kadmia v játrech i ledvinách se významně liší mezi kůzlaty a kozami, je vyšší u koz ($P = 0,004$ a $P = 0,007$; Tabulka 1).

Diskuze

Kontaminace kadmii postihuje různé druhy zvířat, včetně hospodářských zvířat, a jeho hromadění v tkáních může představovat značné zdravotní riziko. Aby byla zajištěna účinná ochrana veřejného zdraví, neměly by se potraviny obsahující kontaminující látky překračující maximální limity používat k lidské spotřebě.

Maximální limit pro obsah kadmia v tkáních je tedy stanoven pro skot, prasata, drůbež, koně a ryby, nikoli však pro kozy (nařízení 2023/915). Ačkoli je stanoven limit pro obsah kadmia pro ovce, pro kozy žádný takový limit neexistuje. Pokud pro některé látky ještě nebyly stanoveny limity, používá Státní veterinární správa tzv. akční limity. Pokud koncentrace překročí tento limit, je žádoucí vyhledat zdroj kontaminace a přijmout opatření k jeho snížení nebo odstranění. Akční limit pro kadmium u koz je stejný jako pro kadmium u ovcí a vychází z nařízení Komise (EU) 2023/915, které uvádí 0,05 mg.kg⁻¹ pro svaly, 0,5 mg.kg⁻¹ pro játra a 1,0 mg.kg⁻¹ pro ledviny.

Přestože kadmium bylo zjištěno ve všech zkoumaných vzorcích, akční limit pro lidskou spotřebu u dětí nebyl překročen u žádného vzorku; u koz však byla překročena u 4 z 26 vzorků ledvin, tj. u 15 % vzorků. Tato jednotlivá zvířata měla také zvýšené hladiny kadmia v játrech, ale ty nepřekročily akční limit pro játra.

Srovnání s jinými zvířaty

V České republice byly předchozí studie obsahu kadmia zaměřeny na prasata (Svoboda et al., 2020), skot (Drápal et al., 2021) a ovce (Svobodová et al. 2024). Tyto studie prokázaly, že obsah kadmia se

u zvířat různých druhů liší. Nejnižší obsah kadmia v ledvinách byl zjištěn u telat ($0,06 \text{ mg.kg}^{-1}$) a jehňat ($0,061 \pm 0,013 \text{ mg.kg}^{-1}$), dále u prasat ($0,124 \pm 0,005 \text{ mg.kg}^{-1}$) a mladého skotu ($0,24 \text{ mg.kg}^{-1}$). Vyšší hodnoty v ledvinách byly zjištěny u koz ($0,655 \pm 0,091 \text{ mg.kg}^{-1}$ – naše výsledky), prasníc ($0,361 \pm 0,032 \text{ mg.kg}^{-1}$) a krav ($0,64 \text{ mg.kg}^{-1}$). Nejvyšší hodnoty kadmia byly zjištěny u ovcí ($1,255 \pm 0,204 \text{ mg.kg}^{-1}$).

Obeid et al. (2016) se zaměřili na hladiny kadmia ve vnitřních orgánech jehňat, skotu a koz z Libanonu. Dospěli k závěru, že tkáně skotu obecně vykazovaly nejnižší koncentraci kadmia ve srovnání s kozami a ovci. Obeid et al. (2016) poukazuje na skutečnost, že krávy jsou často chovány uvnitř, zatímco kozy a jehňata jsou chovány na pastvinách venku. To by mohlo znamenat, že kozy a jehňata jsou více ohroženy vyšší expozicí toxickým kovům.

Různá velikost zvířat může také hrát roli při hromadění kadmia. Naše výsledky ukázaly, že hladiny kadmia, jak v játrech, tak v ledvinách, se významně liší mezi mláďaty a kozami, přičemž u koz jsou vyšší. Kadmium je kumulativní látka, která se v těle časem hromadí. Dospělé kozy jsou vystaveny environmentálním zdrojům kadmia po delší dobu než kůzlata, což vede k vyšší akumulaci v jejich tkáních. Kozy konzumují více potravy a tráví více času pastvou ve srovnání s kůzlata, což následně zvyšuje jejich příjem potenciálně kontaminované půdy, rostlin a vody.

Také věk se zdá být důležitým faktorem i v případě skotu. Drápal et al. (2021) zaznamenali významně vyšší průměrnou koncentraci kadmia v ledvinách a játrech skotu staršího dvou let ve srovnání s průměrnou koncentrací kadmia v ledvinách a játrech mladého skotu mladšího dvou let. Byla také zjištěna statisticky významná pozitivní korelace mezi koncentrací kadmia v ledvinách a věkem skotu (Drápal et al., 2021).

Kadmium v ledvinách

Ledviny jsou hlavním zásobním orgánem kadmia jak u zvířat, tak u lidí (Chan et al., 2004; Oing, 2021). Tato znalost je v souladu s našimi výsledky, kde průměrná hladina kadmia u koz byla nejvyšší v ledvinách, následovala játra a nejnižší ve svalu. U kůzlat nebyl rozdíl mezi obsahem kadmia v játrech a ledvinách významný.

Experiment provedený Haneefem et al. (1998) ukázal, že hladina kadmia v krvi se zvýšila po perorálním požití kadmia a že nejvyšší koncentrace kadmia byla zjištěna v ledvinách ve srovnání s játry. Tomovic et al. (2015) ze Srbska uvádějí nižší hodnotu hladiny kadmia u samců koz ve srovnání s naší studií (ledvina $0,114 \pm 0,013 \text{ mg.kg}^{-1}$) a Njoga et al. (2021) také uvádějí nižší hladinu kadmia $0,06 \pm 0,36 \text{ mg.kg}^{-1}$ v ledvinách koz ze státu Enugu v Nigérii, což je šestkrát méně než v našich datech. Přesto Okoye a Ugwu (2010) uvádějí průměrný obsah kadmia v ledvinách koz z Nigérie $0,83 \pm 0,73 \text{ mg.kg}^{-1}$, což má vyšší hodnotu než naše data, a navíc Obeid et al. (2016) prezentovali dvakrát vyšší průměrné hodnoty kadmia ($0,635 \text{ mg.kg}^{-1}$) v ledvinách koz z Libanonu. To ukazuje na rozdíl v zatížení životního prostředí v různých regionech. Obsah kadmia by tedy mohl být ovlivněn prostředím, ve kterém zvířata žijí.

Kadmium v játrech

Naše výsledky ukázaly, že druhá nejvyšší hladina kadmia byla v játrech. To zjistili i Tomović et al. (2015), kteří uvedli, že druhý nejvyšší obsah kadmia byl nalezen v devíti vzorcích jater odebraných od kozích samců v Srbsku. Naše výsledky jsou také podobné obsahu kadmia ve studii Obeid et al. (2016), kde průměrná koncentrace kadmia u koz byla $0,133 \text{ mg.kg}^{-1}$. Zatímco Njoga et al. (2021) publikovali velmi nízkou hladinu kadmia ($0,02 \pm 0,00 \text{ mg.kg}^{-1}$) v kozách, které byly dále zpracovávány pro lidskou spotřebu v jihovýchodní Nigérii, Okoye a Ugwu (2010) hlásili vyšší obsah v játrech koz z Nigérie ($0,35 \pm 0,36 \text{ mg.kg}^{-1}$). Bylo také zjištěno, že vysoká akumulace kadmia také v játrech přímo souvisí s jejich funkcí jako vylučovacího orgánu.

Kadmium ve svalu

Nejnižší průměrný obsah kadmia byl zjištěn ve svalovině koz i kůzlat, což je v souladu se zjištěními Njoga et al. (2021) ($0,02 \pm 0,00 \text{ mg.kg}^{-1}$), Obeid et al. (2016) a Nkansah a Ansah (2014) (chevon form Ghana $-0,018 \pm 0,002 \text{ mg.kg}^{-1}$). Ve světle našich výsledků v kombinaci s výsledky z předchozích studií

je zřejmé, že konzumace kozího masa je z hlediska obsahu kadmia nejméně riziková ve srovnání s konzumací ledvin nebo jater koz. Z hlediska akumulace kadmia není kozí maso potenciálně rizikové.

Závěr

Obsah kadmia v tkáních koz se většinou nachází v ledvinách, dále v játrech a nejmenší množství kadmia se nachází ve svalech. Výsledky dostupné za období od roku 1993 do roku 2023 ukazují, že u koz bylo více kadmia ve srovnání s kůzlaty, a to v důsledku hromadění kadmia v průběhu času. Pouze 15 % překročilo akční limit. Aktivní dohled je nezbytný pro ochranu zvířat samotných i ochranu veřejného zdraví. Tato zjištění zdůrazňují potřebu monitorovat a kontrolovat hladiny kadmia v životním prostředí, aby se zabránilo kontaminaci potravinového řetězce a chránilo se zdraví zvířat i lidí.

Poděkování

Autoři děkují Ústřední veterinární správě Státní veterinární správy za poskytnutí výsledků vyšetření kontaminujících látek z databáze Odborného informačního systému.

Tato práce byla finančně podpořena ITA VETUNI (projekt č. 2024ITA26).

Literatura

- Abd Elnabi, M.K., Elkaliny, N.E., Elyazied, M.M., Azab, S.H., Elkhalifa, S.A., Elmasry, S., Mouhamed M.S., Shalamesh, E.M., Alhoriény, N.A., Abd Elaty, A.E., Elgendy, A.I.M., Ertman, A.E., Saad, K.E., Tsigkou, K., Ali, S.S., Kornaros, M., Mahmoud, Y.A.G. 2023. Toxicity of Heavy Metals and Recent Advances in Their Removal: A Review. *Toxics* 11: 580.
- Akesson, A., Bjellerup, P., Lundh, T., Lidfeldt, J., Nerbrand, C., Samsioe, G., Skerfving, S., Vahter, M. 2006. Cadmium-induced effects on bone in a population-based study of women. *Environmental Health Perspectives* 114: 830-834.
- Alvare-Ayuso, E. 2008. Cadmium in soul-plant system. *International Journal fo Environment and pollution* 33: 275-291.
- Andrée, S., Jira, W., Schwind, K.H., Wagner, H., Schwägele, F. 2010. Chemical safety of meat and meat products. *Meat Science* 86: 38-48.
- Bosiacki, M. 2008. Accumulation of cadmium in selected species of ornamental plants. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus* 7: 21-31.
- Směrnice Rady 96/23/ES ze dne 29. dubna 1996 o opatřeních pro sledování některých látek a jejich reziduí v živých zvířatech a živočišných produktech a o zrušení směrnic 85/358/EHS a 86/469/EHS a rozhodnutí 89/187/EHS a 91/664/EHS. In: EUR-lex [právní informační systém]. Úřad pro publikace Evropské unie [vid. 16. 12. 2024]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/>
- Nařízení Komise v přenesené pravomoci (EU) 2022/931 ze dne 23. března 2022, kterým se doplňuje nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2017/625 stanovením pravidel pro provádění úředních kontrol, pokud jde o kontaminující látky v potravinách. In: EUR-lex [právní informační systém]. Úřad pro publikace Evropské unie [vid. 16. 12. 2024]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/>
- Prováděcí nařízení Komise (EU) 2022/932 ze dne 9. června 2022 o jednotných praktických opatřeních pro provádění úředních kontrol, pokud jde o kontaminující látky v potravinách, o zvláštním dodatečném obsahu víceletých vnitrostátních plánů kontrol a zvláštních dodatečných opatřeních pro jejich přípravu. In: EUR-lex [právní informační systém]. Úřad pro publikace Evropské unie [vid. 16. 12. 2024]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/>
- Nařízení Komise (EU) 2023/915 ze dne 25. dubna 2023 o maximálních limitech některých kontaminujících látek v potravinách a o zrušení nařízení (ES) č. 1881/2006. In: EUR-lex [právní

informační systém]. Úřad pro publikace Evropské unie [vid. 16. 12. 2024]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/>

- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2017/625 ze dne 15. března 2017 o úředních kontrolách a jiných úředních činnostech prováděných za účelem zajištění uplatňování potravinového a krmivového práva, pravidlech týkajících se zdraví a dobrých životních podmínek zvířat, zdraví rostlin a přípravků na ochranu rostlin a o změně nařízení (ES) č. 999/2001, (ES) č. 396/2005, (ES) č. 1069/2009, (ES) č. 1107/2009, (EU) č. 1151/2012, (EU) č. 652/2014, (EU) 2016/429 a (EU) 2016/2031, nařízení Rady (ES) č. 1/2005 a (ES) č. 1099/2009 a směrnice Rady 98/58/ES, 1999/74/ES, 2007/43/ES, 2008/119/ES a 2008/120/ES a kterým se zrušují nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 854/2004 a (ES) č. 882/2004, Směrnice Rady 89/608/EHS, 89/662/EHS, 90/425/EHS, 91/496/EHS, 96/23/ES, 96/93/ES a 97/78/ES a rozhodnutí Rady 92/438/EHS (nařízení o úředních kontrolách). In: EUR-lex [právní informační systém]. Úřad pro publikace Evropské unie [vid. 16. 12. 2024]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/>
- Chan, D.Y., Fry, N., Waiseberg, M., Black, W.D., Hale, B.A. 2004. Accumulation of dietary Cadmium (Cd) in rabbit tissues and excretions: A comparison of lettuce amended with soluble Cadmium salt and lettuce with plant- incorporated Cadmium. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 67: 397-411.
- Charkiewicz, A.E., Omeljaniuk, W.J., Nowak, K., Garley, M., Nikliński, J. 2023. Cadmium Toxicity and Health Effects-A Brief Summary. *Molecules* 28: 6620.
- Drapal, J., Steinhauser, L., Stastny, K., Faldyna, M. 2021. Cadmium concentration in cattle tissues in the Czech Republic. *Veterinární Medicína* 66: 369-375.
- Haneef, S.S., Swarup, D., Dwivedi, S.K., Dash, P.K. 1998. Effects of concurrent exposure to lead and cadmium on renal function in goats. *Small Ruminant Research* 28: 257-261.
- Järup, L., Berglund, M., Elinder, C.G., Nordberg, G., Vahter, M. 1998. Health effects of cadmium exposure – a review of the literature and a risk estimate. *Scandinavian Journal of Work, Environmental & Health* 24: 1-51.
- Kazantzis, G. 2004. Cadmium, osteoporosis and calcium metabolism. *BioMetals* 17: 493-498.
- Ihedioha, J.N. & Okoye, C.O.B. 2013. Dietary intake and health risk assessment of lead and cadmium via consumption of cow meat for an urban population in Enugu State, Nigeria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 93: 101-106.
- Li, Y., Shen, X. 2023. Effects of Cadmium on Liver Function and Its Metabolomics Profile in the Guizhou Black Goat. *Metabolites* 13: 268.
- Li, C., Zhou, K., Qin, W., Tian, C., Qi, M., Yan, X., Han, W. 2019. A review on heavy metals contamination in soil: effects, sources, and remediation techniques. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 28: 380-394.
- Nkansah, M.A., Ansah, J.K. 2014: Determination of Cd, Hg, As, Cr and Pb levels in meat from the Kumasi Central Abattoir. *International Journal of Science and Research* 4: 1-4.
- Njoga, E.O., Ezenduka, E.V., Ogbodo, C.G., Ogbonna, C.U., Jaja, I.F., Ofomatah, A.C., Okpala, C.O.R. 2021. Detection, Distribution and Health Risk Assessment of Toxic Heavy Metals/Metalloids, Arsenic, Cadmium, and Lead in Goat Carcasses Processed for Human Consumption in South-Eastern Nigeria. *Foods* 10: 798.
- Obeid, P.J., Younis, M., Slaiba, C., El-Nakat, J. 2016. Distribution levels of lead and cadmium within various fresh meat tissues of beef, goat and lamb and their consumption risk assessment. *WIT Transactions on Ecology and the Environment* 203: 101-111.
- Okoye, C.O.B., Ugwu, J.N. 2010. Impact of environmental cadmium, lead, copper and zinc on quality of goat meat in Nigeria. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia* 24: 133-138.
- Oing, Y., Yang, J., Zhu, Y., Li, Y., Zheng, W., Wu, M., He, G. 2021. Dose-response evaluation of urinary cadmium and kidney injury biomarkers in Chinese residents and dietary limit standards. *Environmental Health* 20: 75.
- Potts, J.T. 2005. Parathyroid hormone: past and present. *J Endocrinol* 187: 311-325.

- Svoboda, M., Drápal, J., Haruštiaková, D., Svobodová, Z. 2020. A multiannual survey of cadmium content in pig tissues collected in the Czech Republic during the years 2015-2019. *Acta Veterinaria Brno* 89: 349-355.
- Svobodova, Z, Drapal, J., Vlasakova, V., Harustiakova, D., Illek, J., Svoboda, M. 2024. A multi year study monitoring the cadmium content in the tissuesw of lambs and sheep sampled in the Czech Republic between 12001 and 2022. *Veterinání Medicína* 69: 1-7.
- Tomovic, V., Jokanovic, M., Pihler, I., Vasiljevic, I., Skaljac, S., Sojic, B., Tomasevic, I., Tomovic, M., Martinovic, A., Lukac, D. 2015. Cadmium levels of edible offal from Saanen goat male kids. *Procedia Food Science* 5: 289-292.

Cíl 9: Zhodnocení zatížení řek Moravy a Dyje rtutí ve vztahu ke zdraví a welfare ryb na základě posouzení obsahu celkové rtuti ve svalovině ryb

ZHODNOCENÍ ZATÍŽENÍ ŘEK MORAVY A DYJE RTUTÍ VE VZTAHU KE ZDRAVÍ A WELFARE RYB NA ZÁKLADĚ POSOUZENÍ OBSAHU CELKOVÉ RTUTI VE SVALOVINĚ RYB

Kamila Novotná Kružíková, Petr Linhart, Zdeňka Svobodová

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

Abstrakt

Na dolním toku řeky Morava a Dyje bylo odloveno celkem sedm druhů ryb (hlaváč černoústý, hrouzek běloploutvý, hrouzek obecný, okoun říční, jelec tloušť, karas stříbřitý a plotice obecná). Rybám byly odebrány šupiny na zjištění věku a vzorky svaloviny. Obsah celkové rtuti ve svalovině byl změřen atomovou absorpční spektrometrií na analyzátoru AMA 254 (Altec spol. s r.o., ČR). U sledovaných druhů ryb byl obsah celkové rtuti zjištěn v rozmezí 0,016 až 0,094 mg/kg u ryb z dolního toku řeky Moravy, a v rozmezí 0,025 mg/kg až 0,186 mg/kg v řece Dyji. Na řece Moravě byl zjištěn nižší průměrný obsah rtuti u plotice ($0,024 \pm 0,01$ mg/kg) a jelce tlouště ($0,021 \pm 0,01$ mg/g) oproti významně vyšším průměrům u okouna ($0,062 \pm 0,01$ mg/kg), hrouzka obecného ($0,061 \pm 0,01$ mg/kg), hrouzka běloploutvého ($0,058 \pm 0,01$ mg/kg) a hlaváče ($0,053 \pm 0,01$ mg/kg). V případě řeky Dyje byl průměrný obsah rtuti vyšší u okouna ($0,186 \pm 0,03$ mg/kg) ve srovnání s jelcem tlouštěm jelce ($0,019 \pm 0,01$ mg/kg). Ostatní sledované druhy se od jelce tlouště a okouna v Dyji nelišily (karas $0,103 \pm 0,13$ mg/kg a hlaváč $0,116 \pm 0,02$ mg/kg). Invazivní hlaváč se v průměru obsahu rtuti neliší od druhu ryby, která je na stejné trofické úrovni (hrouzek). Získané výsledky ukazují na nízkou kontaminaci sledovaných řek rtutí, což nepředstavuje vysoké riziko pro vodní organismy zde žijící.

Úvod

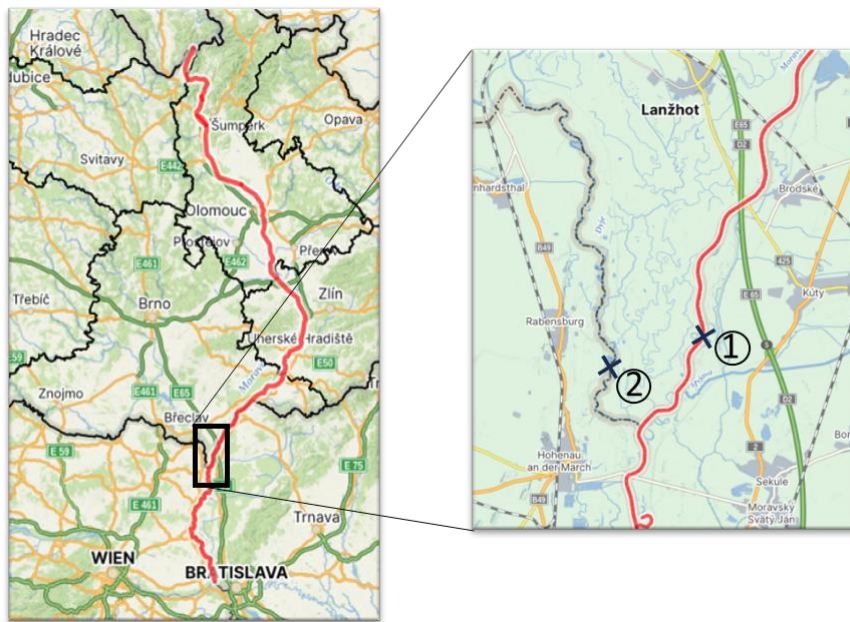
Rtuť je pro svou toxicitu a perzistenci v sedimentech považována za hlavní polutant ve vodním prostředí. Rtuť se bioakumuluje ve vodních organismech a biomagnifikuje v potravním řetězci (Mason et al., 2000). Obsah rtuti ve vodních organismech se odvíjí od druhovém odlišnosti, přičemž nejvyšší obsahy rtuti jsou pozorovány ve dravých rybách, rtuť se bioakumuluje se stoupajícím trofickou úrovní (Maršálek et al., 2006; Jurajda et al., 2020). Nepůvodní druhy mohou vytvářet nové cesty bioakumulace rtuti, což zkoumali např. Hogan et al. (2007), kteří zjistili, že invaze hlaváčů v jezeře Erie vytvořila novou cestu bioakumulace rtuti, kdy kontaminanty původně omezené na bentos po invazi hlaváčů začaly vstupovat do potravního řetězce. Podle Luska et al. (2010) byl poprvé zjištěn výskyt hlaváče černoústého (*Neogobius melanostomus*) na řece Moravě v roce 2008, tedy jedná se o nepůvodní druh ryby v českých řekách. Hlaváč je bentická ryba, živící se např. slávkami, slávičkami, korýši, hmyzem či malými rybkami.

Cílem práce bylo (1) zjistit obsah celkové rtuti (THg) ve svalovině hlaváče černoústého, hrouzka běloploutvého, hrouzka obecného, okouna říčního, jelce tlouště a plotice obecné z dolních toků řek Moravy a Dyje, (2) porovnat THg u stejných druhů ryb z obou řek, (3) zhodnotit bioakumulaci u nepůvodního druhu hlaváče černoústého a (4) posoudit kontaminaci řeky Moravy a Dyje ve vztahu ke zdraví a welfare ryb.

Materiál a metodika

Ve spolupráci s Ústavem biologie obratlovců AV ČR (povolení MZE-68283/2022-16232) bylo elektrickým agregátem na dolním toku řeky Moravy a Dyje před jejich soutokem (obr. č. 1) odloveno sedm druhů ryb (hlaváč černoústý *Neogobius melanostomus*, hrouzek běloploutvý *Romanogobio albipinnatus*, hrouzek obecný *Gobio gobio*, okoun říční *Perca fluviatilis*, jelec tloušť *Leuciscus cephalus*, plotice obecná *Rutilus rutilus*, karas stříbřitý *Carassius gibelio*). Ryby byly omráčeny (silným úderem tupým předmětem na temeno hlavy) a následně byla rybám přetata mícha. Základní míry a váhy odlovených ryb jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Obrázek č. 1. Mapa odběrových lokalit na dolním toku řeky Moravy a Dyje



1=odběrová lokalita na řece Moravě; 2=odběrová lokalita na řece Dyji

Tabulka č. 1. Druhy a počty odlovených ryb na řece Moravě a Dyji a jejich charakteristika (průměr±SD)

druh ryby	řeka	N	věk	hmotnost	celková délka
hlaváč černoústý	Morava	14	2,4±0,6	23,3±9,4	9,3±1,1
	Dyje	9	1,7±0,6	18,4±9,0	10,1±1,5
hrouzek běloploutvý	Morava	10	2,0±0,0	7,5±0,7	9,59±0,3
hrouzek obecný	Morava	7	2,2±0,5	11,58±1,0	10,3±0,3
okoun říční	Morava	11	2,2±0,6	39,2±36,4	12,8±3,3
	Dyje	10	2,1±0,3	30,1±12,4	12,87±1,4
jelec tloušť	Morava	11	2±0,0	22,1±7,1	12,5±1,0
	Dyje	12	2,3±0,6	43,3±41,7	15,3±3,1
plotice obecná	Morava	11	1,7±0,8	22,4±7,5	12,5±1,1
karas	Dyje	22	1,7±0,6	40,6±26,7	12,6±2,6

N=počet ryb

Stanovení obsahu celkové bylo provedeno metodou atomové absorpční spektrometrie na analyzátoru AMA 254 (Altec, Praha; obr. č. 2). Celková rtuť (THg) byla měřena u každého vzorku minimálně 2x (relativní odchylka měření nepřesáhla 10 %) a následně byl stanoven průměr obsahu rtuti ve vzorku čerstvé svaloviny.

