

Závěrečné zprávy projektů ITA
realizovaných v roce 2022
prostřednictvím
Interní tvůrčí agentury VETUNI



VETUNI 2022

Vážení kolegové,

v roce 2022 úspěšně pokračovala činnost Interní tvůrčí agentury VETUNI (ITA VETUNI), jako jednoho z pilířů strategie rozvojového plánu tvůrčí činnosti na univerzitě. Aktivity ITA VETUNI a jejím prostřednictvím financovaných projektů se vrátily do svých původních kolejí po překážkách, které pro výzkumné aktivity, vědeckou spolupráci a kontakty představovala pokračující epidemie koronavirové infekce.

Agentura ITA je financována z prostředků MŠMT určených pro Dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace (DKRVO). Během čtvrtého roku své existence financovala ITA celkem 13 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 2022 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 2022.

prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.

prorektor pro vědu, výzkum a zahraniční vztahy
předseda Komise ITA VETUNI

Brno, leden 2023

Komise Interní tvůrčí agentury VETUNI

ITA VETUNI

prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.

předseda komise

prof. MVDr. Vladimír Večerek, CSc., MBA

místopředseda

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 2022

| Číslo projektu | Název projektu | Řešitel |
|----------------|---|---|
| 2022ITA11 | Hodnocení vybraných imunologických parametrů v periferní krvi, efuzích a tekutině získané bronchoalveolární laváží u koní | MVDr. Pavla Hamouzová, Ph.D. |
| 2022ITA12 | Monitoring závažných bakteriálních a virových infekcí u prasete divokého v ČR. | prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D. |
| 2022ITA13 | Genetická vnímavost k sarkoidu u koní | prof. MVDr. RNDr. Petr Hořín, CSc. |
| 2022ITA14 | Problematika chorob přežvýkavců a prasat. A) Poruchy energetického metabolismu krav v tranzitním období zaměřené na studium etiopatogeneze NEB, steatózy jater, ketózy a souvisejících onemocnění. B) Využití intrafolikulárního transferu oocytů k maturaci oocytů in vivo u skotu. C) Monitorování výskytu colibacilózních průjmů selat po odstavu po zákazu medikace krmiv ZnO | doc. MVDr. Josef Illek, DrSc. Dipl. ECBHM |
| 2022ITA15 | Autofagie a chondrogenese: výzkum zaměřený na kaspázy a osteoartritidu | prof. RNDr. Eva Matalová, Ph.D. |
| 2022ITA16 | Nové léčebné postupy v diagnostice a terapii onemocnění zvířat zájmových chovů | doc. MVDr. Michal Crha, Ph.D. |
| 2022ITA21 | Zdraví jako předpoklad welfare zvířat | prof. Ing. Eva Voslášková, Ph.D. |
| 2022ITA22 | Vnitropopulační genetická struktura hostitelů a vektorů z pohledu šíření původců nálezů | prof. MVDr. Pavel Široký, Ph.D. |
| 2022ITA23 | Vliv bioaktivních látek na funkční vlastnosti potravin (jedlých obalů) a imunoreaktivitu alergenních proteinů | doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D. |

| | | |
|-----------|---|--|
| 2022ITA24 | Vybrané aspekty zdravotní nezávadnosti a kvality alternativ masa na bázi rostlinných bílkovin | doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D. |
| 2022ITA25 | Zoologická medicína: zdravotní problematika zvěře, netopýrů, obojživelníků a ryb | prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D., dipl. ECZM |
| 2022ITA26 | Výživa potravinových zvířat jako nezbytný předpoklad zajištění jejich dobrého zdravotního stavu a kvality finální živočišné potraviny | doc. MVDr. Radka Dobšíková, Ph. D. |
| 2022ITA31 | One Health Concept II, epizootologie infekčních chorob domácích a volně žijících zvířat | Prof. MVDr. Ivan Literák, CSc. |

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2022

1. Identifikační číslo projektu: 2022ITA11

2. Název projektu: Hodnocení vybraných imunologických parametrů v periferní krvi, efuzích a tekutině získané bronchoalveolární laváží u koní

3. Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: MVDr. Pavla Hamouzová, Ph.D.

Fakulta/celoškolské pracoviště: FVL

E-mail: hamouzovap@vfu.cz

Telefon: 731923483

4. 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

Sekce morfologie a fyziologie

MVDr. Pavla Hamouzová, Ph.D. – odborná asistentka na Ústavu fyziologie, úvazek 1,0, odpovídá za provádění analýz průtokovou cytometrií a metodou ELISA, včetně interpretace výsledků.

MVDr. Šárka Stehlíková, Ph.D. – odborná asistentka na Ústavu fyziologie, úvazek 1,0, participace na provádění analýz průtokovou cytometrií.

MVDr. Petr Čížek, Ph.D. – odborný asistent na Ústavu anatomie, histologie a embryologie, úvazek 1,0, participace na provádění analýz průtokovou cytometrií.

Sekce chorob malých zvířat

MVDr. Kristína Řeháková, Ph.D. – odborná asistentka v Klinické laboratoři pro malá zvířata, úvazek 1,0, vedoucí Klinické laboratoře pro malá zvířata, odpovídá za cytologické vyšetřování vzorků, zavedení a optimalizaci průtokové cytometrie a za provádění analýz metodou ELISA.