Statistická analýza byla provedena pomocí statistického softwaru unistat for excel 6.5. Normalita byla otestována pomocí Shapiro-Wilk testu. Koncentrace rtuti ve svalovině byla mezi lokalitami porovnána nepárovým t-testem. Hmotnost a délka jedinců mezi lokalitami byla porovnána pomocí nepárového Mann-Whitney testu.

Obrázek č. 2 Analyzátor AMA 254 na měření celkové rtuti



Výsledky a diskuze

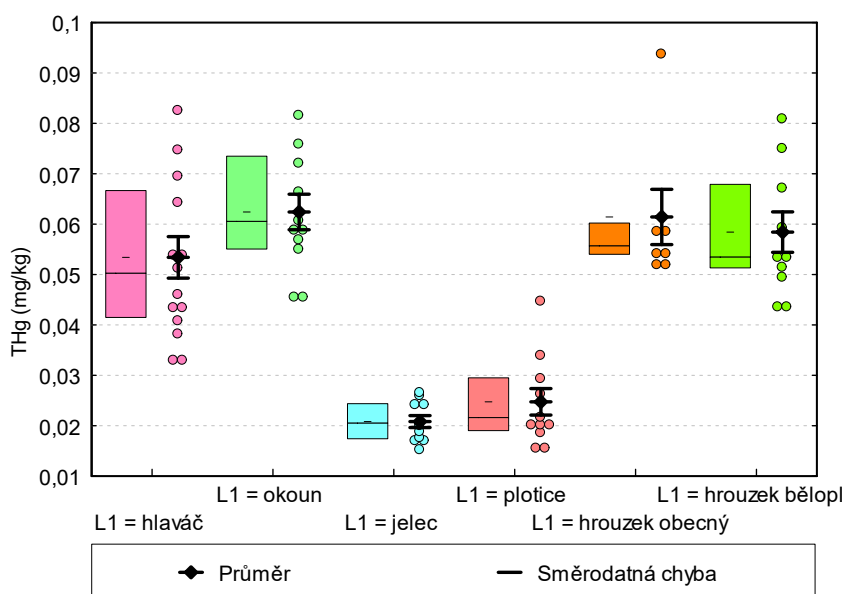
Ryby z řeky Moravy a Dyje nevykazovaly rozdíl v hmotnosti ($p=0,2438$) ani v délce těla ($p=0,2986$), bylo tedy možno porovnat rozdíl v obsahu rtuti ve svalovině mezi jednotlivými druhy ryb z obou řek.

Obsah THg v jednotlivých druzích ryb ve sledovaných řekách

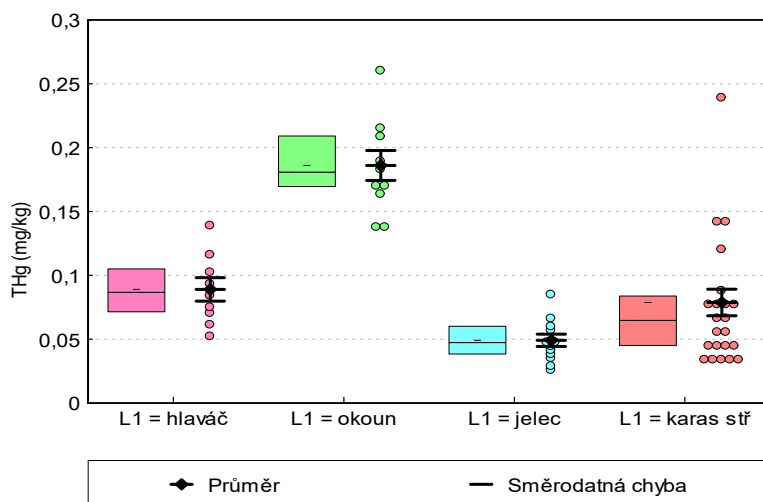
Nejvyšší hodnoty byly zjištěny u okouna v řece Dyji ($0,186 \pm 0,035$ mg/kg), naopak nejnižší obsah celkové rtuti byl zjištěn u jelce tlouště ($0,019 \pm 0,016$ mg/kg) také z řeky Dyje. Srovnání průměrných hodnot celkové rtuti u jednotlivých druhů ryb ve sledovaných řekách je uvedeno na grafech č. 1 a 2. V rámci sledovaných řek byly porovnány jednotlivé druhy ryb z pohledu obsahu celkové rtuti ve svalovině mezi sebou. V řece Moravě byl potvrzen významně vyšší obsah THgv hlaváči, hrouzkovi běloploutvém a obecném a okounovi oproti nedravým rybám jelci a plotici. V řece Dyji byl zjištěn významně vyšší rozdíl u okouna a karase oproti hlaváčovi a jelci tloušti.

U obou sledovaných řek lze konstatovat, že obsah rtuti stoupá s trofickou úrovní sledovaného organismu následovně: jelec tloušť < plotice < karas < hlaváč < hrouzek < okoun.

Graf č. 1. Průměrný obsah celkové rtuti v mg/kg ve svalovině sledovaných ryb z řeky Moravy



Graf č. 2. Průměrný obsah celkové rtuti v mg/kg ve svalovině sledovaných ryb z řeky Dyje



Tabulka č. 2. Průměrný obsah (\pm SD) celkové rtuti ve svalovině ryb z řeky Moravy a jejich statistická významnost (**značí, že mezi danými druhy ryb je významný rozdíl v obsahu celkové rtuti ($p < 0,05$))

ryba	N	THg (mg/kg)	jelec	plotice	hlaváč	hrouzek	hrouzek	okoun
b.								
jelec tloušť	11	0,021 \pm 0.01			**	**	**	**
plotice	11	0,024 \pm 0.01			**	**	**	**
hlaváč	14	0,053 \pm 0.01	**	**				

hrouzek b.	10	0,058±0.01	**	**
hrouzek ob.	7	0,061±0.01	**	**
okoun	11	0,062±0.01	**	**

** významně odlišné páry

Tabulka č. 3. Průměrný obsah celkové rtuti ve svalovině ryb z řeky Dyje a jejich statistická významnost (**značí, že mezi danými druhy ryb je významný rozdíl v obsahu celkové rtuti ($p < 0,05$))

ryba	N	THg (mg/kg)	jelec tloušť	hlaváč	okoun	karas
jelec tloušť	12	0,019±0,016			**	**
hlaváč	9	0,116±0,024			**	**
okoun	10	0,186±0,035	**	**		
karas	24	0,103±0,130	**	**		

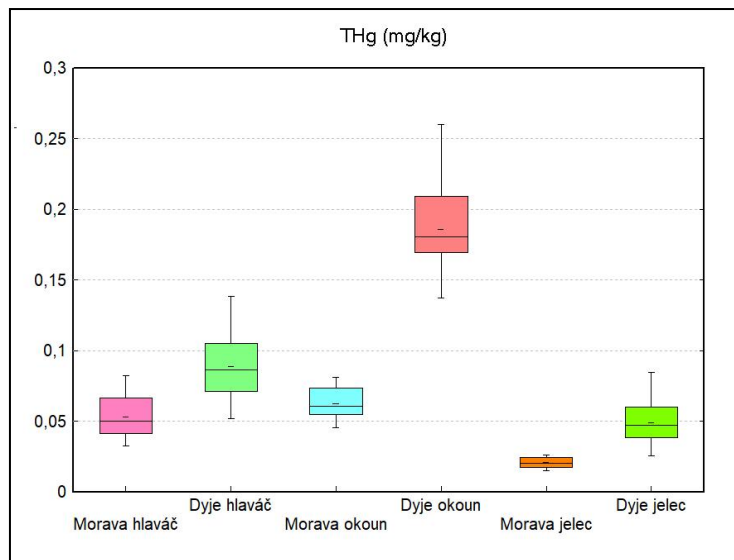
** významně odlišné páry

Porovnání sledovaných řek

Pro porovnání sledovaných řek a jejich zatížení rtutí byly hodnoceny stejné druhy ryb, které byly na obou řekách odloveny. Porovnání THg u hlaváče, okouna a jelce je zobrazeno na grafu č. 3. Z grafu je patrné, že pro všechny tři druhy ryb je vyšší obsah THg v řece Dyji oproti řece Moravě. Zatímco u okouna a jelce tlouště se jedná o signifikantně vyšší rozdíl u ryb z řeky Dyje oproti Moravě, tak v případě hlaváče není tento rozdíl významný.

Podle výsledků lze usuzovat, že řeka Dyje je více zatížená rtutí. Řeka Dyje vznikla spojením Rakouské Dyje a Moravské Dyje v Dolních Rakousích. Protéká městem Znojmo a ve vodním díle Velké mlýny přijímá přítoky Jihlavu a Svatku. Řeka Morava pramení u Kralického sněžníku a prochází městem Olomouc.

Graf č. 3. Porovnání THg v mg/kg u hlaváče, okouna a jelce tlouště v obou sledovaných řekách



Nepůvodní druh - hlaváč černoústý

THg ve svalovině hlaváče byl vysoce významně vyšší v řece Dyji oproti řece Moravě ($p=0,0006$). To naznačuje, že v řece Moravě je nižší kontaminace rtuť, a tudíž jsou vodní organismy vystaveny menší expozici. Obsah rtuť ve svalovině hlaváčů podobné hmotnosti z řeky Dyje sledovali Jurajda et al. (2020), kdy zjistili průměrný obsah $0,069 \pm 0,005$ mg/kg oproti našemu zjištění $0,089 \pm 0,047$ mg/kg. Jurajda et al. (2020) zjišťovaly THg v homogenátu plůdku, což může být vysvětlení pro nižší hodnotu THg. Dále v řece Labi byl ve studii Jurajdy et al. (2020) zjištěn průměrný obsah $0,100 \pm 0,014$ mg/kg svaloviny, což se jeví jako vyšší oproti našim výsledkům, a to jak v Dyji, tak asi dvakrát vyšší oproti průměrnému obsahu rtuť ve svalovině hlaváčů z řeky Moravy. Invazivní hlaváč se v průměru obsahu rtuť neliší od druhu ryb, jež jsou na stejné trofické úrovni (hrouzek a okoun) a v podobné hmotnosti dosahuje podobných obsahů ve svalovině. K dalšímu posouzení vytvoření nových cest bioakumulace doporučujeme v budoucnu sledování THg u hlaváčů a ryb na stejné trofické úrovni.

Zdraví a welfare ryb

Zdraví ryb je ohroženo při vysokých hodnotách celkové rtuť v organismu. U známého případu ohrožení organismu zvířat rtuť při znečištění vod v zátocích Minamata odpadními vodami obsahující rtuť se hodnoty pohybovaly kolem 40 mg/kg což jsou hodnoty několikanásobně vyšší oproti námi zjištěnými. Historicky zatíženou lokalitou v ČR je nádrž Skalka, kde se hodnoty THg drží u dravých ryb kolem 5 mg/kg. V porovnání s těmito lokalitami lze konstatovat, že dolní tok Moravy a Dyje neovlivňuje zdraví ani welfare ryb z pohledu kontaminace rtuť. Zjištěné obsahy rtuť ani daleka nedosahují maximální limity pro kontaminující látky podle nařízení komise (EU) 2023/915, kde pro nevyjmenované druhy ryb platí maximální limit 0,5 mg/kg čerstvé tkáně.

Závěr

Na základě zjištěných hodnot celkové rtuť došlo k rozšíření dat pro okouna, hlaváče, jelce tluště, plotici, karase, hrouzka obecného a běloploutvého a hlaváči černoústém žijícím na dolním toku řek Moravy a Dyje, jež je pro české řeky nepůvodním druhem. Úroveň akumulace rtuť ve svalovině hlaváče odpovídá druhům ve stejné trofické úrovni jako je např. hrouzek. Nicméně z hlediska kontaminace rtuť se řeka Morava jeví méně zatížená oproti řece Dyji, podle uvedených výsledků je možno obě lokality považovat z pohledu obsahu rtuť za nerizikové pro vodní organismy.

Tato práce byla finančně podpořena ITA VETUNI (projekt č. 2024ITA26).

Literatura

- Hogan, L.S., Marschal, E., Folt, C., Stein, R.A. 2007. How non-native species in Lake Erie influence trophic transfer of mercury and lead to top predators. *Journal of Great Lakes Research* 33: 46–61.
- Jurajda, P., Všeticková, L., Švecová, H., Kolářová, J., Jurajdová, Z., Janáč, M., Roche, K. 2020. Trophic mercury biomagnification patterns in two European rivers following introduction of invasive round gobies (*Neogobius melanostomus*). *Limnologica* 84: 125817.
- Lusk, S., Lusková, V., Hanel, L. 2010. Alien fish species in the Czech Republic and their impact on the native fish fauna. *Folia Zoologica* 59: 57–72.
- Maršálek, P., Svobodová, Z. Randák, T. 2006. Total mercury and methylmercury contamination in fish from various sites along the Elbe River. *Acta Veterinaria Brno* 75: 79–585.
- Mason, R.P., Laporte, J.M., Andres, S. 2000. Factors controlling the bioaccumulation of mercury, methylmercury, arsenic selenium and cadmium by freshwater invertebrates and fish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 38: 283–297.
- Nařízení Komise (EU) 2023/915 ze dne 25. dubna 2023 o maximálních limitech některých kontaminujících látek v potravinách a o zrušení nařízení (ES) č. 1881/2006. Úřední věstník Evropské unie L 119/103.

Cíl 10: Komplexní posouzení účinků herbicidu glyfosátu a jeho degradačního produktu aminomethylfosfonové kyseliny (AMPA) při výskytu v povrchových vodách na zdraví a pohodu kapra obecného (*Cyprinus carpio*)

KOMPLEXNÍ POSOUZENÍ ÚČINKŮ HERBICIDU GLYFOSÁTU A JEHO DEGRADAČNÍHO PRODUKTU AMINOMETHYLFOSFONOVÉ KYSELINY (AMPA) NA KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*)

Jana Blahová, Ekaterina Koriakina, Mikula Přemysl, Petr Maršálek, Helena Modrá

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

Abstrakt

Cílem této studie bylo komplexně posoudit potenciálně negativní účinky glyfosátu a jeho hlavního metabolitu, kyseliny aminomethylfosfonové (AMPA), na vybrané parametry kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Ryby byly vystaveny uvedeným látkám prostřednictvím krmiva podávaného po dobu 4 týdnů. Testovány byly environmentálně relevantní koncentrace a jejich násobky. Po ukončení expozice byly odebrány vzorky krve a tkání pro analýzu základních biochemických a hematologických parametrů, včetně indikátorů oxidativního stresu, jako jsou vysokomolekulární antioxidanty, aktivity antioxidantních a detoxikačních enzymů a poškození významných biomolekul. Dále byly sledovány možné endokrinní účinky pomocí analýzy tyroxinu. V tkáních byla také provedena transkriptomová analýza vybraných genů. Po čtyřtýdenní expozici nebyla zaznamenána mortalita ani změny v rámci sledovaných morfologických ukazatelů. Výsledky naší studie ovšem prokázaly negativní účinky obou testovaných látek v ostatních subletálních parametrech, dle očekávání byly četnější změny zaznamenány především ve vyšších testovaných koncentracích. Vyšší koncentrace glyfosátu signifikantně ovlivnila ukazatele bílé krevní řady, došlo ke zvýšení celkového počtu leukocytů. U všech experimentálních skupin došlo také ke statisticky významnému zvýšení poměru neutrofilů a lymfocytů, který indikuje stres. Četné změny byly zjištěny i v případě biochemického profilu, a to především při analýze aktivit enzymů, kdy u všech experimentálních skupin došlo k signifikantnímu zvýšení aktivity lipázy. Řada statisticky významných nálezů byla zjištěna i při hodnocení oxidativního stresu, a to jak při analýze aktivit enzymů, tak i při analýze poškození významných biomolekul a změn genové exprese. Ze zjištěných výsledků je tedy zřejmé, že glyfosát i jeho hlavní metabolit AMPA, představují pro ryby významné riziko.

Úvod

V posledních letech se intenzivní používání pesticidů v zemědělství stále častěji zmiňuje jako klíčový faktor přispívající k poškození životního prostředí. Široké spektrum pesticidů, které se vyznačují různými chemickými vlastnostmi, je aplikováno na ochranu rostlin před škůdci. Tyto látky však mohou snadno pronikat do vodních ekosystémů prostřednictvím povrchového odtoku a prosakování z ošetřených oblastí. Kontaminace vodních zdrojů představuje potenciální riziko toxických účinků na vodní faunu a flóru a může mít nepříznivý dopad i na lidské zdraví, zejména vzhledem k využívání těchto vod pro pitné účely a rekreační aktivity. Znečištění kontinentálních a mořských vodních ekosystémů je převážně způsobeno aplikací pesticidů, a to především z třídy herbicidů. Tato situace

může narušovat ekologickou rovnováhu a mít negativní dopad na necílové organismy, včetně vodních druhů (Oruç et al., 2004).

Glyfosát (*N*-(fosfonomethyl)glycin) patří mezi neselektivní herbicidy ze skupiny organofosfátů, které se používají po vzklíčení rostlin, tedy postemergentně (Alipour et al., 2024). Je to kompetitivní inhibitor enzymu 5-enolpyruvylshikimát-3-fosfát syntázy, který se podílí na biosyntéze aromatických aminokyselin u rostlin a mikroorganismů. Tento enzym hraje klíčovou roli v metabolických procesech, které jsou nezbytné pro růst a vývoj rostlin a mikroorganismů, což činí jeho inhibici důležitým cílem pro regulaci jejich růstu (Steinrücken and Amrhein, 1980). Glyfosát také vykazuje škodlivé účinky na necílové organismy, včetně ryb, přičemž může vyvolat změny v hematologických a biochemických procesech v tkáních. Mezi jeho negativní účinky patří mimo jiné genotoxicita, imunotoxicita, kardiotoxicita a endokrinní disrupce. Kromě toho byly prokázány četné histopatologické změny v tkáních po expozici uvedeným herbicidem (Antunes et al., 2017; de Brito Rodrigues et al., 2019; Ma et al., 2019; Modesto and Martinez et al., 2010).

Hlavní metabolit glyfosátu, kyselinu aminomethylfosfonovou (AMPA), lze detekovat ve všech typech ekosystémů v důsledku rozsáhlého používání mateřské sloučeniny (Grandcoin et al., 2017). AMPA se vyznačuje nižší rozpustností ve vodě a delším poločasem rozpadu v půdě. Tato látka je běžně detekována v sladkovodních prostředích, sedimentech a suspendovaných částicích a její výskyt často převyšuje detekci glyfosátu (Battaglin et al., 2005). Obě látky, glyfosát i AMPA, mají ve vodním prostředí poločas rozpadu mezi 7 a 14 dny (Giesy et al., 2000).

Cílem studie bylo zhodnotit potenciálně negativní účinky glyfosátu a AMPA na vybrané ukazatele zdraví kapra obecného (*Cyprinus carpio*) po subchronické expozici. Testované látky byly podávány ve speciálně připraveném krmivu po dobu čtyř týdnů. Zaměřili jsme se na monitorování různých biologických parametrů a enzymatických aktivit, aby bylo možné lépe porozumět účinkům těchto kontaminantů na rybí organismus. Kromě toho byla také provedena transkriptomová analýza vybraných genů spojených se zánětlivou odpovědí, oxidačním stresem, detoxikací a hormonální regulací.

Materiál a metodika

Pro sledování účinků glyfosátu a AMPA po perorální aplikaci byl jako modelový organismus zvolen kapr obecný (*Cyprinus carpio*), který je typický pro Českou republiku. Test proběhl v souladu s metodikou OECD 215 pro testování chemikálií (Fish Juvenile Growth Test) na Ústavu ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství (VETUNI) v akreditovaném zařízení pro pokusná zvířata (projekt pokusu č. MSMT-7295/2024-3). Samotný experiment probíhal v průtočném systému (obrázek č. 1) s výměnou vody každých 12 hodin. Do experimentu bylo zařazeno celkem 120 kusů juvenilních jedinců, kteří byli rozděleni do 10 nádrží po 12 kusech. Před samotnou expozicí proběhla dvoutýdenní aklimatizační fáze. Doba expozice trvala 4 týdny. Do experimentu bylo zařazeno pět duplicitních skupin: kontrola, skupiny exponované glyfosátu v dávkách 350 µg/kg (GLYF 350) a 3500 µg/kg (GLYF 3500), a skupiny vystavené AMPA v dávkách 350 µg/kg (AMPA 350) a 3500 µg/kg (AMPA 3500). Koncentrace testovaných látek v krmivu byly ověřeny pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS). Během experimentu byla denně sledována mortalita, případné změny v příjmu krmiva a dále probíhala analýza základních fyzikálně-chemických parametrů vody (pH, teplota, koncentrace kyslíku, dusitany, dusičnany a amoniak).

Po ukončení expozice byl nejprve proveden odběr krve z kaudálních cév, poté byly všechny ryby usmrceny tupým úderem do hlavy, a nakonec byl proveden odběr vybraných tkání pro následné analýzy (obrázek č. 2). Dále bylo provedeno zhodnocení základních morfologických ukazatelů (délka těla, celková délka, hmotnost, hmotnost jater, Fultonův kondiční koeficient – FCF, hepatosomatický index – HSI). V heparinizované krvi bylo provedeno základní hematologické vyšetření (erytrocyty, leukocyty, hemoglobin, hematokrit). Byly také zhotoveny krevní nátěry pro zhodnocení

diferenciálního rozpočtu leukocytů. Z parametrů červeného krevního obrazu byly vypočítány erytrocytní indexy – střední objem erytrocytů (MCV), hemoglobin erytrocytů (MCH) a střední barevná koncentrace (MCHC). Hematologické vyšetření bylo provedeno dle metod uvedených v publikaci autorského kolektivu Svobodová et al. (2012). Část heparinizované krve byla odstředěna (3 000 otáček/min, 4 °C, 10 min) pro získání plazmy, která byla rozdělena do Eppendorf zkumavek pro analýzu základních biochemických ukazatelů (glukóza, amoniak, celkový protein, albumin, alaninaminotransferáza – ALT, aspartátaminotransferáza – AST, alkalická fosfatáza – ALP, laktátdehydrogenáza – LDH, kreatinkináza, butyrylcholinesteráza – ChE, laktát, cholesterol, triacylglyceroly, vápník, fosfor, hořčík, kreatinin) a ukazatelů oxidativního stresu (redukční potenciál plazmy – FRAP, ceruloplasmin, poškození DNA s využitím stanovení 8-deoxyguanosinu, poškození lipidů s využitím kyseliny thiobarbiturové (TBARS) a poškození proteinů měřením karbonylových skupin). Vzorky plazmy byly skladovány do doby analýzy v hlubokomrazicím boxu (-80 °C). Základní biochemické vyšetření plazmy bylo provedeno s využitím biochemického analyzátoru Konelab 20i a komerčních kitů od firmy Biovendor. Analýza FRAP a ceruloplasminu byla provedena spektrofotometricky. Stanovení poškození DNA a obsahu karbonylových skupin bylo provedeno s využitím komerčních kitů. V plazmě byl dále analyzován marker endokrinní disrupce tyroxin, a to s využitím komerčního kitu. Bližší popis použitých metodik je uveden v pracích autorských kolektivů Haluzová et al. (2010) a Vaclavik et al. (2022).

Obrázek č. 1. Průtočný systém pro provádění testů toxicity na kapru obecném



Při pitvě byl proveden odběr jater, žaber a kaudální ledviny pro analýzu antioxidantních a detoxikačních enzymů (kataláza – CAT, glutathionperoxidáza – GPx, glutathionreduktáza – GR a glutathion-S-transferáza – GST) a lipoperoxidace (TBARS). Vzorky byly skladovány v hlubokomrazicím boxu (-80 °C) do doby analýzy. Před vlastní analýzou byly vzorky nejprve homogenizovány ve fosfátovém pufru (50 mmol/l KH_2PO_4 , 1 mmol/l EDTA, pH 7,4). Pro dílčí analýzy aktivit enzymů byl využit supernatant. Stanovení lipoperoxidace bylo provedeno s využitím kyseliny thiobarbiturové (TBARS), a to přímo ve vzorcích homogenátu. Všechny analýzy byly provedeny spektrofotometricky v mikrotitračních destičkách s využitím readru Varioskan Flash Reader (Thermo-Scientific, USA). Aktivita enzymů byla normalizována na koncentraci proteinu, který byl stanoven pomocí kyseliny bicinchoninové. Bližší informace k analýze jednotlivých ukazatelů oxidativního stresu jsou uvedeny v práci autorského kolektivu Blahova et al. (2020). Z důvodu nízké aktivity nebylo provedeno stanovení GR ve vzorcích ledvin.

Expres vybraných genů v mozku, žábrech, játrech, svalech a hlavové ledvině byla provedena pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RT-qPCR). Každý vzorek byl po odběru ihned fixován roztokem RNA later (Thermo Fisher Scientific, ČR) a skladován po dobu 24 hodin při 4 °C, poté byl uložen při -80 °C až do doby analýzy. Po vyjmutí z roztoku RNA later byly vzorky rozřezány a homogenizovány pomocí TRI Reagent RT (Molecular Research Center, USA) a 2,3 mm zirkon/silika kuliček (Biospec Products, USA) na homogenizátoru Bead Mill (OMNI International, USA). Extrakce RNA byla provedena pomocí RNeasy Mini kitu (Qiagen, Německo) podle pokynů výrobce. Dále byla RNA reverzně transkribována pomocí LunaScript RT SuperMix kitu (New England Biolabs, USA) na termocykleru Engine Thermal Cycler (Bio-Rad, Česká republika). Naše studie se zaměřila na geny zapojené do oxidačního systému a přeměny xenobiotik (kataláza – *cat*; cytochrom P450 1A1-like – *cyp1a1*; cytochrom P450 1B1 – *cyp1b1*; glutathion peroxidáza – *gpx*; glutathion reduktáza – *gr*; glutathion S-transferáza – *gst* a superoxiddismutáza – *sod*), geny odpovědné za regulaci štítné žlázy (jodthyronin deiodináza 1 – *dio1*; jodthyronin deiodináza 2 – *dio2*; receptor alfa hormonu štítné žlázy – *thra*; receptor beta hormonu štítné žlázy – *thrβ*), geny imunitní odpovědi (interleukin 1 beta – *il1β*; interleukin 10 – *il10*; matrixová metaloproteináza-9 – *mmp9* a tumor nekrotizující faktor alfa – *tnfa*), markery regulace červených krvinek (erythropoetin – *epo*), neurotransmise (acetylcholinesteráza – *ache*) a stresové aktivity (heatshock protein 70 – *hsp70*). Relativní exprese genů byla vypočítána podle vzorce: $[1/(2^{Ct \text{ gen}})]/[1/(2^{Ct \text{ bac}})]$ ve srovnání s expresí referenčního genu – beta aktinu (*bac*)

Obrázek č. 2. Odběry vzorků tkání kapra obecného pro analýzu ukazatelů oxidativního stresu



Statistické vyhodnocení získaných dat bylo provedeno v programu Unistat 6.5 for Excel. V první fázi testování bylo provedeno zhodnocení normality dat (Shapiro-Wilkův test) a homogenity rozptylu (Levenův test). Pokud byla splněna podmínka normálního rozdělení, bylo pro další testování využito jednofaktorové analýzy rozptylu a následného testu mnohonásobného porovnání (Tukey-HSD test). Pokud podmínka normality splněna nebyla, byl využit vícevýběrový mediánový test. Testování bylo provedeno na hladině významnosti $p < 0,05$. Výsledky jsou prezentovány jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru.

Výsledky

Během experimentu nebyla zaznamenána mortalita v žádné z testovaných skupin, a rovněž nebyly pozorovány změny ve spotřebě krmiva. Výsledky morfologických parametrů jsou uvedeny v tabulce č. 1. U žádného z hodnocených ukazatelů nebyly po skončení experimentu zjištěny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami ($p > 0,05$).

Tabulka č. 1. Výsledky morfologického vyšetření (průměr \pm střední chyba průměru)

	kontrola	GLYF 350	GLYF 3500	AMPA 350	AMPA 3500
celková délka (mm)	147,6 \pm 1,34	221,2 \pm 2,9	221,7 \pm 2,8	223,3 \pm 2,5	222,1 \pm 2,7
délka těla (mm)	191,7 \pm 3,0	193,1 \pm 2,7	192,9 \pm 2,5	196,2 \pm 2,5	193,8 \pm 2,5
hmotnost (g)	202,6 \pm 9,2	205,4 \pm 8,1	203,8 \pm 8,9	206,4 \pm 7,8	200,0 \pm 9,0
hmotnost jater (g)	4,9 \pm 0,3	4,5 \pm 0,3	4,1 \pm 0,5	4,5 \pm 0,4	4,1 \pm 0,4
hepatosomatický index	2,4 \pm 0,1	2,2 \pm 0,1	2,0 \pm 0,2	2,1 \pm 0,2	2,1 \pm 0,2
Fultonův kondiční faktor	2,8 \pm 0,0	2,8 \pm 0,0	2,8 \pm 0,0	2,7 \pm 0,0	2,7 \pm 0,0

V tabulce č. 2 jsou uvedeny výsledky hematologického vyšetření. V rámci ukazatelů červené krevní řady byly signifikantní změny zaznamenány pouze v koncentraci hematokritu, konkrétně se jednalo o statisticky významný ($p < 0,05$) rozdíl mezi skupinami exponovanými glyfosátu v koncentraci 3500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a AMPA v koncentraci 350 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U žádného ukazatele nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou.

Četnější změny byly zaznamenány v případě ukazatelů bílé krevní řady. V koncentraci glyfosátu 3500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bylo pozorováno signifikantní zvýšení ($p < 0,05$) počtu leukocytů, lymfocytů, myelocytů, metamyelocytů, monocytů a poměru N/L ve srovnání s kontrolou ($p < 0,05$). Naopak nižší koncentrace glyfosátu (GLYF 350) se v porovnání s kontrolní skupinou lišila ($p < 0,05$) pouze v případě poměru N/L, který se hojně využívá jako indikátor stresu. Signifikantní změny ($p < 0,05$) byly zjištěny i v případě expozice AMPA, kdy v porovnání s kontrolní skupinou došlo ovšem jen ke zvýšení myelocytů (obě koncentrace) a metamyelocytů (pouze AMPA 350). U neutrofilních tyčinek a segmentů nebyly detekovány žádné statisticky významné změny v porovnání s kontrolou ($p > 0,05$). U obou skupin bylo zjištěno opět statisticky významné zvýšení poměru N/L ($p < 0,05$).

Tabulka č. 2. Výsledky hematologického vyšetření (průměr \pm střední chyba průměru). Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou označeny rozdílnými písmeny ($p < 0,05$). V případě signifikantního rozdílu v porovnání s kontrolní skupinou je použito tučné písmo a šipka indikuje směr změny (tzn. zvýšení/snížení).

	kontrola	GLYF 350	GLYF 3500	AMPA 350	AMPA 3500
erytrocyty ($10^{12}/\text{l}$)	1,4 \pm 0,1 ^a	1,4 \pm 0,06 ^a	1,5 \pm 0,11 ^a	1,4 \pm 0,07 ^a	1,6 \pm 0,09 ^a

hemoglobin (g/l)	65,1 ± 2,8 ^a	66,8 ± 2,9 ^a	63,7 ± 1,9 ^a	69,7 ± 2,2 ^a	69,5 ± 3,4 ^a
hematokrit (l/l)	0,27 ± 0,008 ^{ab}	0,29 ± 0,01 ^{ab}	0,26 ± 0,005 ^b	0,29 ± 0,005 ^a	0,28 ± 0,01 ^{ab}
MCV (fl)	194,5 ± 9,1 ^a	203,9 ± 8,2 ^a	183,7 ± 12,2 ^a	193,2 ± 9,3 ^a	167,3 ± 9 ^a
MCH (pg)	45,1 ± 1,8 ^a	45,5 ± 1,6 ^a	43,6 ± 2,3 ^a	45,9 ± 2,1 ^a	40,7 ± 2,3 ^a
MCHC (g/l)	234,4 ± 9,2 ^a	225,4 ± 10,1 ^a	239,6 ± 5,9 ^a	238,8 ± 6,09 ^a	243,2 ± 4,6 ^a
leukocyty (10 ⁹ /l)	98,2 ± 11,7 ^b	85,8 ± 9,0 ^b	134,6 ± 8,7^a↑	73,6 ± 5,8 ^b	76,5 ± 5,3 ^b
lymfocyty (10 ⁹ /l)	83,8 ± 9,2 ^b	76,7 ± 8,6 ^b	117,1 ± 7,0^a↑	61,6 ± 7,0 ^b	65,2 ± 4,0 ^b
myelocyty (10 ⁹ /l)	2,02 ± 0,7 ^b	2,9 ± 0,2 ^{ab}	6,7 ± 1,08^a↑	4,9 ± 0,4^a↑	4,4 ± 0,6^a↑
metamyelocyty (10 ⁹ /l)	0,6 ± 0,2 ^b	1,4 ± 0,2 ^{ab}	2,9 ± 0,4^a↑	2,3 ± 0,3^{ac}↑	1,1 ± 0,3 ^{bc}
tyčky (10 ⁹ /l)	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,1 ^a	0,2 ± 0,2 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
segmenty (10 ⁹ /l)	0,5 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,2 ^a	1,2 ± 0,3 ^a	1,1 ± 0,4 ^a
monocyty (10 ⁹ /l)	2,9 ± 0,3 ^b	4,1 ± 0,6 ^{ab}	6,6 ± 1,01^a↑	3,3 ± 0,3 ^b	4,6 ± 0,5 ^{ab}
N/L	0,03 ± 0,008 ^c	0,06 ± 0,005^b↑	0,09 ± 0,007^{ab}↑	0,14 ± 0,02^a↑	0,09 ± 0,01^{ab}↑

Poznámka: MCV – střední objem erytrocytů, MCH – hemoglobin erytrocytů, MCHC – střední barevná koncentrace, N/L – poměr neutrofilních granulocytů (součet myelocytů, metamyelocytů, tyček a segmentů) a lymfocytů

Výsledky biochemického vyšetření krevní plazmy jsou uvedeny v tabulce č. 3. Statisticky významné změny ($p < 0,05$) ve srovnání s kontrolní skupinou byly zaznamenány při analýze vybraných enzymů (lipáza, ALP, ChE) a laktátu. Nejvýznamnější změny byly zjištěny v případě aktivity lipázy, kdy u všech experimentálních skupin došlo k signifikantnímu zvýšení. U nejvyšší testované koncentrace AMPA došlo k signifikantnímu snížení laktátu ($p < 0,05$). Překvapivé jsou i statisticky významné ($p < 0,05$) změny u environmentálně relevantních koncentrací obou testovaných látek, kdy došlo k signifikantnímu zvýšení ($p < 0,05$) ALP a v případě skupiny GLYF 350 došlo i k signifikantnímu zvýšení ($p < 0,05$) enzymu ChE.

Dále byla hodnocena potenciální endokrinní disrupce glyfosátu a jeho metabolitu, a to se zaměřením na možné ovlivnění funkce štítné žlázy. Analyzován byl tyroxin v krevní plazmě. Při expozici glyfosátem a jeho metabolitem AMPA jsme nezaznamenali žádné změny v hladině tyroxinu, což naznačuje, že tyto látky neměly za podmínek pokusu signifikantní ($p > 0,05$) vliv na jeho koncentraci v organismu. Detailní výsledky jsou uvedeny v grafu č. 1.

V rámci našeho experimentu jsme také sledovali řadu ukazatelů oxidativního stresu ve vybraných tkáních (GPx, GR, CAT, GST, poškození DNA – TBARS). Detailní výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 4. Byly zde zjištěny signifikantní změny v porovnání s kontrolní skupinou pouze v případě expozice AMPA v koncentraci 3500 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Došlo ke snížení aktivity GPx v játrech a ke zvýšení lipidní peroxidace v žábrech. Z důvodu nízké aktivity nebyla aktivita GR analyzována v ledvině.

Tabulka č. 3. Biochemické ukazatele krevní plazmy (průměr ± střední chyba průměru). Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou označeny rozdílnými písmeny ($p < 0,05$). V případě signifikantního rozdílu v porovnání s kontrolní skupinou je použito tučné písmo a šipka indikuje směr změny (tzn. zvýšení/snížení).

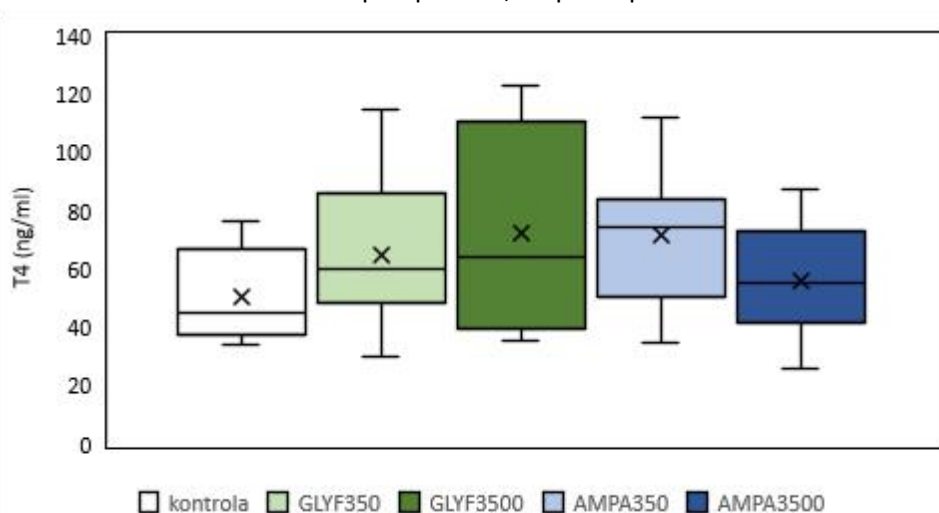
	kontrola	GLYF 350	GLYF 3500	AMPA 350	AMPA 3500
<i>parametry metabolismu sacharidu</i>					
glukóza (mmol/l)	6,28 ± 0,41 ^a	5,48 ± 0,60 ^a	6,70 ± 0,42 ^a	6,82 ± 0,51 ^a	6,48 ± 0,51 ^a
laktát (mmol/l)	6,55 ± 0,87 ^a	5,70 ± 0,74 ^a	5,09 ± 0,78 ^a	5,44 ± 0,60 ^a	1,80 ± 0,25^b↓
<i>parametry metabolismu lipidů</i>					
triacylglyceroly (mmol/l)	3,61 ± 0,41 ^a	3,16 ± 0,20 ^a	3,46 ± 0,28 ^a	3,12 ± 0,26 ^a	3,01 ± 0,26 ^a
cholesterol (mmol/l)	5,49 ± 0,21 ^a	5,93 ± 0,23 ^a	5,76 ± 0,22 ^a	5,42 ± 0,32 ^a	5,31 ± 0,27 ^a
<i>parametry dusíkatého metabolismu</i>					
albumin (g/l)	11,95 ± 0,49 ^a	11,56 ± 0,79 ^a	11,44 ± 0,41 ^a	12,40 ± 0,46 ^a	11,81 ± 0,46 ^a
celkový protein (g/l)	30,51 ± 0,49 ^a	30,02 ± 0,94 ^a	30,56 ± 0,47 ^a	30,38 ± 0,76 ^a	29,75 ± 0,62 ^a
amoniak (μmol/l)	309,03 ± 31,28 ^a	322,63 ± 32,42 ^a	271,16 ± 23,08 ^a	306,19 ± 36,39 ^a	215,48 ± 16,13 ^a
kreatinin (μmol/l)	29,21 ± 1,83 ^a	29,43 ± 4,21 ^a	30,69 ± 4,18 ^a	25,44 ± 3,91 ^a	23,51 ± 2,36 ^a
<i>minerální profil</i>					
fosfor (mmol/l)	1,66 ± 0,11 ^a	1,82 ± 0,09 ^a	1,70 ± 0,10 ^a	1,92 ± 0,12 ^a	1,71 ± 0,13 ^a
hořčík (mmol/l)	0,98 ± 0,06 ^a	1,00 ± 0,03 ^a	0,96 ± 0,03 ^a	1,00 ± 0,03 ^a	0,91 ± 0,03 ^a
vápník (mmol/l)	2,67 ± 0,06 ^a	2,77 ± 0,05 ^a	2,68 ± 0,05 ^a	2,72 ± 0,06 ^a	2,52 ± 0,04 ^a
železo (mmol/l)	38,42 ± 1,58 ^a	36,7 ± 1,86 ^a	40,16 ± 0,84 ^a	39,62 ± 1,37 ^a	38,93 ± 1,22 ^a
<i>enzymy</i>					
ALP (μkat/l)	0,41 ± 0,05 ^b	0,84 ± 0,13^{ac}↑	0,47 ± 0,05 ^{bc}	0,74 ± 0,12^a↑	0,48 ± 0,04 ^{ab}
ALT (μkat/l)	0,63 ± 0,07 ^{ab}	0,92 ± 0,17 ^{ab}	0,55 ± 0,10 ^b	0,68 ± 0,07 ^{ab}	0,86 ± 0,09 ^a
AST (μkat/l)	3,75 ± 0,26 ^a	4,05 ± 0,41 ^a	3,63 ± 0,26 ^a	3,52 ± 0,24 ^a	3,74 ± 0,36 ^a
LDH (μkat/l)	8,15 ± 1,78 ^a	10,22 ± 1,65 ^a	5,83 ± 1,24 ^a	6,58 ± 1,44 ^a	8,10 ± 1,56 ^a
lipáza (μkat/l)	0,52 ± 0,07 ^c	1,84 ± 0,17^a↑	1,35 ± 0,09^{ab}↑	1,15 ± 0,10^b↑	1,66 ± 0,14^a↑
kreatinkináza (μkat/l)	140,65 ± 11,67 ^a	162,25 ± 14,62 ^a	151,39 ± 13,72 ^a	168,81 ± 14,59 ^a	162,46 ± 19,08 ^a
amyláza (μkat/l)	0,53 ± 0,08 ^a	0,40 ± 0,09 ^a	0,36 ± 0,09 ^a	0,36 ± 0,08 ^a	0,39 ± 0,09 ^a
ChE (μkat/l)	1,51 ± 0,22 ^b	3,35 ± 0,53^a↑	1,25 ± 0,15 ^b	2,08 ± 0,28 ^{ab}	2,38 ± 0,50 ^{ab}

Poznámka: ALT – alaninaminotransferáza, ALP – alkalická fosfatáza, AST – aspartátaminotransferáza, ChE – butyrylcholinesteráza, LDH – laktátdehydrogenáza

Další ukazatele oxidativního stresu byly analyzovány v krevní plazmě. Jednalo se o poškození lipidů (TBARS), poškození DNA a proteinů. Byla také analyzována aktivita ceruloplasminu a FRAP. Výsledky jsou uvedeny v grafu č. 2. V případě výsledků FRAP, ceruloplasminu a poškození DNA nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly mezi skupinami ($p > 0,05$). Signifikantní rozdíly byly ovšem zjištěny v případě poškození proteinů a lipidů. Při analýze karbonylových sloučenin, které indikují poškození proteinů v důsledku oxidativního stresu, došlo k signifikantnímu zvýšení ($p < 0,05$) u všech experimentálních skupin. Nejvyšší zvýšení bylo ve skupinách vystavených glyfosátu a AMPA v koncentraci 3500 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Signifikantní zvýšení ($p < 0,05$) lipidní peroxidace v plazmě v porovnání s kontrolní skupinou bylo zaznamenáno pouze v nejvyšší testované koncentraci AMPA.

Graf č. 1. Koncentrace tyroxinu (T4) v plazmě kapra. Mezi skupinami nebyly zjištěny signifikantní rozdíly ($p > 0,05$). Vodorovné čáry označují medián; křížek označuje průměr, boxy sahají od 25. do 75. percentilu rozdělení hodnot každé skupiny, horní a dolní chybové úsečky označují nejmenší hodnotu v rámci 1,5násobku interkvartilového rozpětí pod 25., resp. 75. percentilem.