Sekce chorob velkých zvířat

MVDr. Olga Dobešová, Ph.D. – odborná asistentka na Klinice chorob koní, oddělení interních nemocí, úvazek 1,0, odpovídá za odběr anamnézy, klinické vyšetření pacientů, odběr vzorků, participace na interpretaci výsledků.

MVDr. Zuzana Drábková, Ph.D. – odborná asistentka na Klinice chorob koní, oddělení interních nemocí, úvazek 1,0, odpovídá za odběr anamnézy, klinické vyšetření pacientů, odběr vzorků, participace na interpretaci výsledků.

MVDr. Zuzana Kecerová, Ph.D. – odborná asistentka na Klinice chorob koní, oddělení interních nemocí, úvazek 1,0, odpovídá za odběr anamnézy, klinické vyšetření pacientů, odběr vzorků, participace na interpretaci výsledků.

MVDr. Libor Podojil – student DSP, OR Choroby koní, téma disertační práce „Diferenciální diagnostika onemocnění dolních cest dýchacích“, odpovídá za odběr anamnézy, klinické vyšetření pacientů, odběr vzorků, participace na interpretaci výsledků.

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

Řešení projektu vyžadovalo spolupráci pracovišť tří sekcí FVL VETUNI, konkrétně Ústavu fyziologie, Ústavu anatomie, histologie a embryologie, Klinické laboratoře pro malá zvířata a Kliniky chorob koní. Ústav fyziologie, Ústav anatomie, histologie a embryologie a Klinická laboratoř pro malá zvířata zajišťovaly laboratorní analýzy vzorků, jejichž odběr prováděla Klinika chorob koní. Ústav fyziologie personálně zařadil zejména imunohematologickou část projektu, Klinická laboratoř pro malá zvířata provedení rutinních diagnostických vyšetření a část imunologických analýz. Participace Kliniky chorob koní umožnila začlenění klinických aspektů tématu. Projekt prohloubil odbornou spolupráci a výzkumné aktivity uvedených pracovišť fakulty.

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Projekt tematicky navázal na aktuální znalosti týkající se dané problematiky, přičemž rozšířil spektrum znalostí o nové poznatky. Předmětem řešení projektu bylo využití průtokové cytometrie u koní jak z hlediska výzkumu, který přinesl nové poznatky týkající se patogeneze equinního astmatu různých stupňů závažnosti a imunofenotypizace mononukleárních buněk ve vztahu k patogenezi peritoneálních efuzí u koní, tak také z hlediska zkvalitnění diagnostických postupů, navíc umožnil začlenění průtokové cytometrie mezi diagnostické metody prováděné Klinickou laboratoří pro malá zvířata.

Výzkum imunofenotypizace lymfocytů u domácích zvířat metodou průtokové cytometrie je na VETUNI prováděn od roku 2021, kdy byl uveden do provozu průtokový cytometr CytoFLEX B5-R3-V2 (Beckman Coulter, USA) v Klinické laboratoři pro malá zvířata VETUNI a na toto téma byl realizován výzkum v rámci řešení projektu 2021ITA15 (Vliv antibiotik a nesteroidních antiflogistik na trávicí trakt a imunitní systém králíka).

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Projekt se skládal z tematicky propojených částí, jejichž dílčími cíli byly:

1. imunofenotypizace mononukleárních buněk v tekutině získané bronchoalveolární laváží (BAL) a periferní krvi u koní s astmatem ve vztahu ke stupni závažnosti příznaků onemocnění
2. stanovení koncentrací vybraných cytokinů a matrixové metaloproteinázy-9 v bronchoalveolární laváží a periferní krvi u koní s astmatem a určení, do jaké míry koncentrace těchto analytů koreluje s klinickými příznaky pacienta
3. imunofenotypizace mononukleárních buněk ve vztahu ke koncentraci matrixové metaloproteinázy-9 v peritoneální efuzi u koní

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany):

Bronchoalveolární laváž, abdominocentéza a odběr periferní krve byly provedeny u pacientů Kliniky chorob koní v rámci rutinního diagnostického postupu. Takto získaný biologický materiál byl vyšetřen v Klinické laboratoři pro malá zvířata. Na zvířatech nebyl prováděn žádný úkon, který by splňoval definici pokusu dle § 3 písm. t) zákona č. 246/1992 Sb., v platném znění.