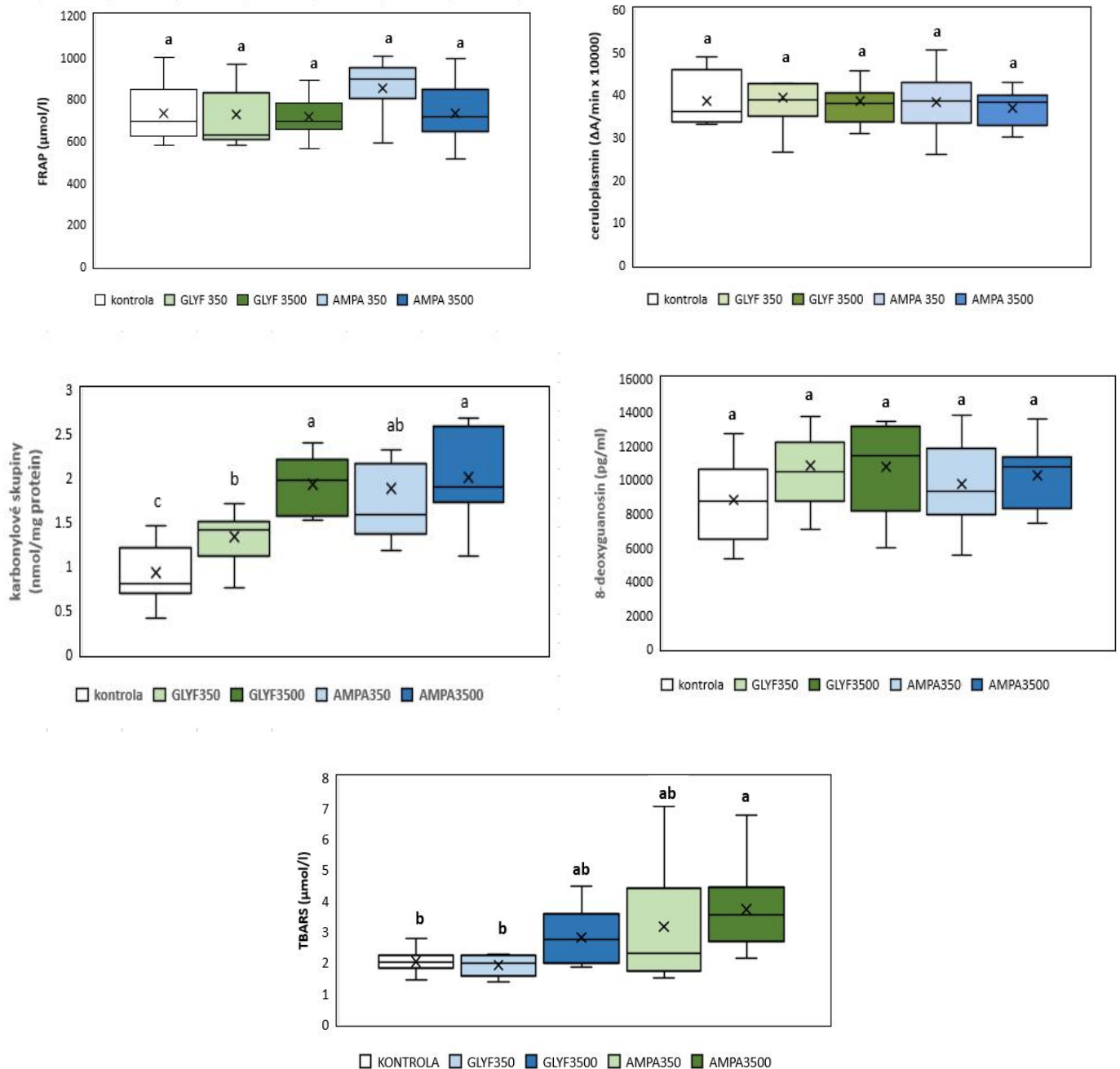
Tabulka č. 4. Ukazatele oxidativního stresu v tkáních (průměr \pm střední chyba průměru). Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou označeny rozdílnými písmeny ($p < 0,05$). V případě signifikantního rozdílu v porovnání s kontrolní skupinou je použito tučné písmo a šipka indikuje směr změny (tzn. zvýšení/snížení).

	kontrola	GLYF 350	GLYF 3500	AMPA 350	AMPA 3500
<i>játra</i>					
CAT	608,2 \pm 53,16 ^a	461,41 \pm 59,45 ^a	678,83 \pm 44,60 ^a	676,03 \pm 48,21 ^a	599,79 \pm 68,13 ^a
GPx	149,11 \pm 9,25 ^a	134,12 \pm 7,82 ^a	123,35 \pm 11,58 ^a	139,76 \pm 7,42 ^a	102,99\pm11,85^b↓
GR	4,65 \pm 0,35 ^a	3,42 \pm 0,47 ^a	4,42 \pm 0,59 ^a	3,56 \pm 0,41 ^a	4,13 \pm 0,49 ^a
GST	155,07 \pm 13,99 ^a	165,64 \pm 18,10 ^a	184,74 \pm 20,06 ^a	160,67 \pm 8,70 ^a	124,16 \pm 15,72 ^a
TBARS	4,93 \pm 0,56 ^a	6,64 \pm 1,32 ^a	12,94 \pm 6,40 ^a	6,07 \pm 1,39 ^a	5,71 \pm 1,89 ^a
<i>kaudální ledvina</i>					
CAT	381,03 \pm 25,35 ^a	461,41 \pm 59,45 ^a	678,83 \pm 44,60 ^a	676,03 \pm 48,21 ^a	599,79 \pm 68,13 ^a
GPx	220,19 \pm 12,39 ^a	216,26 \pm 11,86 ^a	214,93 \pm 8,82 ^a	219,10 \pm 10,71 ^a	206,19 \pm 8,16 ^a
GST	381,03 \pm 25,35 ^a	296,75 \pm 58,48 ^a	263,40 \pm 47,65 ^a	307,01 \pm 50,95 ^a	292,33 \pm 48,96 ^a
TBARS	1,52 \pm 0,26 ^a	1,27 \pm 0,30 ^a	0,92 \pm 0,15 ^a	1,05 \pm 0,13 ^a	1,15 \pm 0,12 ^a
<i>žábry</i>					
CAT	5,36 \pm 0,42 ^a	4,93 \pm 0,42 ^a	4,99 \pm 0,36 ^a	4,73 \pm 0,22 ^a	4,79 \pm 0,2 ^a
GPx	56,63 \pm 4,26 ^a	55,30 \pm 7,16 ^a	63,27 \pm 8,00 ^a	48,75 \pm 4,5 ^a	59,65 \pm 3,91 ^a

GR	2,07 ± 0,10 ^a	2,46 ± 0,19 ^a	2,25 ± 0,19 ^a	1,99 ± 0,18 ^a	1,77 ± 0,16 ^a
GST	79,61 ± 4,41 ^a	82,25 ± 4,67 ^a	78,59 ± 3,38 ^a	76,87 ± 2,94 ^a	79,64 ± 6,91 ^a
TBARS	0,71 ± 0,17 ^a	0,80 ± 0,19 ^a	0,68 ± 0,23 ^a	0,79 ± 0,11 ^a	1,26 ± 0,18^b↑

Poznámka: CAT – kataláza (μmol/min/mg protein), GPx – glutathionperoxidáza (nmol/min/mg protein), GR – glutathionreduktáza (nmol/min/mg protein), GST – glutathion-S-transferáza (nmol/min/mg protein), TBARS – lipoperoxidace stanovená metodou využívající kyselinu thiobarbiturovou (nmol/g tkáně)

Graf č. 2. Výsledky ukazatelů oxidativního stresu v krevní plazmě (FRAP, ceruloplasmin, poškození proteinů – měření karbonylových skupin, poškození DNA – měření 8-deoxyguanosinu a poškození lipidů – měření metodou TBARS). Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou označeny rozdílnými písmeny ($p < 0,05$). Vodorovné čáry označují medián; křížek označuje průměr, boxy sahají od 25. do 75. percentilu rozdělení hodnot každé skupiny, horní a dolní chybové úsečky označují nejmenší hodnotu v rámci 1,5násobku interkvartilového rozpětí pod 25., resp. 75. percentilem.



Pro komplexní zhodnocení byla prováděna i transkriptomová analýza. Zaměřili jsme se na geny zodpovědné za regulaci štítné žlázy, geny imunitní odpovědi, oxidativního stresu, markery regulace červených krvinek, neurotransmise a stresové aktivity. Při analýze genové exprese v jednotlivých orgánech byly zaznamenány signifikantní změny u obou testovaných látek. Překvapivé jsou také četné signifikantní změny v experimentálních skupinách vystavených environmentálně relevantním koncentracím. Detailní výsledky jsou v tabulkách č. 5 až 9.

Tabulka č. 5. Transkripce mRNA cílových genů v játrech (průměr ± střední chyba průměru). Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou označeny rozdílnými písmeny ($p < 0,05$). V případě signifikantního rozdílu v porovnání s kontrolní skupinou je použito tučné písmo a šipka indikuje směr změny (tzn. zvýšení/snížení).

	kontrola	GLYF 350	GLYF 3500	AMPA 350	AMPA 3500
<i>Geny spojené se záněty</i>					
<i>cyp1a</i>	0,0087±0,0027 ^a	0,0060±0,0015 ^{ab}	0,0039 ±0,0009 ^b	0,0753±0,0313 ^a	0,0666±0,034 ^{ab}
<i>cyp3a4</i>	0,3469±0,0977 ^{ab}	0,2152±0,06351 ^{ab}	0,3997±0,0899 ^a	0,2166±0,1182 ^b	0,1787±0,054 ^{ab}
<i>cyp1b</i>	0,0022±0,0004 ^a	0,0023±0,0004 ^a	0,0019±0,0005 ^a	0,0017±0,0006 ^a	0,0025±0,0004 ^a
<i>il1b</i>	0,0008±0,0003 ^a	0,0000±0,0000^b↓	0,0000±0,0000^b↓	0,0000±0,0000 ^{ab}	0,0000±0,0000 ^{ab}
<i>tnfa</i>	0,0000±0,0000 ^a	0,0000±0,0000 ^a	0,0003 ±0,0001 ^a	0,0000±0,0000 ^a	0,0001 ±0,0000 ^a
<i>Geny spojené s oxidačním stresem a detoxikací</i>					
<i>gr</i>	0,0013 ± 0,0003 ^a	0,0013±0,0001 ^a	0,0013±0,0001 ^a	0,0012±0,0004 ^a	0,0011±0,0002 ^a
<i>cat</i>	0,4076 ±0,1039 ^a	0,4123±0,0404 ^a	0,4019±0,0617 ^a	0,4256±0,0803 ^a	0,3711±0,0386 ^a
<i>gst</i>	0,0161±0,0043 ^a	0,0082±0,0020 ^a	0,0177±0,0018 ^a	0,0000±0,0000 ^a	0,0161±0,0015 ^a
<i>gpx</i>	0,2105±0,0985 ^a	0,1194±0,0263 ^a	0,1464±0,0187 ^a	0,1763±0,0754 ^a	0,1439 ±0,0258 ^a
<i>hsp70</i>	0,0174±0,0057 ^a	0,0044±0,0019^b↓	0,0157±0,0041 ^a	0,0138±0,0041 ^a	0,0091±0,0024 ^{ab}
<i>sod</i>	0,1922±0,0704 ^a	0,1220±0,0211 ^a	0,1616±0,0378 ^a	0,1885±0,0785 ^a	0,1435±0,0165 ^a
<i>Geny spojené s regulací hormonů štítné žlázy</i>					
<i>dio1</i>	0,1597±0,0672 ^a	0,0706±0,0195 ^a	0,1046±0,0177 ^a	0,1167±0,0316 ^a	0,0679±0,0091 ^a
<i>dio2</i>	0,1093±0,0452 ^b	0,0805±0,0196 ^b	0,2735±0,0333^a↑	0,1508±0,0427 ^b	0,1139±0,0336 ^b
<i>thrb</i>	0,0059±0,0005 ^a	0,0035±0,0006 ^a	0,0040±0,0006 ^a	0,0049±0,0006 ^a	0,0053±0,0006 ^a
<i>thra</i>	0,0359±0,0037 ^a	0,0269±0,0056^b↓	0,0280±0,0025^b↓	0,0289±0,0047 ^{ab}	0,0298±0,0034 ^{ab}
<i>Geny spojené s růstem</i>					
<i>epo</i>	0,0008±0,0003 ^a	0,0004±0,0001 ^a	0,0008±0,0003 ^a	0,0007±0,0003 ^a	0,0007±0,0002 ^a

Tabulka č. 6. Transkripce mRNA cílových genů v mozku (průměr ± střední chyba průměru). Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou označeny rozdílnými písmeny ($p < 0,05$). V případě signifikantního rozdílu v porovnání s kontrolní skupinou je použito tučné písmo a šipka indikuje směr změny (tzn. zvýšení/snížení).

	kontrola	GLYF 350	GLYF 3500	AMPA 350	AMPA 3500
<i>Geny spojené se záněty</i>					
<i>cyp1b</i>	0,00012 ± 0,0003 ^a	0,0008 ± 0,0001 ^{ab}	0,0004 ± 0,0001^b↓	0,0007 ± 0,0002 ^{ab}	0,0005 ± 0,0002^b↓
<i>cyp1a</i>	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0000 ± 0,0000 ^a	0,0001 ± 0,0000 ^{ab}	0,0000 ± 0,0000^b↓	0,0001 ± 0,0000 ^a
<i>cyp3a4</i>	0,0002 ± 0,0000 ^a	0,0000 ± 0,000^b↓	0,0001 ± 0,0000 ^{ab}	0,0000 ± 0,0000 ^{ab}	0,0001 ± 0,0000 ^a
<i>il1b</i>	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0002 ± 0,0000 ^a	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0001 ± 0,0000 ^a
<i>Geny spojené s neurotransmisí</i>					
<i>ache</i>	0,0203 ± 0,0043 ^a	0,0002 ± 0,0000^c↓	0,0009 ± 0,0007^{cd}↓	0,0062 ± 0,0038^{bd}↓	0,0113 ± 0,0047^b↓
<i>Geny spojené s oxidačním stresem a detoxikací</i>					
<i>hsp70</i>	0,0008 ± 0,0002 ^a	0,0001 ± 0,0000^c↓	0,0001 ± 0,0000^{cd}↓	0,0001 ± 0,0000^b↓	0,0002 ± 0,0000^{bd}↓
<i>cat</i>	0,0111 ± 0,0034 ^a	0,0028 ± 0,0003^b↓	0,0071 ± 0,0024 ^{ab}	0,01248 ± 0,0042 ^a	0,0104 ± 0,0026 ^a

<i>gr</i>	0,0006 ± 0,0000 ^a	0,0005 ± 0,0000 ^a	0,0005 ± 0,0000 ^a	0,0006 ± 0,0000 ^a	0,0007 ± 0,0000 ^a
<i>gpx</i>	0,0273 ± 0,0050 ^a	0,0350 ± 0,0064 ^a	0,0291 ± 0,0074 ^a	0,0266 ± 0,0068 ^a	0,0269 ± 0,0061 ^a
<i>gst</i>	0,0024 ± 0,0005 ^a	0,0009 ± 0,0001^b↓	0,0042 ± 0,0026 ^{ab}	0,0022 ± 0,0006 ^{ab}	0,0029 ± 0,0000 ^a
<i>sod</i>	0,0129 ± 0,0035 ^a	0,0033 ± 0,0002 ^a	0,0057 ± 0,0020 ^a	0,0097 ± 0,0032 ^a	0,0096 ± 0,0025 ^a

Tabulka č. 7. Transkripce mRNA cílových genů v tkáních žaber (průměr ± střední chyba průměru). Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou označeny rozdílnými písmeny (p < 0,05). V případě signifikantního rozdílu v porovnání s kontrolní skupinou je použito tučné písmo a šipka indikuje směr změny (tzn. zvýšení/snížení).

	kontrola	GLYF 350	GLYF 3500	AMPA 350	AMPA 3500
<i>Geny spojené se záněty</i>					
<i>cyp1a</i>	0,0004±0,0001 ^b	0,0010± 0,0005 ^{ab}	0,0006±0,0001 ^{ab}	0,0009±0,0001^a↑	0,0010±0,0002^a↑
<i>cyp3a4</i>	0,0015±0,0005 ^a	0,0015±0,0003 ^a	0,0018±0,0004 ^a	0,0011±0,0001 ^a	0,0013±0,0002 ^a
<i>cyp1b</i>	0,0000± 0,0000 ^a	0,0001± 0,0000 ^a	0,0001± 0,0000 ^a	0,0000± 0,0000 ^a	0,0000± 0,0000 ^a
<i>il1b</i>	0,0003±0,0001 ^a	0,0001± 0,0000^b↓	0,0002±0,0001^b↓	0,0001±0,0000^b↓	0,0001±0,0000^b↓
<i>il10</i>	0,0006±0,0001 ^{ab}	0,0005± 0,0000 ^{ab}	0,0008±0,0001 ^b	0,0005±0,0000 ^{ab}	0,0004±0,0000 ^a
<i>tnfa</i>	0,0000± 0,0000 ^{ab}	0,0000± 0,0000 ^{ab}	0,0000± 0,0000 ^a	0,0000± 0,0000 ^b	0,0000± 0,0000 ^b
<i>Geny spojené s oxidačním stresem a detoxikací</i>					
<i>hsp70</i>	0,0006±0,0002 ^a	0,0003± 0,0001 ^{ab}	0,0004±0,0002 ^{ab}	0,0002±0,0000^b↓	0,0002±0,0000^b↓
<i>cat</i>	0,0029± 0,0004 ^b	0,0026 ±0,0003 ^b	0,0034±0,0003 ^{ab}	0,0030 ±0,0002 ^{ab}	0,0037±0,0003^a↑
<i>gpx</i>	0,0312±0,0045 ^a	0,0224±0,0054 ^a	0,0334±0,0017 ^a	0,0281±0,0037 ^a	0,0332±0,0028 ^a
<i>gr</i>	0,0010±0,0002 ^b	0,0013±0,0003 ^{ab}	0,0011±0,0001 ^{ab}	0,0011±0,0001 ^{ab}	0,0016±0,0002^a↑
<i>gst</i>	0,0015±0,0002 ^b	0,0012±0,0002 ^b	0,0019±0,0002 ^{ab}	0,0016±0,0001 ^b	0,0020±0,0002^a↑
<i>sod</i>	0,0038±0,0003 ^a	0,0029±0,0007 ^a	0,0038±0,0003 ^a	0,0038±0,0004 ^a	0,0042±0,0004 ^a
<i>Geny spojené s neurotransmisí</i>					
<i>ache</i>	0,0003± 0,0000 ^a	0,0004±0,0000 ^{ab}	0,0003±0,0000 ^{ab}	0,0003± 0,0000 ^{ab}	0,0004± 0,0001^b↑
<i>Geny spojené s regulací hormonů štítné žlázy</i>					
<i>dio1</i>	0,0003± 0,0000 ^{ab}	0,0004±0,0002 ^{ab}	0,0004±0,0001 ^a	0,0003± 0,0000 ^b	0,0003± 0,0000 ^{ab}
<i>dio2</i>	0,0011 ± 0,0001 ^a	0,0085 ±0,0069 ^a	0,0014 ± 0,0008 ^a	0,0013± 0,0003 ^a	0,0029± 0,0016 ^a
<i>thra</i>	0,0013±0,0008 ^a	0,0019±0,0010 ^a	0,0009± 0,0002 ^a	0,0008±0,0001 ^a	0,0008±0,0001 ^a
<i>thrb</i>	0,0097 ±0,0065 ^a	0,0120±0,0063 ^a	0,0041± 0,0006 ^a	0,0037±0,0004 ^a	0,0040±0,0007 ^a
<i>Geny spojené s růstem</i>					
<i>epo</i>	0,0001± 0,0000 ^{ab}	0,0001± 0,0000 ^a	0,0002 ± 0,0000 ^b	0,0001 ± 0,0000 ^{ab}	0,0001±0,0000 ^a

Tabulka č. 8. Transkripce mRNA cílových genů ve svalu (průměr ± střední chyba průměru). Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou označeny rozdílnými písmeny ($p < 0,05$). V případě signifikantního rozdílu v porovnání s kontrolní skupinou je použito tučné písmo a šipka indikuje směr změny (tzn. zvýšení/snížení).

	kontrola	GLYF 350	GLYF 3500	AMPA 350	AMPA 3500
<i>Geny spojené se záněty</i>					
<i>cyp1b</i>	0,0002 ± 0,0001 ^a	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0001 ± 0,0000 ^{ab}	0,0001 ± 0,0000^b↓	0,0001 ± 0,0000 ^{ab}
<i>cyp1a</i>	0,0000 ± 0,0000 ^{ab}	0,0000 ± 0,0000 ^b	0,0000 ± 0,0000 ^a	0,0000 ± 0,0000 ^b	0,0000 ± 0,0000 ^{ab}
<i>cyp3a4</i>	0,0000 ± 0,0000 ^a	0,0000 ± 0,0000 ^a	0,0000 ± 0,0000 ^a	0,0000 ± 0,0000 ^a	0,0000 ± 0,0000 ^a
<i>il1b</i>	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0002 ± 0,0000 ^{ab}	0,0001 ± 0,0000 ^{ab}	0,0004 ± 0,0003^b↑	0,0001 ± 0,0000 ^{ab}
<i>Geny spojené s oxidačním stresem</i>					
<i>hsp70</i>	0,0004 ± 0,0001 ^a	0,0002 ± 0,0000 ^{ac}	0,0001 ± 0,0000^b↓	0,0001 ± 0,0000^b↓	0,0002 ± 0,0000^{bc}↓
<i>cat</i>	0,0019 ± 0,0003 ^a	0,0014 ± 0,0002 ^{ab}	0,0013 ± 0,0002 ^{ab}	0,0011 ± 0,0001^b↓	0,0013 ± 0,0001 ^{ab}
<i>gr</i>	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0000 ± 0,0000 ^a	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0000 ± 0,0000 ^a	0,0000 ± 0,0000 ^a
<i>gpx</i>	0,0017 ± 0,0003 ^a	0,0010 ± 0,0002 ^a	0,0022 ± 0,0004 ^a	0,0011 ± 0,0002 ^a	0,0012 ± 0,0003 ^a

<i>gst</i>	0,0005 ± 0,0000 ^a	0,0003 ± 0,0000 ^a	0,0004 ± 0,0000 ^a	0,0004 ± 0,0000 ^a	0,0003 ± 0,0000 ^a
<i>sod</i>	0,0073 ± 0,0011 ^a	0,0040 ± 0,0009 ^a	0,0079 ± 0,0023 ^a	0,0048 ± 0,0005 ^a	0,0053 ± 0,0009 ^a

Tabulka č. 9. Transkripce mRNA cílových genů v ledvinách (průměr ± střední chyba průměru). Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou označeny rozdílnými písmeny ($p < 0,05$). V případě signifikantního rozdílu v porovnání s kontrolní skupinou je použito tučné písmo a šipka indikuje směr změny (tzn. zvýšení/snížení).

	kontrola	GLYF 350	GLYF 3500	AMPA 350	AMPA 3500
<i>Geny spojené se záněty</i>					
<i>cyp1a</i>	0,0000±0,0000 ^a	0,0013± 0,0012 ^a	0,0000±0,0000 ^a	0,0000±0,0000 ^a	0,0000±0,0000 ^a
<i>cyp3a4</i>	0,0000±0,0000 ^a	0,0000±0,0000 ^a	0,0000±0,0000 ^a	0,0000±0,0000 ^a	0,0000±0,0000 ^a
<i>cyp1b</i>	0,0003±0,0001 ^a	0,0001±0,0000 ^a	0,0006±0,0004 ^a	0,0000±0,0003 ^a	0,0000±0,0004 ^a
<i>il1b</i>	0,0002±0,0000 ^a	0,0000± 0,0000^b↓	0,0001±0,0000 ^{ab}	0,0001±0,0000^b↓	0,0001±0,0000^b↓
<i>tnfa</i>	0,0000± 0,0000 ^a	0,0000± 0,0000 ^a	0,0000± 0,0000 ^a	0,0000± 0,0000 ^a	0,0000± 0,0000 ^a
<i>mmp9</i>	0,0006±0,0001 ^a	0,0003± 0,0000 ^a	0,0003± 0,0000 ^a	0,0005 ±0,0001 ^a	0,0003±0,0001 ^a
<i>Geny spojené s oxidačním stresem</i>					
<i>hsp70</i>	0,0003±0,0001 ^a	0,0004± 0,0001 ^a	0,0002±0,0001 ^a	0,0002±0,0000 ^a	0,0002±0,0000 ^a
<i>cat</i>	0,0118±0,0030 ^a	0,0172±0,0030 ^a	0,0137±0,0034 ^a	0,0179±0,0047 ^a	0,0141±0,0038 ^a
<i>gpx</i>	0,0253±0,0040 ^a	0,0069±0,0017^b↓	0,0278±0,0061 ^a	0,0199±0,0043 ^a	0,0194±0,0039 ^a
<i>gr</i>	0,0007±0,0000 ^{ab}	0,0005±0,0000 ^b	0,0009±0,0000 ^a	0,0007±0,0000 ^{ab}	0,0006±0,0000 ^{ab}
<i>gst</i>	0,0026±0,0005 ^a	0,0028±0,0004 ^a	0,0036±0,0009 ^a	0,0033±0,0008 ^a	0,0030±0,0005 ^a
<i>sod</i>	0,0133±0,0033 ^a	0,0109±0,0027 ^a	0,0154±0,0040 ^a	0,0162±0,0039 ^a	0,0129±0,0035 ^a
<i>Geny spojené s regulací hormonů štítné žlázy</i>					
<i>dio1</i>	0,0007± 0,0002 ^a	0,0005±0,0000 ^a	0,0008±0,0001 ^a	0,0008±0,0001 ^a	0,0008±0,0002 ^a
<i>dio2</i>	0,0021± 0,0009 ^a	0,0038± 0,0010 ^a	0,0057± 0,0015 ^a	0,0091± 0,0031 ^a	0,0054 ± 0,0016 ^a
<i>thra</i>	0,0017±0,0004 ^a	0,0025±0,0004 ^a	0,0024± 0,0004 ^a	0,0024±0,0007 ^a	0,0015±0,0003 ^a
<i>thrb</i>	0,0103±0,0034 ^{ab}	0,0167±0,0028 ^a	0,0096±0,0015 ^{ab}	0,0149±0,0044 ^{ab}	0,0073±0,0020 ^b
<i>Geny spojené s růstem</i>					
<i>epo</i>	0,0001± 0,0000 ^a	0,0001± 0,0000 ^a	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0000±0,0000 ^a

Diskuze

V posledních letech jsou pesticidy významným a často diskutovaným znečišťujícím faktorem vodních ekosystémů. Většina z nich tvoří organické sloučeniny, které přetrvávají v zemědělských půdách jako rezidua v důsledku intenzivního použití (Bhandari et al., 2020; Maggi et al., 2020). Glyfosát [N-(fosfonomethyl)glycin] je nejčastěji používanou účinnou složkou herbicidů díky své schopnosti efektivně eliminovat široké spektrum plevelů. S roční globální spotřebou přesahující 600 000 tun a očekávaným nárůstem na více než 900 000 tun do roku 2025 patří mezi nejvýznamnější agrochemikálie (Maggi et al., 2019). V České republice došlo za posledních 20 let k výraznému nárůstu používání glyfosátu, a to z 5 000 kg na více než 500 000 kg ročně. Dle Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského činilo aplikované množství glyfosátu v roce 2023 celkem 504 311 kg (ÚKZÚZ, 2024).

Glyfosát působí jako herbicid inhibicí enzymu 5-enolpyruvylshikimát-3-fosfát syntázy, který katalyzuje syntézu esenciálních aromatických aminokyselin v rostlinách a některých mikroorganismech (Herrmann and Waever, 1999). Z různých studií vyplývá, že glyfosát a jeho složky mohou mít na ryby negativní účinky. Bylo pozorováno poškození DNA, zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku a lipidová peroxidace, což vede k oxidačnímu stresu. Glyfosát také způsobuje inhibici enzymu acetylcholinesterázy a narušení vývoje srdce a cév. Dlouhodobá expozice glyfosátu byla spojena s genetickou toxicitou, snížením plodnosti a změnami v metabolických procesech. Dále bylo zjištěno, že AMPA se může akumulovat v různých orgánech ryb, například ve střevech, játrech, mozku a svalech (Chanu et al., 2023; Liu et al., 2022; Lu et al., 2022).

AMPA, hlavní metabolit glyfosátu, se v ekosystémech šíří v důsledku intenzivního používání glyfosátu (Grandcoin et al., 2017). Na rozdíl od glyfosátu má AMPA nižší rozpustnost ve vodě a delší dobu rozkladu v půdě. Je detekován ve sladkovodních ekosystémech, sedimentech a suspendovaných částicích, přičemž koncentrace často překračují hladiny glyfosátu (Battaglin et al., 2005).

Dosavadní toxikologické studie na účinky glyfosátu a AMPA jsou omezené. Cílem této práce bylo proto komplexně posoudit vliv těchto látek na vybrané zdravotní ukazatele kapra obecného (*Cyprinus carpio*) po subchronické perorální expozici. Testované látky byly podávány prostřednictvím speciálního krmiva po dobu čtyř týdnů. Studie zahrnovala analýzu širokého spektra biomarkerů, jako jsou morfologické, biochemické a hematologické parametry krve, a rovněž sledovala ukazatele oxidativního stresu v krevní plazmě, játrech, kaudální ledvině a žábrech. Dále byla zkoumána genová exprese vybraných genů v játrech, mozku, ledvinách a žábrech.

V rámci naší studie byly nejvýraznější statisticky významné změny ve srovnání s kontrolní skupinou zaznamenány v experimentální skupině exponované glyfosátem. Koncentrace glyfosátu 3500 µg/kg vedla ke zvýšení počtu leukocytů a lymfocytů, což je v souladu se závěry studie kolektivu autorů Chanu et al. (2023), kde byla rovněž pozorována leukocytóza. Na rozdíl od této studie však v našem experimentu nedošlo k signifikantním změnám v ukazatelích červené krevní řady.

Při biochemickém vyšetření krevní plazmy byly identifikovány významné změny ve sledovaných ukazatelích jaterních funkcí po expozici glyfosátem. Environmentální koncentrace glyfosátu 350 µg/kg vedla ke zvýšení aktivity ALP, dále byla pozorována i zvýšená aktivita ALT, což naznačuje citlivost jaterní tkáň na toxické látky. Překvapivě tyto změny nebyly ve vyšší koncentraci testovaného herbicidu. Aktivita lipázy se významně zvýšila ve všech testovaných koncentracích glyfosátu i AMPA. Změny jaterních enzymů byly zaznamenány i v jiných vědeckých studiích. Například Ma et al. (2019) zaznamenali zvýšené aktivity u kapra obecného po 7denní expozici glyfosátem v koncentracích 52,08 a 104,15 mg/l. Obdobně také studie Ferreira et al. (2010) potvrdila nárůst aktivit ALP a AST u ryb druhu *Rhamdia quelen* po expozici uvedenému herbicidu. AST a ALT se často využívají jako spolehlivé indikátory poškození tkáň a ruptury buněk v důsledku toxické expozice (Nemcsok and Benedeczy, 1990). Zvýšení aktivit AST a ALT také může představovat metabolický kompenzační mechanismus, který umožňuje rybám adaptaci na intenzivnější metabolismus sacharidů a bílkovin vyvolaný expozicí toxinům.

Řada toxikologických studií potvrdila, že pesticidy přítomné ve vodě mohou u vodních organismů vyvolávat oxidativní stres. Tento stav vzniká v důsledku nerovnováhy mezi produkcí reaktivních forem kyslíku a dusíku a mechanismy, které je neutralizují. Oxidativní stres může poškodit buněčné struktury a narušit funkci orgánů, což vede k negativním vlivům na zdraví těchto necílových organismů (Blahova et al., 2020; Vaclavik et al., 2022). V naší studii byl zaznamenán největší počet statisticky významných změn v experimentální skupině vystavené AMPA v koncentraci 3500 µg/kg. Bylo prokázáno snížení aktivity GPx v játrech a zvýšení lipoperoxidace v žábřích. Změny aktivit detoxikačních a antioxidačních enzymů v jaterních tkáních naznačují možné poškození uvedené tkáň, jak vyplývá částečně i z výsledků biochemického vyšetření. Tyto nálezy také poukazují na rostoucí potřebu obranných mechanismů v organismu, což je klíčové pro minimalizaci poškození významných biomolekul (Blahova et al., 2020). Naše závěry se ale částečně od výzkumů autorského kolektivu Cheron et al. (2022), kde nebyl zjištěn vliv AMPA na GPx. Naše studie také neprokázala žádné změny v aktivitě detoxikačního enzymu GST, tak jak je například popisováno autory De Castro et al. (2022). Kromě hodnocení aktivit antioxidačních a detoxikačních enzymů jsme se v naší studii zaměřili i na hodnocení poškození významných biomolekul jako jsou proteiny, DNA a lipidy v plazmě. Zde došlo ke zvýšení TBARS v experimentální skupině vystavené nejvyšší koncentraci AMPA, a to jak při analýze lipoperoxidace v žábřech, tak i v plazmě. Zvýšení lipoperoxidace je popisováno například ve studii autorů De Castro et al (2022), ale po expozici glyfosátem. Dále jsme v našem experimentu mimo jiné zaznamenali i zvýšení obsahu karbonylových sloučenin indikujících poškození proteinů, a to ve všech experimentálních skupinách.

Četné změny byly zaznamenány i při transkriptomové analýze. Naše výsledky jsou ve shodě s ostatními autory, kteří prováděli experimenty na různých vodních organismech a věnovali se problematice změn genové exprese (Prevot-D'Alvise et al., 2013; Socha et al., 2021).

Závěr

Výsledky naší studie potvrdily četné změny po expozici glyfosátem, a i jeho metabolitu AMPA. Statisticky významné rozdíly byly zjištěny především v experimentálních skupinách vystavených nejvyšším testovaným koncentracím, tedy 3500 µg/kg glyfosátu a 3500 µg/kg AMPA. Tyto koncentrace vedly k ovlivnění metabolismu bílkovin, zvýšenému oxidačnímu stresu a změnám v expresi genů. Bylo prokázáno, že expozice glyfosátem a AMPA může indukovat imunitní reakce a narušení metabolických procesů, což naznačuje potenciální riziko reziduí těchto látek pro necílové vodní organismy. Významné změny byly rovněž zaznamenány v genové expresi, která ovlivňuje oxidační stres, hormonální regulaci a neurotransmisi. Vzhledem k těmto výsledkům by bylo vhodné provést dlouhodobé studie zaměřené na analýzu chronických účinků expozice glyfosátem a jeho metabolitu AMPA na různé životní fáze ryb a zahrnout kombinované expozice pro lepší simulaci reálných podmínek.

Tato práce byla finančně podpořena ITA VETUNI (projekt č. 2024ITA26).

Literatura

- Alipour, Z., Panahpour, E., Mojadam, M., Gholami, A., Ghanavati, N. 2024. Water hardness affecting glyphosate efficiency for weed control and tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) yield production. *Journal of Trace Elements and Minerals* 10: 100191.
- Antunes, A.M., Rocha, T.L., Pires, F.S., de Freitas, M.A., Leite, V.R.M.C., Arana, S., Moreira, P.C., Sabóia-Morais, S.M.T. 2017. Gender-specific histopathological response in guppies *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate or its metabolite Aminomethylphosphonic acid. *Journal of Applied Toxicology* 37: 1098-1107.
- Battaglin, W.A., Koplín, D.W., Scribner, E.A., Kuivila, K.M., Sandstrom, M.W. 2005. Glyphosate, other herbicides, and transformation products in midwestern streams, 2002. *Journal of the American Water Resources Association* 41: 323-332.
- Bhandari, G., Atreya, K., Scheepers, P.T.J., Geissen, V. 2020. Concentration and distribution of pesticide residues in soil: Non-dietary human health risk assessment. *Chemosphere* 253: 126594.
- Blahova, J., Dobsikova, R., Enevova, V., Modra, H., Plhalova, L., Hostovsky, M., Marsalek, P., Mares, J., Skoric, M., Vecerek, V., Svobodova, Z. 2020. Comprehensive fitness evaluation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) after twelve weeks of atrazine exposure. *Science of the Total Environment* 718: 135059.
- Chanu, KR., Mangang, YA., Debbarma, S., Pandey, PK. 2023. Effect of glyphosate-based herbicide roundup on hemato-biochemistry of *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) and susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection. *Environmental Science and Pollution Research* 30: 110298-110311.
- Cheron, M., Costantini, D., Angelier, F., Ribout, C., Brischoux, F. 2022. Aminomethylphosphonic acid (AMPA) alters oxidative status during embryonic development in an amphibian species. *Chemosphere* 287: 131882.
- de Brito Rodrigues, L., Costa, G.G., Thá, E.L., da Silva, L.R., de Oliveira, R., Leme, D.M., Cestari, M.M., Grisolia, C.K., Valadares, M.C., de Oliveira, G.A.R. 2019. Impact of the glyphosate-based commercial herbicide, its components and its metabolite AMPA on non-target aquatic organisms. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 842: 94-101.
- De Castro, B.D., Lanés, L.E.K., Godoy, R.S., Maltchik, L., Oliveira, G.T. 2022. Development stage-dependent oxidative stress responses to the exposure to roundup original in a neotropical annual killifish. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 95: 103976.

- Ferreira, D., Costa da Motta, A., Kreutz, L.C., Toni, C., Loro, V.L., Barcellos, L.J.G. 2010. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chemosphere*, 79: 914-921.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup Herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 167: 33-120.
- Grandcoin, A., Piel, S., Baurès, E. 2017. Amino Methyl Phosphonic acid (AMPA) in natural waters: its sources, behavior and environmental fate. *Water Research* 117: 187-197.
- Haluzová, I., Modrá, H., Blahová, J., Maršálek, P., Šíroká, Z., Groch, L., Svobodová, Z. 2010. Effects of subchronic exposure to Spartakus (prochloraz) on common carp *Cyprinus carpio*. *Neuroendocrinology Letters* 31: 105-113.
- Herrmann, K.M., Weaver, L.M. 1999. The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 473-503.
- Liu, Z., Shangguan, Y., Zhu, P., Sultan, Y., Feng, Y., Li, X., Ma, J. 2022. Developmental toxicity of glyphosate on embryo-larval zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 236: 113493.
- Lu, J., Wang, W., Zhang, C., Xu, W., Chen, W., Tao, L., Li, Z., Cheng, J., Zhang, Y. 2022. Characterization of glyphosate-induced cardiovascular toxicity and apoptosis in zebrafish. *Science of the Total Environment* 851: 158308.
- Ma, J., Zhu, J., Wang, W., Ruan, P., Rajeshkumar, S., Li, X. 2019. Biochemical and molecular impacts of glyphosate-based herbicide on the gills of common carp. *Environmental Pollution* 252: 1288-1300.
- Maggi, F., Tang, F.H.M., la Cecilia, D., McBratney, A. 2019. PEST-CHEMGRIDS, global gridded maps of the top 20 crop-specific pesticide application rates from 2015 to 2025. *Scientific Data* 6: 1-20.
- Maggi, F., Tang, F.H.M., la Cecilia, D., McBratney, A. 2020. The global environmental hazard of glyphosate use. *Science of the Total Environment* 717: 137167.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R. 2010. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78: 294-299.
- Nemcsok, J., Benedeczky, I. 1990. Effect of sublethal concentrations of phenol on some enzyme activities and blood sugar level of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environmental Monitoring and Assessment*, 14: 377-383.
- Oruç, E.O., Sevgiler, Y., Uner, N. 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 137: 43-51.
- Prevot-D'Alvise, N., Richard, S., Coupé, S., Bunet, R., Grillasca, J. 2013. Acute toxicity of a commercial glyphosate formulation on European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax* L.): gene expressions of heme oxygenase-1 (ho-1), acetylcholinesterase (AChE) and aromatases (cyp19a and cyp19b). *Cellular and Molecular Biology* 59: 906-1917.
- Socha, M., Szczygieł, J., Brzuska, E., Sokołowska-Mikołajczyk, M., Stonawski, B., Grzesiak, M. 2021. The effect of Roundup on embryonic development, early foxr1 and hsp70 gene expression and hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Theriogenology*, 175: 163-169.
- Steinrücken, H.C., Amrhein, N. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 94: 1207-1212.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Modrá, H. 2012. *Metody hematologického vyšetřování ryb. Jihočeská univerzita, Fakulta rybářství a ochrany vod.* 40 s.
- Vaclavik, J., Sehonova, P., Blahova, J., Medkova, D., Postulkova, E., Maly, O., Charvatova, M., Stastny, K., Lenz, J., Mares, J., Franc, A., Svobodova, Z. 2022. Foodborne fluoxetine impacts the immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 90: 103818.

Cíl 11: Zhodnocení účinku látek používaných v kosmetickém průmyslu (lauryl sulfátu sodného a quaternia), jejichž rezidua kontaminují povrchové vody, na zdravotní stav a welfare vodních organismů

VLIV LÁTEK POUŽÍVANÝCH V KOSMETICKÉM PRŮMYSLU (LAURYL SULFÁTU SODNÉHO A QUATERNIA), JEJICHŽ REZIDUA KONTAMINUJÍ POVRCHOVÉ VODY, NA ZDRAVOTNÍ STAV A WELFARE VODNÍCH ORGANISMŮ

Zdeňka Svobodová, Renáta Hesová, Barbora Riesová, Michaela Frederika Vargová

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

Abstrakt

Kontaminace vodních ekosystémů produkty osobní péče (PCP) představuje narůstající environmentální problém. PCP zahrnují širokou a různorodou skupinu organických sloučenin, které jsou každodenně používány u lidí i zvířat. Znečištění způsobené těmito látkami vyvolává značné obavy z důvodu jejich environmentální perzistence, bioakumulačních vlastností a bioaktivity, stejně jako schopnosti narušovat endokrinní systém a vyvolávat toxicitu u lidí i vodních organismů. Cílem tohoto projektu bylo studium vlivu dvou vybraných látek používaných v produktech osobní péče – lauryl sulfátu sodného (SLS) a quaternium-15 – na vodní organismy. Pro hodnocení toxicity byly sledovány letální a subletální endpointy, jako jsou mortalita, výskyt malformací, tepová frekvence, líhnutí a změny biochemických parametrů. Testování bylo provedeno na embryích dáňka pruhovaného (*Danio rerio*), kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a drápatky vodní (*Xenopus laevis*). V případě quaternium-15 byla embrya vystavena šesti koncentracím (1, 5, 10, 15, 20 a 25 mg/L), které odpovídaly odhadovaným environmentálním hodnotám. Výsledky ukázaly významnou mortalitu všech tří modelových organismů při nejvyšších testovaných koncentracích, kdy všechna embrya uhynula do 96 hodin po oplodnění (hpf). Dále bylo zaznamenáno zpomalené líhnutí embryí kapra obecného a dáňka pruhovaného ve srovnání s kontrolní skupinou, vysoký výskyt malformací u všech testovaných organismů a významné snížení srdeční frekvence u dáňka pruhovaného a kapra obecného. Testování SLS proběhlo s pěti vybranými koncentracemi (0,1, 0,5, 1, 5, 10 a 15 mg/L). Výsledky prokázaly vysokou citlivost embryí dáňka pruhovaného a drápatky vodní při vystavení nejvyšším koncentracím SLS. U dáňka pruhovaného byla pozorována 100% mortalita při nejvyšší koncentraci, dále zpomalené líhnutí a četné malformace, a to u obou testovaných organismů. Významné změny byly zaznamenány i v tepové frekvenci embryí kapra obecného a dáňka pruhovaného napříč všemi testovanými koncentracemi. Závěrem lze konstatovat, že obě testované látky vykazují vysoký toxický potenciál pro vodní organismy, a to již při koncentracích blízkých hodnotám zjištěným v životním prostředí. Výsledky této studie podtrhují potřebu lepší regulace a monitoringu produktů osobní péče z důvodu jejich možných negativních dopadů na vodní ekosystémy.

Úvod

Produkty osobní péče (PCP) zahrnují širokou škálu výrobků určených k čištění, péči o pleť, zkrášlování a osobní hygienu. Po jejich použití se PCP dostávají do čistíren odpadních vod (ČOV), kde jejich odstranění bývá často neúplné, a následně dochází k jejich uvolňování do vodního prostředí (Peng et

al., 2019). S rostoucí rozmanitostí, dostupností a spotřebou těchto produktů narůstá jejich akumulace v životním prostředí, zejména v povrchových vodách, které tak představují významné rezervoáry těchto mikropolutantů (Homem et al., 2022). V posledních letech byly složky PCP detekovány v různých vodních organismech, včetně planktonu, ryb a bezobratlých. Obavy však vyvolává jejich perzistence, bioakumulativní potenciál a bioaktivní vlastnosti, jež mohou ovlivnit necílové organismy (Jyoti and Sinha, 2023). Bylo prokázáno, že látky obsažené v PCP mohou mít negativní vliv na reprodukční schopnosti, kardiovaskulární systém nebo antioxidační obranu organismu (Zicarelli et al., 2022). Navzdory alarmující situaci je dostupných údajů o skutečných koncentracích těchto látek v životním prostředí stále málo, protože nejsou běžně monitorovány ani regulovány (Bari et al., 2023). Většina dosavadních studií se přitom zaměřuje primárně na léčiva (zejména antibiotika), zatímco PCP jsou často opomíjeny a tvoří méně než 15 % zkoumaných sloučenin (Homem et al., 2022).

Laurylsulfát sodný (SLS) je aniontová povrchově aktivní látka široce využívaná v kosmetice, zubních pastách, pěnách na holení či čisticích prostředcích díky své schopnosti snižovat povrchové napětí vody a zvyšovat pěnovost a čisticí účinnost (Purnami et al., 2024; Zicarelli et al., 2022). SLS se rovněž používá ve farmaceutickém průmyslu ke zlepšení absorpce chemických látek přes kůži a sliznice, zatímco v průmyslových aplikacích nachází uplatnění například v detergentech a hasicích prostředcích. I když je SLS relativně rychle biodegradovatelné (45–95 % během 24 hodin), jeho nepřetržitý přísun do vodních systémů udržuje jeho koncentrace v životním prostředí na vysokých úrovních. SLS má silnou tendenci vázat se na lipidové složky buněčných membrán, což při vyšších koncentracích vede ke změnám na buněčné úrovni. Toxicita SLS pro vodní organismy, jako jsou fytoplankton, zooplankton, háďátka, mlži a ryby, je spojována především s narušením osmotické rovnováhy a indukci oxidačního stresu (Freitas et al., 2020; Freitas et al., 2023). Současná celosvětová poptávka po povrchově aktivních látkách dosahuje přibližně 17 milionů tun ročně, přičemž aniontové povrchově aktivní látky tvoří 46 % celkového množství, s předpokládaným růstem o 2,6 % ročně v následujících pěti letech (Asio et al., 2023).

Quaternium-15 je kvartérní amonná sloučenina používaná jako konzervační látka a povrchově aktivní složka v produktech, jako jsou šampony, tělové krémy, mýdla či kosmetika (Multisanti et al., 2023). Tato látka je známá svou schopností uvolňovat formaldehyd, který je klasifikován jako karcinogen a má toxické účinky na reprodukci a vývoj. Z tohoto důvodu je v Evropské unii maximální povolený obsah quaternia-15 v produktech osobní péče omezen na 0,2 % (Princy Maria et al., 2019). Quaternium-15 je vysoce odolné vůči metabolické degradaci, a proto může v životním prostředí přetrvávat dlouhé roky. Díky svým lipofilním vlastnostem snadno proniká do organismů, kde může způsobit fyziologické a histologické poškození (Impellitteri et al., 2024). Například studie Multisanti et al. (2023) prokázala, že quaternium-15 narušuje buněčné mechanismy a obranné reakce hemocytů u perlorodky (*Pinctada imbricata*), což oslabuje jejich antioxidační odpověď proti oxidačnímu stresu. Testování toxicity látek na vodních organismech často zahrnuje modelové druhy ryb a obojživelníků. V souladu s principem 3R (replacement, reduction, refinement), který podporuje minimalizaci utrpení zvířat a snižování jejich počtu v experimentálních studiích, se stále častěji používají embryonální stadia organismů. Embrya nejsou dle evropské legislativy považována za pokusná zvířata, a přitom jsou velmi citlivá na působení polutantů, což umožňuje získat významné výsledky (Sehonová et al., 2016; Velíšek, 2018). Mezi nejčastěji používané modelové druhy patří dánío pruhované (*Danio rerio*) a kapr obecný (*Cyprinus carpio*) z ryb, zatímco z obojživelníků je často využívána drápatka vodní (*Xenopus laevis*) nebo drápatka tropická (*Xenopus tropicalis*) (Modra et al., 2011; Keshari et al., 2016; Sehonova et al., 2019).

Cílem této studie bylo porovnat citlivost embryí tří různých modelových organismů – dánía pruhovaného, kapra obecného a drápatky vodní – vystavených působení dvou vybraných látek běžně používaných v produktech osobní péče (SLS a quaternium-15). Tyto látky byly zvoleny s ohledem na jejich široké využití v humánních produktech a častý výskyt ve vodním prostředí. Toxicita byla

hodnocena pomocí embryonálního testu, během něhož byly po dobu 96 hodin sledovány klíčové ukazatele embryotoxicity, včetně mortality, líhnutí, výskytu malformací a změn tepové frekvence.

Materiál a metodika

Embryonální testy byly provedeny v laboratořích Ústavu ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství (VETUNI) s využitím modifikované metodiky OECD 236 (Fish Embryo Acute Toxicity Test) a ASTM E1439/98. Jako modelové organismy byly zvoleny dánío pruhované (*Danio rerio*), kapr obecný (*Cyprinus carpio*) a drápatka vodní (*Xenopus laevis*), kteří patří mezi často využívané druhy v toxikologických studiích pro hodnocení negativních účinků cizorodých látek ve vodním prostředí.

Do testů byly zařazeny čerstvě oplodněné jikry ryb a vajíčka žab, která nepřekročila stáří 1,5 hodiny od oplodnění. Embrya byla umístěna do 24jamkových mikrotitračních destiček a po dobu 96 hodin vystavena působení produktů osobní péče, konkrétně laurylsulfátu sodného (SLS) a quaternia-15. Tyto látky byly testovány individuálně ve vybraných koncentracích:

- Laurylsulfát sodný (SLS): 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15 mg/L,
- Quaternium-15: 1; 5; 10; 15; 20; 25 mg/L.

Kontrolní skupina byla vystavena pouze ředící vodě bez přídavku testovaných látek. Ředící voda byla připravena dle normy ISO 7346 (1996) pro testy s dánío pruhovaným a kaprem obecným. U testů s drápatkou vodní byl použit Marc's Modified Ringer roztok, který se připravuje smícháním roztoků NaCl, KCl, MgSO₄·7H₂O, CaCl₂·2H₂O a HEPES bufferu, s následnou úpravou pH na 7,4–7,8 pomocí NaOH (Shaidani et al., 2021). Testované roztoky byly pravidelně obměňovány každých 24 hodin.

Pozorování probíhalo celkem 96 hodin a každých 24 hodin byla hodnocena mortalita, líhnutí embryí a výskyt malformací (např. deformace těla, změny pigmentace, edém srdce nebo žloutkového váčku). Tepová frekvence byla měřena v 48 hodinách po oplodnění (hpf) u rybích embryí a ve 56 hpf u drápatky vodní. Během testu byla embrya udržována v růstové komoře za konstantních podmínek (26±1 °C pro dánío pruhované, 23±1 °C pro drápatku vodní a kapra obecného při fotoperiodě 12 h světlo/12 h tma.

Statistická analýza dat byla provedena pomocí softwaru Unistat 6.5 pro Excel. Rozdíly v mortalitě, líhnutí a výskytu morfologických změn mezi kontrolní a pokusnými skupinami byly analyzovány pomocí kontingenčních tabulek 2x2. Statistické hodnocení srdečního tepu začalo testováním normality dat (Shapiro-Wilkův test). Vzhledem k nesplnění podmínky normality byl následně použit neparametrický mediánový test. Srovnání bylo prováděno mezi kontrolní a experimentální skupinou v příslušném časovém bodě pozorování.

Statistická významnost byla interpretována na základě hladin:

- $p < 0,05$ jako statisticky významná,
- $p < 0,01$ jako statisticky vysoce významná,
- $p > 0,05$ jako statisticky nevýznamná.

Výsledky

Jedním z klíčových ukazatelů embryotoxicity byla kumulativní mortalita, která byla hodnocena v intervalu 24 hodin po dobu celkových 96 hodin. První testovanou látkou byl SLS. U embryí dánía pruhovaného (*Danio rerio*), která byla vystavena nejvyšším koncentracím (10 a 15 mg/L), byla již při 24 hpf (hodinách po oplodnění) zaznamenána 100% úmrtnost v důsledku koagulace. Při koncentraci

5 mg/L byla pozorována úmrtnost 33,3 % ($p < 0,01$). Naopak při nižších koncentracích (0,1; 0,5 a 1 mg/L) nebyla zaznamenána žádná významná mortalita; nejvyšší naměřená hodnota dosahovala pouze 8,3 %.

U embryí kapra obecného (*Cyprinus carpio*) však nebyly zaznamenány žádné signifikantní výsledky. Nejvyšší pozorovaná mortalita, a to 8,3 %, byla zaznamenána při koncentraci 0,1 mg/L již při 24 hpf, přičemž u nejvyšších testovaných koncentrací (10 a 15 mg/L) nebyla pozorována žádná mortalita.

Významné výsledky (Tab. č. 1) byly zaznamenány u embryí drápatky vodní (*Xenopus laevis*). Mortalita byla patrná především ve vyšších koncentracích SLS a v pozdějších fázích vývoje. Ve skupinách vystavených koncentracím 10 mg/L ($p < 0,05$) a 15 mg/L ($p < 0,01$) byla pozorována postupně narůstající mortalita při 48 hpf, 72 hpf a 96 hpf. Nejvyšší hodnota mortality činila 45,83 % u embryí vystavených koncentraci 15 mg/L po 96 hpf.

Dalším sledovaným ukazatelem indikujícím potenciálně negativní účinky testovaných látek je míra líhnutí. U dánie pruhoaného (*Danio rerio*) v nejvyšších koncentracích testovaných látek došlo k úhynu embryí ještě před vylíhnutím. S výjimkou jednoho embrya při 48 hpf, kdy došlo k vylíhnutí, byla nejvyšší míra líhnutí pozorována při 72 hpf, přičemž více než polovina (54,2 %) embryí se vylíhla při koncentraci 0,5 mg/L. Významné rozdíly v míře líhnutí byly pozorovány při koncentraci 5 mg/L při 96 hpf, kdy se vylíhlo pouze 25 % embryí ($p < 0,001$), zatímco v kontrolní skupině se vylíhlo 91,7 %.

Tabulka č. 1. Kumulativní úmrtnost u dánie pruhoaného (*Danio rerio*), kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a drápatky vodní (*Xenopus laevis*) vystavených šesti koncentracím SLS. Údaje jsou kumulativní procento úmrtí za den. Významné výsledky byly analyzovány pomocí chí -kvadrát testu a jsou zvýrazněny tučným písmem a hvězdičkami „*“ (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$); hpf = hodiny po oplodnění.

Kumulativní mortalita (% úmrtnost na den)												
Skupina	SLS											
	<i>Danio rerio</i>				<i>Cyprinus carpio</i>				<i>Xenopus laevis</i>			
	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
Kontrola	0	0	0	0	0	0	0	4,2	0	4,2	4,2	8,3
0,1 mg/L	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	12,5	12,5	12,5	12,5
0,5 mg/L	8,3	8,3	8,3	8,3	4,2	4,2	4,2	4,2	16,7	20,8	20,8	20,8
1 mg/L	8,3	8,3	8,3	8,3	4,2	4,2	4,2	4,2	20,8	25	25	25
5 mg/L	33,3**	33,3**	33,3**	33,3**	0	0	0	0	8,3	12,5	12,5	20,8
10 mg/L	100***	100***	100***	100***	0	0	0	0	25	29,2*	33,3*	37,5*
15 mg/L	100***	100***	100***	100***	0	0	0	0	29,2	33,3*	41,2**	45,8*

U kapra obecného (*Cyprinus carpio*) se vylíhlo pouze jedno embryo při 48 hpf při koncentraci 1 mg/L. Nejvyšší míra líhnutí byla zaznamenána při 72 hpf, kdy se všechna embrya (100 %) v této době vylíhla

při koncentracích 5 mg/L a 10 mg/L. V porovnání s kontrolní skupinou nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly.

U drápatky vodní (*Xenopus laevis*) bylo vylíhnutí pozorováno dříve než u ryb, a to již při 48 hpf, přičemž při koncentraci 1 mg/L bylo pozorováno 45,8 % vylíhnutí v porovnání s kontrolní skupinou (79,2 %, $p < 0,05$). Významné rozdíly v rychlosti líhnutí byly pozorovány i při 72 hpf a 96 hpf v koncentracích 1 mg/L, 10 mg/L a 15 mg/L, přičemž procento vylíhnutí činilo 75 %, 66,2 % a 58,3 %, v porovnání s 95,8 % embryí v kontrolní skupině ($p < 0,05$).

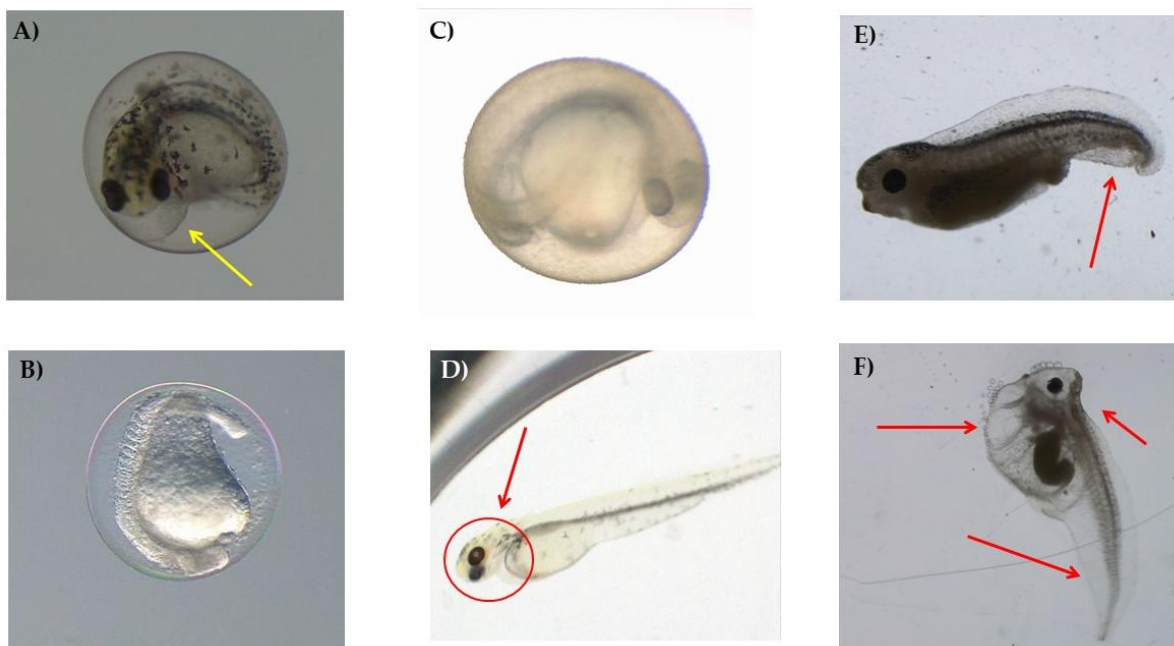
Výskyt malformací (Tab. č. 2) je dalším důležitým ukazatelem embryotoxicity. Při hodnocení embryonálních testů toxicity se nejčastěji setkáváme s edémem srdce, edémem žloutkového vaku, případně lze pozorovat různé deformace páteře či ocasu. Některé testované látky mohou také vést ke zvýšení nebo snížení pigmentace těla. Malformace byly pozorovány u dání pruhovaného (*Danio rerio*) při 96 hpf v koncentraci 5 mg/L, kde se objevilo 37,5 % malformovaných embryí ($p < 0,01$). Nejčastějšími malformacemi byly deformace páteře, ocasu a edémy (Obr. č. 1A a 1B). Výskyt malformací u embryí kapra obecného byl nízký, přičemž maximální procento bylo pozorováno při koncentraci 15 mg/L po 96 hpf (12,5 %, statisticky nepůsobící významné rozdíly, $p > 0,05$). Zaznamenané malformace zahrnovaly hematomy a edém (Obr. č. 1C a 1D). Drápatky vodní vykazovaly významné malformace již při 24 hpf v koncentracích 1 mg/L, 5 mg/L a 10 mg/L, přičemž procenta malformovaných zvířat byla 20,8 %, 41,7 % a 25 % ($p < 0,05$; $p < 0,001$; $p < 0,05$). Tento výskyt se zvyšoval s časem expozice a vrcholil při 96 hpf, kdy více než polovina (70,8 %) zvířat vystavených 5 mg/L vykazovala malformace ($p < 0,001$). Významné malformace byly pozorovány také u drápatky vodní vystavené koncentracím 1 mg/L a 15 mg/L, kde 54,2 % zvířat vykazovalo malformace ($p < 0,01$). Mezi nejčastější malformace patřily: deformace těla, páteře a ocasu (zakřivená páteř, kratší ocas), změny pigmentace a deformace hlavy, jako například absence jednoho oka (Obr. č. 1E a 1F).

Tabulka č. 2. Výskyt malformací u daní pruhovaného (*Danio rerio*), kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a drápatky vodní (*Xenopus laevis*) vystavených SLS. Údaje představují procento úmrtí za den. Významné výsledky byly zvýrazněny použitím tučného písma a hvězdiček „*“ (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

Výskyt malformací (% úmrtí za den)												
SLS												
Skupiny	<i>Danio rerio</i>				<i>Cyprinus carpio</i>				<i>Xenopus laevis</i>			
	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
Kontrola	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,3	12,5
0,1 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	4,2	12,5	25	25	29,2
0,5 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	16,7	16,7	25	33,3
1 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	20,8*	37,5**	45,8**	54,2**
5 mg/L	0	0	4,2	37,5**	0	0	0	4,2	41,7***	50***	62,5***	70,8***
10 mg/L	-	-	-	-	0	0	0	0	25*	37,5**	37,5*	37,5

15 mg/L	-	-	-	-	0	0	4,2	12,5	16,7	45,8***	50**	54,3**
---------	---	---	---	---	---	---	-----	------	------	---------	------	--------

Obrázek č. 1. 1A – embryo dánia pruhoaného 72 hpf vystavené koncentraci 5 mg/L SLS se srdečním edémem; 1B – malformované nevyvinuté embryo dánia pruhoaného 48 hpf vystavené koncentraci 0,1 mg/L SLS; 1C – embryo kapra obecného 48 hpf vystavené koncentraci 15 mg/L SLS beze změn; 1D – embryo kapra obecného 72 hpf vystavené koncentraci 15 mg/L SLS s hematodem v oblasti hlavy; 1E – embryo drápatky vodní 72 hpf vystavené koncentraci 10 mg/L SLS s deformací ocasu a páteře); 1F – embryo drápatky vodní 96 hpf vystavené koncentraci 15 mg/L SLS s edémem, malformací ocasu a páteře



Dalším využívaným indikátorem pro posouzení negativních účinků cizorodých látek na vodní organismy bylo monitorování tepové frekvence. Srdeční frekvence, vypočítaná jako počet úderů srdce za minutu, vykazovala významné změny téměř ve všech testovaných koncentracích u obou zkoumaných ryb (Tab. č. 3). Obvykle embrya dánia pruhoaného (*Danio rerio*) a kapra obecného (*Cyprinus carpio*) vystavená SLS vykazovala pokles v počtu srdečních úderů ve srovnání s kontrolní skupinou. U dánia pruhoaného se počet tepů snížil z $189,3 \pm 6,5$ v kontrolní skupině na $122,2 \pm 3,2$ ($p < 0,01$) u organismů vystavených koncentraci 5 mg/L. U embryí kapra obecného bylo pozorováno snížení srdeční frekvence, přičemž kontrola zaznamenala $224,9 \pm 0,1$ úderů za minutu a při nejvyšší koncentraci se pozorovaná srdeční frekvence snížila na hodnotu $137,5 \pm 0,2$ ($p < 0,001$). Přestože snížení srdeční frekvence bylo pozorováno také u drápků vodních (*Xenopus laevis*), zejména při koncentracích 0,5 mg/L a 1 mg/L (tabulka č. 3), nebylo to významné u žádné z testovaných koncentrací. Naopak, při expozicích 15 mg/L SLS se srdeční frekvence drápků vodních zvýšila, přičemž průměrný počet úderů za minutu dosáhl hodnoty $167,2 \pm 5,6$.

Tabulka č. 3. Srdeční frekvence dánia pruhoaného (*Danio rerio*), kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a drápatky vodní (*Xenopus laevis*) vystavených SLS. Hodnoty jsou průměry \pm SE počtu tepů srdce za minutu. Významné výsledky byly zvýrazněny použitím tučného písma a hvězdiček „*“ (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

	Srdeční tep (počet srdečních tepů /min)		
Skupiny	<i>Danio rerio</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Kontrola	189,3 ± 6,5	224,9 ± 0,1	163,7 ± 5,2
0,1 mg/L	127,2 ± 6,0 **	143,3 ± 0,2 ***	151,2 ± 3,7
0,5 mg/L	128,2 ± 2,7 **	144,9 ± 0,1 ***	165,5 ± 3,0
1 mg/L	126,4 ± 2,3 **	146,0 ± 0,2 *	153,6 ± 3,6
5 mg/L	122,2 ± 3,2 ***	147,5 ± 0,1 **	159,4 ± 3,7
10 mg/L	-	142,0 ± 0,1 ***	156,2 ± 1,9
15 mg/L	-	137,5 ± 0,2 ***	167,2 ± 5,6

Dalším, a posledním využitým indikátorem pro posouzení negativních účinků cizorodých látek na vodní organismy bylo monitorování délky těl embryí. Pozorování délky (Tab. č. 4) neukázalo významné výsledky ($p > 0,05$) mezi kontrolními a exponovanými zvířaty v žádném z analyzovaných druhů.

Tabulka č. 4. Délka embryí dánia pruhovaného (*Danio rerio*), kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a drápatky vodní (*Xenopus laevis*) vystavených SLS. Hodnoty jsou průměr ± SE počtu tepů srdce za minutu. Mezi kontrolní a experimentální skupinou nebyly pozorovány žádné významné rozdíly ($p > 0,05$).

	Délka těl (mm)		
Skupiny	<i>Danio rerio</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Kontrola	5,7 ± 0,2	9,8 ± 6,3	13,4 ± 0,3
0,1 mg/L	5,1 ± 0,1	10,2 ± 2,2	14,0 ± 0,3
0,5 mg/L	5,6 ± 0,2	10,1 ± 2,5	14,1 ± 0,2
1 mg/L	5,3 ± 0,1	10,1 ± 1,8	13,8 ± 0,2
5 mg/L	-	10,1 ± 1,5	13,9 ± 0,1
10 mg/L	-	10,0 ± 1,0	13,5 ± 0,3
15 mg/L	-	9,5 ± 1,6	13,3 ± 0,2

Jako další testovanou látkou v našem experimentu bylo Quaternium-15. Prvním hodnoceným endpointem byla kumulativní mortalita. Sledování opět probíhalo každých 24 hodin, po dobu 96 hodin. Míra úmrtnosti embryí kapra obecného (*Cyprinus carpio*) ukázala 100% úmrtnost u embryí vystavených nejvyšší testované koncentraci po 48 hodinách expozice a také 100% mortalitu v koncentracích 15 a 20 mg/L po 96 hodinách (Tab. č. 5). Významné zvýšení mortality embryí kapra

obecného (*Cyprinus carpio*) bylo zaznamenáno u koncentrací 5 a 10 mg/L 96 hpf ($p < 0,05$ a $p < 0,001$) a 15 mg/L 72 a 96 hpf ($p < 0,01$ a $p < 0,001$). Údaje o účinku koncentrace 1 mg/L nebyly pro tento modelový organismus testovány a z tohoto důvodu nebyly uvedeny. U embryí dáni pruhovaného (*Danio rerio*) se mortalita zvýšila po expozici většině koncentrací v porovnání s kontrolou (Tab. č. 5). U embryí drápatky vodní (*Xenopus laevis*) bylo nejvyšší procento signifikantních výsledků pozorováno po 96 hodinách expozice, kde jen s výjimkou embryí vystavených koncentraci 1 mg/L byla přítomna výrazně zvýšená úmrtnost ve skupinách exponovaných 5, 15, 20 resp. 25 mg/L Quaternium-15.

Tabulka č. 5. Kumulativní mortalita [%] pozorovaná u embryí dáni pruhovaného (*Danio rerio*), kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a drápatky vodní (*Xenopus laevis*) po expozici quaternium-15. Procenta jsou součtem mrtvých embryí za den. Koncentrace jsou vyjádřeny jako mg/L. Údaje byly shromažďovány každých 24 hodin. Významné výsledky jsou zvýrazněny tučným písmem a hvězdičkami „*“ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Kumulativní mortalita (% mortality za den)												
Skupiny	<i>Danio rerio</i>				<i>Cyprinus carpio</i>				<i>Xenopus laevis</i>			
	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
Kontrola	0	0	0	0	0	0	0	4,2	0	4,2	4,2	8,3
1	33,3**	33,3**	33,3**	41,7***	\	\	\	\	12,5	12,5	12,5	20,8
5	33,3**	33,3**	33,3**	66,7***	8,3	8,3	8,33	29,2*	12,5	12,5	20,8	37,5*
10	25*	25*	54,7***	95,8***	16,7	29,2**	29,2**	79,2***	12,5	12,5	25	50**
15	16,7	16,7	66,7***	87,5***	12,5	66,8***	75***	100***	8,3	8,3	25	100***
20	16,7	20,8*	58,3***	87,5***	8,3	95,8***	95,8***	100***	20,8*	25	66,6***	100***
25	25*	50***	87,5***	95,8***	4,2	100***	100***	100***	12,5	33,3*	100***	100***

Dále byla sledována míra líhnutí, jako ukazatele indikujícího potenciální negativní účinky testovaných látek na embryích. Kvůli 100% úmrtnosti embryí kapra obecného (*Cyprinus carpio*) při 24 a 48 hpf nebylo možné pozorovat míru líhnutí při koncentracích 20 a 25 mg/L. V ostatních skupinách bylo pozorováno významné zpomalení líhnutí při 10 a 15 mg/L ($p < 0,001$), kde se < 20 % embryí vylíhlo až 96 hpf. Podobně bylo pozorováno zpomalené líhnutí u embryí dáni pruhovaného (*Danio rerio*) vystavených různým koncentracím quaternium-15. Při 96 hpf bylo v kontrole přibližně 90 % vylíhnutých embryí, zatímco embrya vystavená koncentracím 1, 5, 10, 15 a 20 mg/L vykazovala významné ($p < 0,001$) zpoždění. Žádné líhnutí nebylo pozorováno u zvířat vystavených nejvyšší testované koncentraci. Rychlost líhnutí embryí drápatky vodní (*Xenopus laevis*) nebyla ovlivněna expozicí quaternium-15 v žádné zvolené koncentraci ve srovnání s kontrolou. Při 48 hpf téměř 80 % embryí bylo vylíhnuto.

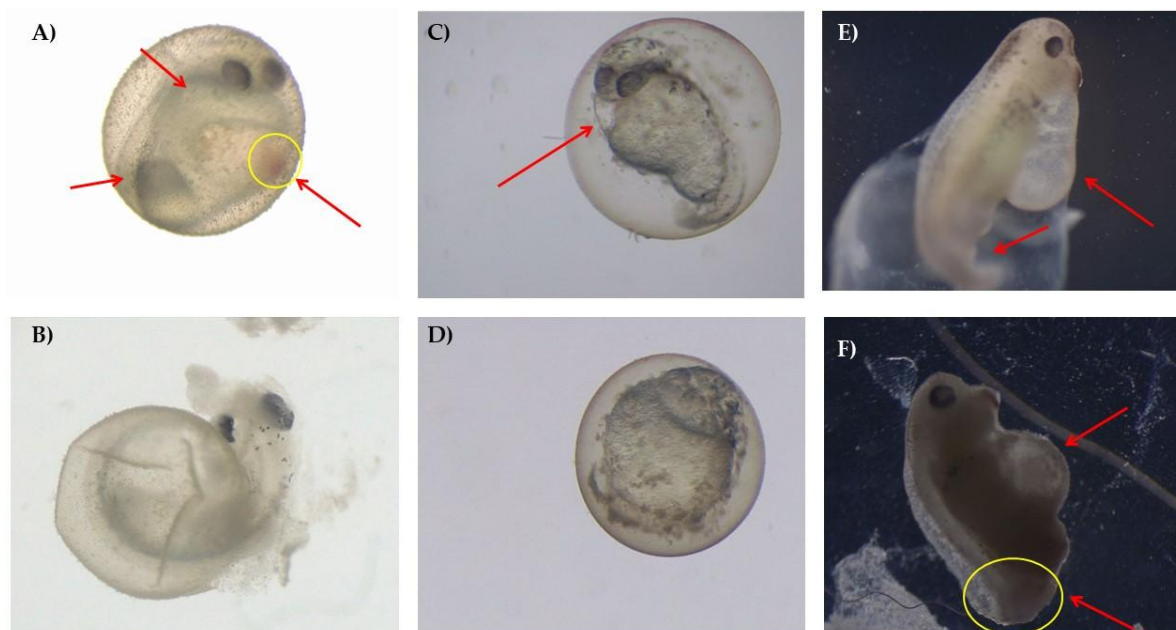
Dalším významným ukazatelem embryotoxicity je výskyt různých typů malformací. Ze všech tří testovaných modelových organismů byly perikardiální edém, hematoma, deformace páteře a malformace ocasu nejčastěji pozorovanými malformacemi. U embryí kapra obecného (*Cyprinus carpio*) byl pozorován signifikantně zvýšený výskyt malformací již při 48 hpf v koncentracích 10 a 15 mg/L ($p < 0,01$ a $p < 0,05$). Kromě toho byl při 96 hpf pozorován významně zvýšený výskyt malformací u embryí vystavených koncentraci 5 mg/L ($p < 0,001$), (Tab. č. 6). U embryí dáni pruhovaného (*Danio*

rerio) byl pozorován zvýšený výskyt malformací již při 48 hpf v nejvyšší testované koncentraci (25 mg/L). Kromě výše uvedených malformací byly zaznamenány i změny v pigmentaci embryí. U embryí drápatky vodní (*Xenopus laevis*) vystavené quaterniu-15 došlo ke zvýšenému výskytu malformací při 48 hpf. Významný výskyt malformací byl pozorován pouze u embryí vystavených koncentraci 25 mg/L při 48 hpf ($p < 0,01$). V této koncentraci bylo pozorováno nejvyšší procento malformovaných vzorků, které dosáhlo 29,2 %.

Tabulka č. 6. Výskyt malformací [%] pozorovaných u dánia pruhovaného (*Danio rerio*), kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a drápatky vodní (*Xenopus laevis*) během 96hodinové expozice Quaternium-15. Procenta byla součtem malformací za den. Koncentrace byly vyjádřeny jako mg/L. Údaje byly shromažďovány každých 24 hodin. Významné výsledky byly zvýrazněny tučným písmem a hvězdičkami „*“ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Výskyt malformací (% za den)												
Skupiny	<i>Danio rerio</i>				<i>Cyprinus carpio</i>				<i>Xenopus laevis</i>			
	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
Kontrola	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,3	12,5
1	0	4,2	8,3	20,8	\	\	\	\	0	0	4,2	20,8
5	0	0	12,5	20,8	0	0	0	50 ***	0	8,3	12,5	25
10	0	8,3	8,3	8,3	0	25 **	33,3 **	54,2 ***	0	16,7	25	33,3
15	0	4,2	4,2	4,2	0	20,8 *	20,8 *	20,8 *	0	16,7	16,7	16,7
20	0	16,7	16,7	16,7	0	\	\	\	0	4,2	4,2	4,2
25	4,17	20,8 *	20,8 *	20,8 *	0	\	\	\	0	29,2 **	29,2	29,2

Obrázek č. 2. Malformace pozorované ve třech modelových organismech. 2A – embryo kapra obecného (*Cyprinus carpio*) vystaveno 15 mg/L quaterniu-15 při 48 hpf s perikardiálním edémem a hematodem (ve žlutém kruhu) bez oddělování ocasu; 2B – mrtvé embryo kapra obecného (*Cyprinus carpio*) 72 hpf vystaveno 15 mg/L quaterniu-15; 2C embryo dánia pruhovaného (*Danio rerio*) při 48 hpf vystaveno 15 mg/L quaterniu-15 s perikardiálním edémem a malformací ocasu; 2D – koagulované a mrtvé embryo dánia pruhovaného (*Danio rerio*) vystavené koncentraci 25 mg/L quaterniu-15; 2E – embryo drápatky vodní (*Xenopus laevis*) při 48 hpf vystaveno 10 mg/L quaterniu-15 se sníženou pigmentací, malformací těla a perikardiálním edémem; 2F – embryo drápatky vodní (*Xenopus laevis*) 48 hpf vystaveno 15 mg/L quaterniu-15 s tělesnou malformací, perikardiálním edémem a absencí ocasu



Vystavení různým koncentracím quaterniua-15 negativně ovlivnilo srdeční frekvenci obou kaprovitých (*Cyprinus carpio* a *Danio rerio*), jak je uvedeno v tabulce č. 7. U kapa obecného (*Cyprinus carpio*) srdeční frekvence vykazovala významný pokles ve skupinách vystavených 5, 10 a 15 mg/L ve srovnání s kontrolou. Údaje z nejvyšších koncentrací (20 a 25 mg/L) nebylo možné shromáždit kvůli úmrtnosti v těchto skupinách. U dánia pruhovaného (*Danio rerio*) byla pozorována výrazně nižší srdeční frekvence ve všech testovaných koncentracích s nejvyšší změnou srdeční frekvence pozorovanou u zvířat vystavených koncentracím 10, 20 a 25 mg/L ($p < 0,001$). U embryí drápatky vodní (*Xenopus laevis*) v žádné z koncentrací zvolených pro test nebyla pozorována žádná změna srdeční frekvence (Tab. č. 7).

Tabulka č. 7. Průměrná hodnota srdeční frekvence embryí dánie pruhovaného (*Danio rerio*), kapa obecného (*Cyprinus carpio*) a drápatky vodní (*Xenopus laevis*) \pm standardní chyba průměru (SE). Výsledky jsou vyjádřeny jako počet úderů srdce/min. Významné výsledky byly zvýrazněny tučným písmem a hvězdičkami „*“ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Skupiny	Srdeční tep (počet srdečních tepů /min)		
	<i>Danio rerio</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Kontrola	252,3 ± 7,0	224,9 ± 6,3	95,8 ± 2,1
1 mg/L	180,7 ± 4,2 *	\	87,1 ± 6,5
5 mg/L	177,1 ± 2,8 *	129,0 ± 2,1 ***	86,3 ± 4,6
10 mg/L	157,8 ± 3,5 ***	137,2 ± 2,5 **	110,3 ± 4,8
15 mg/L	172,5 ± 4,6 *	115,9 ± 8,6 ***	89,3 ± 2,7
20 mg/L	151,2 ± 6,4 ***	\	84,2 ± 4,1
25 mg/L	146,3 ± 2,2 ***	\	99,7 ± 11,6

V samotném testování byla monitorována délka těl embryí. Kvůli celkově vysoké úmrtnosti v experimentech nebylo možné v některých skupinách změřit délku těla (Tab. č. 8).

Tabulka č. 8. Průměrná hodnota délky embryí dání pruhovaného (*Danio rerio*), kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a drápatky vodní (*Xenopus laevis*) ± standardní chyba (SE) při 96 hpf po vystavení různým koncentracím Quaternium-15. Významné výsledky byly zvýrazněny tučným písmem a hvězdičkami „*“ (* p < 0,05; ** p < 0,01, *** p < 0,001). Chybějící výsledky závisí na nepřítomnosti embryí, které uhynuly před měřením, nebo na vysoké přítomnosti malformací, které znemožňují délku zvířete.

Skupiny	Délka těl (mm)		
	<i>Danio rerio</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Kontrola	6,2 ± 0,1	9,8 ± 0,1	13,4 ± 0,3
1 mg/L	6,3 ± 0,1	\	13,5 ± 0,2
5 mg/L	5,8 ± 0,2	\	11,6 ± 0,2 **
10 mg/L	\	\	10,5 ± 0,2 ***
15 mg/L	\	\	\
20 mg/L	\	\	\
25 mg/L	\	\	\

V případě embryí kapra obecného (*Cyprinus carpio*) všechna exponovaná embrya, která dosáhla 96 hpf, vykazovala tělesné malformace v oblasti páteře a ocasu, což znemožňovalo měření délky zvířat. U embryí dání pruhovaného (*Danio rerio*) bylo možné změřit délku těla pouze ve vzorcích vystavených nejnižším testovaným koncentracím (1 a 5 mg/L), ale ve srovnání s kontrolní skupinou nebyly zaznamenány žádné významné změny. Jak je uvedeno v tabulce č. 8, embrya drápatky vodní (*Xenopus laevis*) vystavené koncentracím 10 a 15 mg/L vykazovaly významné zkrácení délky v porovnání s kontrolní skupinou. Průměrné pozorované hodnoty byly 11,6 ± 0,2 a 10,5 ± 0,2 mm,

v tomto pořadí, a jedna pozorovaná u kontroly byla nad 13 mm ($p < 0,01$ a $p < 0,001$, v tomto pořadí). U zvířat vystavených koncentraci 1 mg/L nebyly pozorovány žádné významné výsledky.

Diskuze

PCP jsou hojně používány ke zlepšení kvality každodenního života. Tyto produkty obsahují širokou škálu chemikálií, včetně dezinfekčních prostředků, vůní, repelentů proti hmyzu, konzervačních látek a UV filtrů. Produkce a spotřeba PCP neustále rostou díky zvyšující se populaci a snaze lidí o lepší kvalitu života. Roční příjem z PCP byl celosvětově odhadnut na 646,13 miliard amerických dolarů (Dawood et al., 2024; Peng et al., 2017). Ve vodním prostředí lze detekovat širokou škálu chemických sloučenin, které mohou podstatně ovlivňovat necílové vodní organismy. Bohužel je možné detekovat tyto nežádoucí sloučeniny již v relativně nízkých environmentálně relevantních koncentracích. Jedním z možných přístupů k posuzování negativních účinků těchto potenciálně škodlivých látek je provádění testů toxicity (Velíšek, 2018).

Testy toxicity jsou účinným nástrojem pro hodnocení vlivu xenobiotik na životní prostředí (Plhalová et al., 2018; Sureda et al., 2018; Freitas et al., 2019; Trešňáková et al., 2023; Martyniuk et al., 2024; Aliko et al., 2024). Zejména embryonální testy na vodních organismech, jako jsou kapr obecný (*Cyprinus carpio*), dánío pruhované (*Danio rerio*) a drápatka vodní (*Xenopus laevis*), se ukázaly jako vhodné pro hodnocení negativních účinků xenobiotik na životní prostředí vzhledem k jejich biologickým vlastnostem (Banaee et al., 2019; Ismail et al., 2019; Aliko et al., 2020; Zicarelli et al., 2024). Embryotoxicita se hodnotí na základě sledování vybraných parametrů, jako je mortalita v průběhu vývoje, líhnutí a výskyt morfologických změn (deformace páteře či ocasu, edém srdce nebo žloutkového váčku, změny pigmentace a další). Sledování tepové frekvence, délky těl jednotlivých embryí nebo analýzy vybraných biomarkerů v celotělových homogenátech (např. ukazatele oxidativního stresu, hodnocení genové exprese) může pomoci pochopit, jak toxické látky narušují přirozeně vyvíjející se organismus (OECD, 2013; Sehonová et al., 2016; Sehonová et al., 2019b; Aderemi et al., 2020).

V rámci této studie bylo hodnoceno působení dvou hojně používaných látek z PCP – SLS a quaternium-15. V rámci testů toxicity byly zkoumány účinky těchto látek na vodní modelové organismy. Jako testované organismy byly využity dánío pruhované, kapr obecný a ze skupiny obojživelníků drápatka vodní.

Mortalita je základní ukazatel toxicity a její sledování je součástí všech toxikologických testů. Při testování environmentálních koncentrací je mortalita obvykle velmi nízká až nulová, avšak toxicita testovaných látek se může projevat jinými subletálními efekty, které mohou při chronickém působení výrazně narušit fyziologické funkce organismu. V embryonálních testech toxicity je embryo považováno za uhynulé, pokud je zaznamenán výskyt koagulace, nevyvinutí somitů, absence srdečního tepu nebo pokud nedojde k oddělení ocasu od žloutkového váčku (OECD, 2013). Horie et al. (2023) se zaměřili na účinky environmentálně relevantních koncentrací triclosanu na raná vývojová stadia u dánío pruhovaného. Ve skupině s expozicí 70,6 $\mu\text{g/L}$ triclosanu se míra přežití snížila po 9 dnech na 39 %, přičemž na 32. den bylo 39 % vystavených dánío mrtvých. U skupiny s expozicí 149,2 $\mu\text{g/L}$ se míra přežití snížila na 100 % mrtvých na 9. den. LOEC a NOEC triclosanu byly 70,6 a 48,4 $\mu\text{g/L}$, přičemž LC50 v tomto testu byla 74,6 $\mu\text{g/L}$ (52,2 – 106,7 $\mu\text{g/L}$). Medková et al. (2023) zkoumali toxicitu tří vybraných parabenů (methylparaben, propylparaben a butylparaben) na vývojová stadia dánío pruhovaného, kapra obecného a drápatky vodní. Propylparaben a butylparaben způsobily 100% mortalitu embryí dánío pruhovaného při koncentraci 100 000 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,01$). Všechny tři testované parabeny způsobily 100% mortalitu u embryí kapra obecného při nejvyšších testovaných koncentracích.

Líhnutí je kritickým obdobím vývoje, a proto je jeho sledování významným ukazatelem embryotoxicity. Merola et al. (2020) testovali methylparaben, který se používá jako antimikrobiální konzervační látka v kosmetice, u dánia pruhovaného. Bylo pozorováno statisticky významné snížení rychlosti líhnutí u embryí 72 hpf vystavených 30, 60 a 80 mg/L této látky. Expozice UV filtru EHMC (2-ethylhexyl-4-methoxycinnamát) vedla k lézím svalových vláken, žloutkového váčku a zároveň k zvýšené srdeční frekvenci a opožděnému líhnutí (Cahova et al., 2021). Oliveira et al. (2009) sledovali toxicitu triclosanu u embryí dánií, což vedlo ke zpoždění líhnutí při koncentraci 500 µg/L (48 a 72 hpf).

Morfologické změny embryí a larev po expozici různými PCP byly zjištěny v mnoha ekotoxikologických studiích. Li et al. (2023a) sledovali ke sledování vývojové toxicity způsobené expozicí butylparabenu (BuP) u embryí dánia pruhovaného. Výsledky ukázaly závažné deformity kraniofaciální chrupavky, periokulární edém, srdeční dysplazie a opožděný vývoj otolitu u larev 5 dní po expozici. Li et al. (2023b) testovali UV filtry benzofenonového typu na embryích drápatky vodní. Studie potvrdila, že tato látka vede ke snížení velikosti samčích gonomerů, zejména na kaudálním konci varlete. Quintaneiro et al. (2019) sledovali interferenci 4-MBC (UV filtr) u larev dánia pruhovaného, kde byli zjištěny malformace, jako zakřivení notochordu, opožděnou absorpci žloutkového váčku a perikardiální edém.

V odborné literatuře najdeme řadu studií, které jako ukazatel negativních účinků používají sledování tepové frekvence. Pokles srdeční frekvence byl sledován u embryí dánia pruhovaného vystavených různým sloučeninám přítomným v PCP, včetně aromatického uhlovodíku xylenu (Carlsson and Norrgren, 2004) a ve vodě rozpustných polymerů polyvinylalkoholu a polyethylenglykolu (Zicarelli et al., 2022). Dambal et al. (2017) sledovali vývojové účinky methylparabenu (MP) na embryo-larvální stádia dánia pruhovaného. Expozice vedla k poklesu srdeční frekvence a líhnutí, přičemž byly pozorovány poruchy, včetně perikardiálního edému a ohnutí páteře, ve všech koncentracích s výjimkou 100 µM. Prakash et al. (2022) hodnotili toxicitu enzakamenu (4-MBC), široce používaného organického UV filtru, pomocí embryo-larválních studií s dániem pruhovaným. Výsledky ukázaly významné snížení srdeční frekvence v koncentracích 50 a 500 µg/L.

Dalším indikátorem toxicity je délka těl embryí, která byla vystavena různým xenobiotikům. San Segundo et al. (2013) ve své studii sledovali vliv methylparabenu na embrya drápatky vodní. Výsledky ukázaly, že délka jedinců se snížila z průměrné hodnoty $10,2 \pm 0,4$ mm v kontrolní skupině na průměrnou délku $3,5 \pm 0,6$ mm v nejvyšší testované koncentraci. Srovnatelná pozorování poklesu celkové délky byla zaznamenána také u jiných kategorií sloučenin, například pesticidů, což zdůrazňuje fakt, že růst embryí může být inhibován negativní interakcí s potenciálními kontaminanty (Babalola et al., 2021). Zicarelli et al. (2022) uvádějí, že larvy dánií pruhovaných po expozici triclosanu v koncentraci 500 µg/L vykazují kratší délku těla oproti kontrolní skupině.

Závěr

Na základě výsledků získaných touto studií je zřejmé, že produkty osobní péče, jako jsou SLS a quaternium-15, mohou působit toxicky nebo ovlivňovat vývoj vodních organismů již při environmentálně relevantních koncentracích. Všechny tři testované organismy vykazovaly citlivost na quaternium-15, přičemž mortalita v testech toxicity dosáhla až 100 % ve většině zvolených koncentrací během 96 hodin po expozici. Zpoždění líhnutí embryí a významné změny srdeční frekvence naznačují, že dáanio pruhované a kapr obecný jsou citlivější na quaternium-15 než drápatka vodní. Embrya dánia pruhovaného byla zvláště citlivá na expozici SLS, což se projevilo 100% mortalitou v nejvyšších koncentracích. Podobně embrya drápatky vodní vykazovala významnou míru mortality. Výsledky analýzy líhnutí ukázaly nejvyšší citlivost u embryí dánia pruhovaného a drápatky

vodní. U embryí drápatky vodní byly po expozici SLS nejčastěji pozorovány malformace, včetně tělesných abnormalit, zakřivení páteře, zkrácení ocasu, změn pigmentace a deformací hlavy, jako je absence jednoho oka. Na druhé straně kapr obecný vykazoval největší zranitelnost při sledování tepové frekvence, která výrazně vzrostla při každé testované koncentraci SLS.

Tato práce byla finančně podpořena ITA VETUNI (projekt č. 2024ITA26).

Literatura

- Aderemi, A.O., Hunter, C., Pahl, O., Roberts, J., Shu, X. 2020. Developmental anomalies and oxidative stress responses in zebrafish (*Danio rerio*) following embryonic exposure to human pharmaceuticals. *Journal International Journal of Toxicology and Environmental Health* 5: 109-125.
- Aliko, V., Vasjari, L., Ibrahim, E., Implelliteri, F., Karaj, A., Gjonaj, G., Piccione, G., Arfuso, F., Faggio, C., Istifli, E.S. 2024. "From shadows to shores"-quantitative analysis of CuO nanoparticle-induced apoptosis and DNA damage in fish erythrocytes: A multimodal approach combining experimental, image-based quantification, docking and molecular dynamics. *Science of The Total Environment* 906: 167698.
- Asio, J.R., Garcia, J.S., Antonatos, Ch., Sevilla-Nastor, J.B., Trinidad, L. 2023. Sodium lauryl sulfate and its potential impacts on organisms and the environment: A thematic analysis. *Emerging Contaminants* 9: 100205.
- Babalola, O.O., Truter, J.C.H., Van Wyk, J.H. 2020. Lethal and Teratogenic Impacts of Imazapyr, Diquat Dibromide, and Glufosinate Ammonium Herbicide Formulations Using Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 80: 708-716.
- Banaee, M., Soltanian, S., Sureda, A., Gholamhosseini, A., Haghi, B.N., Akhlaghi, M., Derikvandy, A. 2019. Evaluation of single and combined effects of cadmium and micro-plastic particles on biochemical and immunological parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere* 236: 124335.
- Bari, N.E.L., Motia, S., Ennaji, M.M., Bouchikhi, B. 2023. Chapter 16 - Detection of triclosan and sodium lauryl sulfate in environmental samples and cosmetic product by electrochemical sensor based on biomimetic recognition combined with electronic nose. *Oncogenic Viruses* 2: 349-378.
- Cahova, J., Blahova, J., Plhalova, L., Svobodova, Z., Faggio, C. 2021. Do Single-Component and Mixtures Selected Organic UV Filters Induce Embryotoxic Effects in Zebrafish (*Danio rerio*)? *Water* 13: 2203.
- Carlsson, G., Norrgren, L. 2004. Synthetic musk toxicity to early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46: 102-5.
- Dambal, V.Y., Selvan, K.P., Lite, Ch., Barathi, S., Santosh, W. 2017. Developmental toxicity and induction of vitellogenin in embryo-larval stages of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to methyl Paraben. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 141: 113-118.
- Dawood, A., Drage, S.D., Haeed, S., Abdallah Abou-Elwafa, M. 2024. Concentrations, partitioning and ecological risk of pharmaceuticals and personal care products in UK freshwater sediment. *Environmental Pollution and Management* 1: 87-89.

- Freitas, R., Arrigo, F., Coppola, F., Meucci, V., Battaglia, F., Soares A.M.V.M., Pretti, C., Faggio, C. 2023. Combined effects of temperature rise and sodium lauryl sulfate in the Mediterranean mussel. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 100: 104132.
- Freitas, R., Silvestro, S., Coppola, F., Costa, S., Meucci, V., Battaglia, F., Intorre, L., Soares, A.M.V.M., Pretti, C., Faggio, C. 2020. Toxic impacts induced by Sodium lauryl sulfate in *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 242: 110656.
- Freitas, R., Silvestro, S., Coppola, F., Meucci, V., Battaglia, F., Intorre, L., Soares, Amadeu M.V.M., Pretti, C., Faggio, C. 2019. Biochemical and physiological responses induced in *Mytilus galloprovincialis* after a chronic exposure to salicylic acid. *Aquatic Toxicology* 214: 105258.
- Homem, V., Llompart, M., Vila, M., Ribeiro, A.R.L., Garcia-Jares, C., Ratola, N., Celeiro, M. 2022. Gone with the flow - Assessment of personal care products in Portuguese rivers. *Chemosphere* 293: 133552.
- Horie, Y. 2023. Environmentally relevant concentrations of triclosan induce lethality and disrupt thyroid hormone activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 100: 104151.
- Impellitteri, F., Riolo, K., Multisanti, C.R., Zicarelli, G., Piccione, G., Faggio, C., Giannetto, A. 2024. Evaluating quaternium-15 effects on *Mytilus galloprovincialis*: New insights on physiological and cellular responses. *Science of The Total Environment* 918: 170568.
- Ismail, T., Lee, H.K., Kim, Ch., Kim, Y., Lee, H., Kim, J.H., Kwon, S., Huh, T.L., Khang, D., Kim, S.H., Choi, S.Ch., Lee, H.S. 2019. Comparative analysis of the developmental toxicity in *Xenopus laevis* and *Danio rerio* induce by Al₂O₃ nanoparticle exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 38: 2672-2681.
- Jyoti, D., Sinha, R. 2023. Physiological impact of personal care product constituents on non-target aquatic organisms. *Science of The Total Environment* 905: 167229.
- Keshari, V., Adeeb, B., Simmons, A.E., Simmons, T.W., Diep, C.Q. 2016. Zebrafish as a model to assess the teratogenic potential of nitrite. *Journal of Visualized Experiments* 108: 53615.
- Li, H.M., Zhang, Y.Ch., Li, Y.Y., Zhu, Q.Q., Li, J., Xu, H.M., Xiong, Y.M., Qin, Z.F. 2023b. Low concentrations of benzophenone-type UV-filters impair testis development in the amphibian *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology* 254: 106371.
- Li, S., Chu, Y., Ren, N., Ho, S.H. 2023. Cytochrome P450 enzyme-based biotransformation of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) by microalgae in the aquatic environment. *Chemical Engineering Journal* 476: 146557.
- Li, Z., Jia, K., Chen, X., Guo, J., Zheng, Z., Chen, W., Peng, Y., Yang, Y., Lu, H., Yang, J. 2023a. Exposure to Butylparaben Induces Craniofacial Bone Developmental Toxicity in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 265: 115523.
- Martyniuk, V., Matskiv, T., Yunko, K., Khoma, V., Gnatyshyna, L., Faggio, C., Stoliar, O. 2024. Reductive stress and cytotoxicity in the swollen river mussel (*Unio tumidus*) exposed to microplastics and salinomycin. *Environmental Pollution* 350: 123724.

- Medkova, D., Hollerova, A., Riesova, B., Blahova, J., Hodkovicova, N., Marsalek, P., Doubkova, V., Weiserova, Z., Mares, J., Faldyna, M., Tichy, F., Svobodova, Z., Lakdawala, P. 2023. Pesticides and Parabens Contaminating Aquatic Environment: Acute and Sub-Chronic Toxicity towards Early-Life Stages of Freshwater Fish and Amphibians. *Toxics* 11: 333.
- Merola, C., Perugini, M., Conte, A., Angelozzi, G., Bozzelli, M., Amorena, M. 2020. Embryotoxicity of methylparaben to zebrafish (*Danio rerio*) early-life stages. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 236: 108792.
- Modra, H., Vrskova, D., Macova, S., Kohoutkova, J., Hajslova, J., Haluzova, I., Svobodova, Z. 2011. Comparison of diazinon toxicity to embryos of *Xenopus laevis* and *Danio rerio*: Degradation of diazinon in water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 86: 604-604.
- Multisanti, C.R., Riolo, K., Impellitteri, F., Chebbi, I., Faggio, C., Giannetto, A. 2023. Short-term *in vitro* exposure of *Pinctada imbricata*'s haemocytes to quaternium-15: Exploring physiological and cellular responses. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 101: 104198.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2020. [online] [vid. 2024-20-10]. Dostupné z <https://stats.oecd.org>
- Oliveira, R., Domingues, I., Grisolia, C.K., Soares, A.M.V. 2009. Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. *Environmental Science and Pollution Research* 16: 679-688.
- Peng, F.J., Hu, L.X., Pan, Ch.G., Ying, G.G., Van den Brink, P.J. 2019. Insights into the sediment toxicity of personal care products to freshwater oligochaete worms using Fourier transform infrared spectroscopy. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 172: 296-302.
- Peng, X., Xiong, P., Ou, W., Wang, Z., Tan, J., Jin, J., Tang, C., Liu, J., Fan, Y. 2017. Persistence, temporal and spatial profiles of ultraviolet absorbents and phenolic personal care products in riverine and estuarine sediment of the Pearl River catchment, China. *Journal of Hazardous Materials* 323: 139-146.
- Plhalova, L., Blahova, J., Divisova, L., Enevova, V., Casuscelli di Tocco, F., Faggio, C., Tichy, F., Vecerek, V., Svobodova, Z. 2017. The effects of subchronic exposure to NeemAzal T/S on zebrafish (*Danio rerio*). *Chemistry and Ecology* 34: 199-210.
- Prakash, V., Jain, V., Chauhan, S.S., Parthasarathi, R., Roy, S.K., Anbunani, S. 2024. Developmental toxicity assessment of 4-MBC in *Danio rerio* embryo-larval stages. *Science of the Total Environment* 804: 149920.
- Princy Maria, J., Bhuvaneshwari, R., Nagarajan, V., Chandiramouli, R. 2019. Diethanolamine and quaternium-15 interaction studies on antimonene nanosheet based on first-principles studies. *Computational and Theoretical Chemistry* 1157: 19-27.
- Purnami, P., Nugroho, W.S., Sofí'i, Y.K., Wardana, I.N.G. 2024. The impact of sodium lauryl sulfate on hydrogen evolution reaction in water electrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy* 79: 1395-1405.
- Quintaneiro, C., Teixeira, B., Benedé, J.L., Chisvert, A., Soares, A.M.V., Monteiro, M.S. 2019. Toxicity effects of the organic UV-filter 4-Methylbenzylidene camphor in zebrafish embryos. *Chemosphere* 218: 273-281.

- Segundo, L.S., Martini, F., Pablos M.V. 2013. Gene expression responses for detecting sublethal effects of xenobiotics and whole effluents on a *Xenopus laevis* embryo assay. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32: 2018-2025.
- Sehonova, P., Hodkovicova, N., Urbanova, M., Örn, S., Blahova, J., Svobodova, Z., Faldyna, M., Chloupek, P., Briedikova, K., Carlsson, G. 2019a. Effects of antidepressants with different modes of action on early life stages of fish and amphibians. *Environmental Pollution* 254: 112999.
- Sehonová, P., Plhalová, L., Blahová, J., Svobodová, Z. 2016. Embrya ryb jako alternativní modely v toxikologii. *Veterinářství* 66: 692-696.
- Sehonova, P., Zikova, A., Blahova, J., Svobodova, Z., Chloupek, P., Kloas, W. 2019b. mRNA expression of antioxidant and biotransformation enzymes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after exposure to the tricyclic antidepressant amitriptyline. *Chemosphere* 217: 516-521.
- Shaidani, N.I., McNamara, S., Wlizla, M., Horb M.E. 2021. Obtaining *Xenopus laevis* Embryos. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2021(3).
- Sureda, A., Capó, X., Busquets-Cortés, C., Tejada, S. 2018. Acute exposure to sunscreen containing titanium induces an adaptive response and oxidative stress in *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 149: 58-63.
- Tresnakova, N., Famulari, S., Zicarelli, G., Impellitteri, F., Pagano, M., Presti, G., Filice, M., Caferro, A., Gulotta, E., Salvatore, G., Sandova, M., Vazzama, I., Imbrogno, S., Capillo, G., Savoca, S., Velisek, J., Faggio, C. 2023. Multi-characteristic toxicity of enantioselective chiral fungicide tebuconazole to a model organism Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 (*Bivalve: Mytilidae*). *Science of The Total Environment* 862: 160874.
- Velíšek J. (ed.) 2018. Vodní toxikologie pro rybáře. Jihočeská univerzita, Fakulta rybářství a ochrany vod.
- Zicarelli, G., Faggio, G., Blahova, J., Riesova, B., Hesova, R., Doubkova, V., Svobodova, Z., Lakdawala, P. 2024. Toxicity of water-soluble polymers polyethylene glycol and polyvinyl alcohol for fish and frog embryos. *Science of The Total Environment* 933: 173154.
- Zicarelli, G., Multisanti, C.R., Falco, F., Faggio, C. 2022. Evaluation of toxicity of Personal Care Products (PCPs) in freshwaters: Zebrafish as a model. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 94: 103923.

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2024

Identifikační číslo projektu: 2024ITA31

Název projektu: One Health Concept, molekulární epidemiologie antibiotické rezistence bakterií izolovaných z volně žijících ptáků a drůbeže

Řešitel projektu: prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.

CEITEC VETUNI Brno, Výzkumná skupina Infekční choroby a mikrobiologie

E-mail: cizeka@vfu.cz

Telefon: +420 541562274

Řešitelský kolektiv:

složení řešitelského týmu: (akademičtí pracovníci a jejich příslušnost k ústavům nebo klinikám fakulty nebo výzkumným skupinám CEITEC, studenti DSP) a forma zapojení každého člena řešitelského týmu

prof. MVDr. Alois Čížek, CSc. (VETUNI, 1,0 AP, CEITEC) Koordinace řešení projektu, plánování řešitel projektu experimentů, koordinace laboratorních vyšetření, analýza dat, příprava publikačních výstupů.

doc. RNDr. Monika Dolejská, Ph.D. (AP na FVHE 0,1, vedoucí projektový výzkumný pracovník CEITEC 0,4). Plánování experimentů, koordinace laboratorních zástupce řešitele projektu vyšetření, analýza dat, příprava publikačních výstupů, prezentace na konferencích

Mgr. Iva Sukkar, Ph.D. VETUNI, 0,5 (projektový výzkumný pracovník CEITEC 0,5) Dohled nad prací studentů v laboratoři, celogenomové sekvenování, základní bioinformatická analýza dat, příprava publikačních výstupů, prezentace na konferencích

Mgr. Jana Palkovičová, Ph.D. VETUNI, 0,5 (projektový výzkumný pracovník CEITEC 0,5)

Pokročilé bioinformatické analýzy dat, sekvenování na platformě MinION a zpracování dat, příprava publikačních výstupů, prezentace na konferencích

DSP studenti:

Mgr. Markéta Ryšavá, DSP student VETUNI, prezenční forma, 2. ročník

Forma zapojení: izolace plazmidové DNA pro celogenomové sekvenování, PCR detekce genů rezistence, příprava podkladů pro publikační výstupy a prezentace na konferencích

Mgr. Jarmila Laušová, DSP student VETUNI, prezenční forma, 2. ročník

Forma zapojení: příprava kultivačních médií, izolace DNA, agarová gelová elektroforéza, izolace genomové DNA pro celogenomové sekvenování, příprava podkladů pro publikační výstupy a prezentace na konferencích

Mgr. Michaela Růžičková, DSP student VETUNI, prezenční forma, 3. ročník

Forma zapojení: příprava DNA knihoven pro celogenomové sekvenování, bioinformatická analýza sekvencí plazmidů, příprava podkladů pro publikační výstupy a prezentace na konferencích

Mgr. Kristína Krúteková, DSP student VETUNI, prezenční forma, 1. ročník

Forma zapojení: příprava NGS knihoven, pomoc při MinION sekvenování, příprava podkladů pro publikační výstupy a prezentace na konferencích

MVDr. Lucia Zelinová, DSP student VETUNI, prezenční forma, 1. ročník

Forma zapojení: selektivní kultivace, identifikace bakterií metodou MALDI-TOF, archivace izolátů, testování citlivosti k antibiotikům, příprava podkladů pro publikační výstupy a prezentace na konferencích

V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu: ne

Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Výzkumná skupina Infekčních chorob a mikrobiologie CEITEC VETUNI se dlouhodobě zabývá řešenou problematikou, která plně zapadá do rámce výzkumu na VETUNI a postihuje základní složky konceptu jednoho zdraví. S ohledem na rychlý rozvoj v oboru molekulární epidemiologie výzkumná skupina implementovala pokročilé metodiky včetně celogenomového sekvenování a bioinformatické analýzy

dat, čímž se zvýšila kvalita publikačních výstupů a celková konkurenceschopnost pracoviště. Na řešení projektu se podílelo 5 studentů DSP a také pregraduální studenti VETUNI řešící své kvalifikační práce.

Cíle projektu:

Cílem projektu bylo detailně charakterizovat izoláty *E. coli* s klinicky významnými mechanismy rezistence k antibiotikům v populacích volně žijících migrujících ptáků, v odpadní a povrchové vodě, a ve střevě kura domácího za využití komparativní genomiky a následně zhodnotit rozšíření patogenních kmenů a genů rezistence nesených plasmidy.

Popis a metodika řešení projektu:

Byla dokončena komparativní genomika izolátů *E. coli* s rezistencí ke kriticky důležitým skupinám antibiotik pocházejících z migrujících dravých a vodních ptáků z České republiky a několika lokalit v Evropě. Vedle vzorků z volně žijících ptáků byly rovněž vyšetřeny vzorky z jejich prostředí (voda z vodní nádrže). Pokračovali jsme s vyšetřením souboru izolátů získaných v roce 2022 z odpadních vod a z vodních toků ve vybraných městech v ČR a dále nutrií obývajících toto prostředí. Dle výsledků úvodní genotypizace vybráno 200 izolátů ze zvířat a prostředí, který bylo podrobena celogenomovému sekvenování. Dokončili jsme rovněž genotypizaci 122 kmenů a sekvenování plasmidů z kloakálních výtěrů racků stříbřitých vyšetřených v rámci projektu pro sledování dynamiky kolonizace rezistentními kmeny *E. coli*.

Ze souboru cca 500 vzorků kloakálních výtěrů z dravců z Evropy a Afriky byla provedena selektivní kultivace vybraných rezistentních a patogenních bakterií. Bylo získáno 20 izolátů kultivace salmonel s využitím modifikovaného polotuhého média dle Rappaport-Vassiliadise, u kterých byla následně provedena detailní fenotypová a genotypová charakterizace. Dále bylo na půdách s antibiotiky získáno 176 izolátů *E. coli* a *Klebsiella* spp. s rezistencí k cefotaximu. Druhová identifikace kmenů byla ověřena metodou MALDI-TOF. U kmenů byla provedena komparace jejich genomu za využití PFGE a reprezentativní izoláty byly podrobena celogenomovému sekvenování a momentálně probíhá základní bioinformatické zpracování dat. Dále bylo provedeno celogenomové sekvenování a analýza dat souboru 85 izolátů *Escherichia coli* z chovů drůbeže v ČR získaných ve spolupráci se Státním veterinárním ústavem Jihlava. Při analýze produkčního řetězce masné drůbeže bylo výše uvedeným postupem vyšetřeno 98 vzorků vaječných skořápek z centrální líhně, které pocházely z 18 rodičovských chovů. Dále bylo vyšetřeno 376 vzorků slepých střev jatečných brojlerů, kteří pocházeli z 16 farem. Pro WGS a komparativní genomiku bylo v první fázi vybráno 31 izolátů z líhní a 23 izolátů z jatečných brojlerů.

Dosažené výsledky projektu:

Výsledky vyšetření racků stříbřitých ze dvou hnízdních sezón 2018 a 2019 byly úspěšně publikovány v časopise *Environment International*. Byla dokončena komparativní analýza rezistentních izolátů *E. coli* z Evropy a Afriky. Studie ukázala na vysokou prevalenci a diverzitu genů antibiotické rezistence a častou produkci ESBL/AmpC beta-laktamázy a přítomnost sekvenčních typů spojených s patogenitou. Ze 107 izolátů rezistentních k cefalosporinům získaných z dravců (2018–2022, Evropa) neslo 69 genů pro ESBL (zejména blaCTX-M-14/15) a 29 genů pro AmpC beta-laktamázy (zejména blaCMY-2). Celogenomové sekvenování 151 izolátů *E. coli* s rezistencí k cefalosporinům původem z dravců z Evropy a Afriky (sběr vzorků 2023–2024) potvrdilo přítomnost genů pro ESBL (hlavně blaCTX-M-15) a AmpC (hlavně blaCMY-2). U 25 izolátů *Klebsiella pneumoniae* byly detekovány geny pro produkci ESBL (zejména blaCTX-M-15). Nejčastějším sekvenčním typem byl ST131 (n=12). Více než 70 % izolátů

vykazovalo multirezistenci ke třem nebo více třídám antibiotik. Byla zahájena příprava publikace z první části těchto výsledků. Byly provedeny základní bioinformatické analýzy souboru izolátů z povrchové vody a sedimentů ve vybraných lokalitách v ČR a nutrií, které toto prostředí obývají. Z celkového počtu 90 sekvenovaných izolátů bylo 67 izolátů *E. coli* (37 z prostředí, 30 z nutrií) a 23 izolátů *Citrobacter* spp. (19 z prostředí, 4 z nutrií). U souboru *E. coli* bylo identifikováno 31 různých sekvenčních typů (ST), přičemž nejčastěji se jednalo o ST10 (n=7), ST457 (n=7), ST117 (n=6) a ST942 (n=6). U souboru *Citrobacter* bylo identifikováno 11 sekvenčních typů, u téměř poloviny izolátu nebyl ST stanoven, jedná se o nové varianty. Celkem bylo identifikováno 69 různých genů rezistence. U souboru *E. coli* bylo nalezeno sedm variant širokospektré beta-laktamázy CTX-M, a u jednoho izolátu byl potvrzen gen pro karbapenemázu blaOXA-244. U souboru *Citrobacter* bylo identifikováno deset variant AmpC beta-laktamázy CMY a sedm variant genu *qnrB*, poskytujících rezistenci k chinolonům. Byla provedena komparativní genomika a analýza plazmidů z izolátů *E. coli* z racků stříbřitých za účelem studia dynamiky kolonizace jejich střeva. Mezi jednotlivými racky byl pozorován přenos rezistentních kmenů *E. coli* včetně výměny plazmidů nesoucích geny rezistence mezi těmito kmeny. Rezistentní *E. coli* se ve střevě racků byly schopny udržet po celou dobu experimentu, a to i po odstranění selekčního tlaku prostředí. Racci tak jakožto migrující ptáci mohou sloužit jako sekundární zdroj antibiotické rezistence pro životní prostředí a další volně žijící zvířata. Sekvenační analýza souboru 85 izolátů *E. coli* z chovů kura domácího ukázala na časté zastoupení aviární patogenních linií *E. coli* ST69, ST101, ST117, ST135 a ST162. U 14/85 izolátů byla navíc zjištěna produkce ESBL/AmpC beta-laktamáz typu CTX-M a CMY. Většina kmenů zároveň vykazovala multirezistentní profil, nesla řadu genů pro patogenitu a virulenci plazmidy typu ColV. Analýzou kmenů získaných z líhně byly prokázány suspektně rizikové linie ST117-O24/H4-G, ST117-O143:H4-G – typická epidemická APEC; ST135, ST69 – potenciálně zoonotické ExPEC linie a ST1485-O83:H42-F – emergentní ExPEC linie. Mezi izoláty *E. coli* z jatečných brojlerů byly prokázány producenti betalaktamáz typů CTX-M-1 (52,2 %), CMY-2 (17,4 %), CTX-M-14, CTX-M-55, CTX-M-101, SHV-12 a suspektně rizikové emergentní linie ST1485-O83:H42-F, která se opakovaně vyskytovala i ve vzorcích z líhně.

Přínos projektu:

Projekt přinesl nové poznatky o zdrojích, cestách šíření a molekulární epidemiologii enterobakterií s rezistencí ke kriticky důležitým skupinám antibiotik ve vodě, u volně žijících zvířat spojených s vodním prostředím a v chovech kura domácího. Projekt poukázal na genetickou diverzitu těchto bakterií, rychlou a komplexní dynamiku kolonizace střeva, častý výskyt patogenních linií a vysokou míru rezistence k různým skupinám antimikrobiálních látek.

Využití výsledků:

Výsledky studie budou publikovány ve vědeckých zahraničních časopisech s impakt faktorem. Výsledky byly prezentovány na domácích a mezinárodních konferencích (International Microbiological Societies Congress v Itálii, Environmental Dimension of Antibiotic Resistance v Kanadě a Konference CZEPAR: jak společně zastavit nezastavitelné v Praze) a s dalšími prezentacemi se počítá v dalších letech. Celogenomová data budou vložena do veřejné databáze GenBank. Výsledky budou využity v doktorských pracích studentů DSP participujících na projektu.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

TER KUILE B.H., ECONOMOU V.K., HAENNI, M., DOLEJSKA, M. Driving factors for the spread of antimicrobial resistance. Příprava kapitoly v knize, nakladatelství Springer. Publikace během 2025.

ZELINOVÁ, L., SUKKAR, I., DAVIDOVÁ GERŽOVÁ, L., NOHEJL, T., RŮŽIČKOVÁ, M., LITERÁK, I., ONRUBIA, A., EL KHAMLICHI, R., KUMPRECHT, D., DOLEJSKÁ, M. Transcontinental spread of antibiotic resistant enterobacteria via black kites. Příprava publikace pro odeslání do časopisu s impakt faktorem do června 2025.

RUZICKOVA, M., NESPOROVA, K., PALKOVICOVA, J., KREJCI, S., LITERAK, I., DOLEJSKA, M. Genomics of multi-resistant *Escherichia coli* circulating in a colony of gulls: changes in dynamics show importance of longitudinal wildlife studies. Příprava publikace pro odeslání do časopisu Environment International (IF 10,3) do února 2025.

PAPOUSKOVA, A. SUKKAR, I., PALKOVICOVA, J. CIZEK, A., Vertical transmission of avian pathogenic *Escherichia coli* in the Czech broiler production. Poultry Science, závěr roku 2025.

Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	1233 080,00	1233 080,00
Služby	205 000,00	205 000,00
Cestovné	165 000,00	165 000,00
Další provozní náklady	181 165,00	181 165,00
Doplňkové náklady	267 636,00	267 636,00
Celkem	2 051 881,00	2 051 881,00

Zdůvodnění nákladů:

Osobní náklady:

Služby: Plánovaná částka 205 000,00 Kč byla využita na služby spojené se sekvenováním mna platformách Illumina pro určení variant genů antibiotické rezistence, sekvenčních typů, plazmidových replikonů a virulenních faktorů; dále publikační náklady, externí grafické práce, bioinformatické analýzy, jazykové korektury, nutné opravy a servis zařízení.

Cestovné: Plánovaná částka 165 000,00 Kč byla použita na služební cesty spojené s řešením projektu. Odběry vzorků v líhních a rodičovských chovech drůbeže, prezentace výsledků na zahraničních konferencích. Konkrétně se jednalo o tyto zahraniční služební cesty: Palkovičová/Ryšavá - International Symposium on Plasmid Biology 2024, Hamamatsu, Japonsko (aktivní účast); Zelinová

International Union of Microbiological Society 2024, Itálie (aktivní účast); Dolejská EcotoxicMic2024-4th International Conference in Microbial Ecotoxicology (aktivní účast).

Další provozní náklady: Přidělená částka 181 165,00 Kč byla využita pro nákup médií a misek pro bakteriologickou kultivaci, bakteriologické klíčky, bakteriologické hokejky, antibiotika a antibiotické disky, zkumavky různého objemu, pipetovací špičky, dezinfekce, spotřební materiál pro izolaci DNA a RNA (izolační kity), polymerázovou řetězovou reakci (PCR voda, Taq polymeráza, purifikační enzymy, mastermixy, primery, fluorescenčně značené primery), elektroforézu (agaróza, hmotnostní standardy, barviva pro vizualizaci DNA), spotřební plastik (mikrozkumavky, pipetovací špičky), ochranné rukavice. Kity Nextera XT Library prep, Nextera XT Index kit a MiSeq kit V2, chemikálie pro přípravu knihoven a sekvenování genomů s využitím platformy Illumina, MiniON flow cell a Rapid Barcoding kit (Oxford Nanopore Technologies).

Doplňkové náklady: Přidělená částka 267 636,00 Kč sloužila k úhradě režijních nákladů.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě doložte výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2024 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude odkazovat na podporu ITA VETUNI. Výhradní odkaz na projekt ITA VETUNI (bez odkazů na podporu z dalších grantů, projektů a jim obdobných finančních zdrojů) musí obsahovat vždy nejméně jedna publikace s impakt faktorem na každých 1,5 milionu korun způsobilých nákladů projektu, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu:

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2024 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu **odpovědného za čerpání prostředků:**

Přednosta ústavu nebo kliniky, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu nebo klinice, respektive celoškolském pracovišti, které řídí.

Datum, jméno a podpis

přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2024

Identifikační číslo projektu: 2024ITA32

Název projektu: Geny chování ve vztahu k domestikaci u čeledi *Equidae*

Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: Mgr. Martin Plášil, Ph.D.

Fakulta/celoškolské pracoviště: CEITEC VETUNI, RG Animal Immunogenomics

E-mail: plasilma@vfu.cz

Telefon: +420541562289

Řešitelský kolektiv:

Řešitelský tým je složen z pracovníků výzkumné skupiny Animal Immunogenomics CEITEC VETUNI Brno. Uvedené úvazky pracovníků platí pro CEITEC.

Mgr. Martin Plášil, Ph.D., 1,0 FTE, molekulární analýza vybraných genů

Mgr. Ján Futas, Ph.D., 1,0 FTE, molekulární analýza vybraných genů

MVDr. Jana Bubeníková, Ph.D., 0,5 FTE, populačně genetické analýzy

V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu:

Projekt byl řešen pouze v rámci CEITEC VETUNI.

Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Předmět řešení projektu zapadá do Priorit soutěže ITA VETUNI v bodech „problematika veterinární molekulární biologie“ a „problematika ochrany zvířat, welfare a etologie včetně působení stresorů a toxinů na zvířata“.

Cíle projektu:

Cíle projektu jsou:

1. Charakterizace vybraných genů spojených s chováním a potenciálně s domestikací koňovitých.

2. Analýza rozdílů mezi domestikovanými a nedomestikovanými druhy na základě fylogenetických a selekční analýz vybraných genů.

Popis a metodika řešení projektu:

Na základě dostupných informací byly vybrány kandidátní geny s vazbou na chování u čeledi *Equidae*. Byly vybrány geny *ZFPM1*, *OXTR* a *DRD4*.

Tyto geny byly vyšetřeny u koně domácího (Achaltekinský kůň, Shagya Arab, Islandský pony, koně z oblastí Camargue a Mongolska), koně Převalského, osla domácího, osla somálského, Kianga, Kulana, Zebry stepní, Zebry horské a Zebry Grévyho.

Analýza genů spočívá v návržení primerů a amplifikaci vybraných genů nebo jejich částí. Výsledné amplikony jsou sekvenovány pomocí Illumina MiSeq sekvenátoru a výsledná hrubá data prochází standardní bioinformatickou analýzou. Na základě očištěných dat jsou identifikována polymorfni místa a genotypy, které slouží k zhodnocení variability daných druhů/populací/plemen. Data jsou následně použita pro fylogenetické a selekční analýzy.

Dosažené výsledky projektu:

U vybraných zástupců čeledi *Equidae* byly sekvenovány geny *ZFPM1* a *OXTR*.

Výsledky laboratorních analýz jsou v současné době zpracovávány bioinformatickými postupy (sekvenční, fylogenetické a selekční analýzy).

Přínos projektu:

Projekt přináší prioritní genomická data o dvou vybraných kandidátních genech u čeledi *Equidae* a jejich potenciálním významu v procesu domestikace v rámci čeledi. Výsledky projektu budou využity pro účely bakalářské práce studentky Kateřiny Požárové.

Využití výsledků:

U různých druhů koňovitých probíhaly pokusy o domestikaci s rozdílnou úspěšností. Získaná data mohou přispět k charakterizaci genetických faktorů zodpovědných za tyto rozdíly a k formulaci hypotéz pro navazující výzkum v této oblasti.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

Inter- and intra-specific differences in behaviour-influencing genes *ZFPM1* and *OXTR* in the family *Equidae*.

Journal of Animal Behaviour and Biometeorology

Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	267 600	267 600
Služby	75 000	44 966,63
Cestovné	0	0
Další provozní náklady	298 156	328 184,41
Doplňkové náklady	96 113	96 117,96
Celkem	736 869	736 869

Zdůvodnění nákladů:

Osobní náklady: Byly použity v souladu s plánem řešení ve formě odměn pro pracovníky na projektu. Odměny byly vyplaceny v polovině řešení projektu a na jeho konci.

Služby: Sekvenační služby (45 tis. Kč.). Zbytek převeden do provozních nákladů v souladu s podmínkami čerpání projektu ITA.

Cestovné: nebylo čerpáno.

Další provozní náklady: Sekvenační kity (190 tis. Kč), polymerázy (95 tis. Kč), laboratorní reagentie (26 tis. Kč) laboratorní plasty spotřební zboží a drobné vybavení (8,5 tis. Kč).

Doplňkové náklady: Byly čerpány v souladu s plánem projektu.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě doložte výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2024 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude odkazovat na podporu ITA VETUNI. Výhradní odkaz na projekt ITA VETUNI (bez odkazů na podporu z dalších grantů, projektů a jim obdobných finančních zdrojů) musí obsahovat vždy nejméně jedna publikace s impakt faktorem na každých 1,5 milionu korun způsobilých nákladů projektu, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu:

8.1.2025 Mgr. Martin Plášil, Ph.D.

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2024 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu **odpovědného za čerpání prostředků:**

8.1.2025 Mgr. Martin Plášil, Ph.D.

Přednosta ústavu nebo kliniky, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu nebo klinice, respektive celoškolském pracovišti, které řídí.

Datum, jméno a podpis

přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

8.1.2025 prof. MVDr. RNDr. Petr Hořín, CSc.

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

prof. MVDr. Jiří Smola, CSc.

Razítko