Pro pacienty s equinním astmatem byl vytvořen skórovací systém charakterizující závažnost klinických příznaků (stupeň 2–13, těžké astma od stupně 8). V tekutině získané bronchoalveolární laváží (BAL) byla spolu s rutinním cytologickým vyšetřením provedena doplňující analýza metodou průtokové cytometrie (CytoFLEX B5-R3-V2 Flow Cytometer, Beckman Coulter, USA) zaměřená na identifikaci základních subpopulací lymfocytů pomocí znaků CD3, CD4, CD8, CD21 a FoxP3, jejíž výsledek byl porovnáván s cytologickým nálezem (s % neutrofilů, % eozinofilů a % mastocytů) a se

závažností klinických příznaků (mírné-střední a těžké astma určené skórovacím systémem) a s věkem pacienta (<7 let, ≥7 let). U makrofágů byla hodnocena exprese CD14, CD16, CD86 a MHC II. Analyzováno bylo 21 vzorků BAL. Rutinní hematologická analýza vzorku periferní krve (hematologický analyzátor Sysmex XT-2000iV, Sysmex Corporation, Japan, a cytologické vyšetření centrifugovaných vzorků po obarvení dle Pappenheima) byla doplněna o vyšetření průtokovou cytometrií, již byly stanovovány tytéž lymfocytární znaky jako v BAL. Ve vzorku BAL a krevní plasmy byla metodou ELISA stanovena koncentrace IL-4, IL-10, IL-17 a IFN- γ , ve vzorku BAL navíc koncentrace MMP-9 (ELISA reader ELx808IU, BioTek Instruments, USA). Byla zjišťována souvislost se stupněm závažnosti klinických příznaků, s věkem pacienta a s cytologickým nálezem v BAL. Výsledky byly statisticky zhodnoceny v programu MedCalc Statistical Software. Byla provedena korelační analýza. Na základě výsledku Shapiro-Wilkova testu byla data hodnocena Mann-Whitneyho testem.

Efuze získané abdominocentézou byly rutinně vyšetřeny v Klinické laboratoři pro malá zvířata (celkový počet buněk stanovený hematologickým analyzátozem Sysmex XT-2000iV, Sysmex Corporation, Japan, základní biochemický profil, biochemický analyzátor Abbott Architect c4000, Abbott Laboratories, USA, a cytologické vyšetření centrifugovaných vzorků po obarvení Hemacolem) za účelem diferenciac zánětlivých a nezánnětlivých efuzí. Specifická analýza efuze zahrnovala sledování znaků charakterizujících monocytární linii na základě exprese CD14, CD16, CD86 a MHC II a zastoupení lymfocytárních subpopulací na základě exprese CD3, CD21, CD4 a CD8 (CytoFLEX B5-R3-V2 Flow Cytometer, Beckman Coulter, USA). Současně byl sledován vztah mezi expresí monocytárních znaků a koncentrací MMP-9 v efuzi stanovené metodou ELISA (ELISA reader ELx808IU, BioTek Instruments, USA). Analyzováno bylo 25 vzorků. Výsledky byly statisticky zhodnoceny v programu MedCalc Statistical Software. Na základě výsledku Shapiro-Wilkova testu byla analýza provedena Mann-Whitneyho testem.

Při analýzách průtokovou cytometrií byly použity FMO kontroly a analýzy metodou ELISA byly prováděny v dubletech. Pro průtokovou cytometrii byly vzorky zpracovávány v nejkratším možném čase od odběru (nejdéle do 2 hodin od odběru), pro hodnocení metodou ELISA byly vzorky zamraženy a skladovány při teplotě -80 °C až do samotné analýzy.

Dosažené výsledky projektu (max. 1/2 strany):

Do skupiny těžké astma bylo zařazeno 9 pacientů, kteří dosáhli skóre 8–11 ($9,1 \pm 1,25$). Do skupiny mírné-střední astma bylo zařazeno 12 pacientů, kteří dosáhli skóre 2–7 ($4,9 \pm 1,87$). Skóre pacientů se mezi oběma skupinami vysoce významně lišilo ($P=0,0002$) a jeho hodnota pozitivně korelovala s věkem ($r=0,63$, $P<0,01$). Věk pacientů v kategorii mírné-střední astma byl $7,6 \pm 3,40$ let, v kategorii těžké astma $11,9 \pm 4,05$ let, mezi oběma skupinami se tedy věk významně lišil ($P<0,05$). Cytologický nález na věku nezávisel, procento neutrofilů, eozinofilů či mastocytů se nelišilo u koní od 7 let věku oproti koním mladším 7 let ($P>0,05$).

U obou skupin bylo zjištěno v BAL významně nižší procento B lymfocytů než v periferní krvi ($P<0,01$) a vyšší procento T_c lymfocytů než v periferní krvi ($P<0,01$). U těžkého astmatu byl zaznamenán i nižší poměr T_h/T_c v BAL než v periferní krvi ($P<0,01$). U těžkého astmatu byla v BAL zjištěna pozitivní korelace procenta T_{reg} lymfocytů s cytologicky stanoveným procentem neutrofilů ($r=0,68$, $P<0,05$), poměru T/B s cytologicky stanoveným procentem neutrofilů ($r=0,75$, $P<0,05$) a poměru T/B s cytologicky stanoveným procentem eozinofilů ($r=0,83$, $P<0,01$). Se zvyšujícím se procentem neutrofilů a eozinofilů v BAL tedy u těžkého astmatu stoupal v BAL poměr T/B. U skupiny mírné-střední astma nebyla zjištěna korelace mezi zastoupením buněčných populací zjištěným cytologicky a procentem jednotlivých lymfocytárních subpopulací.

Zastoupení jednotlivých lymfocytárních subpopulací se mezi oběma skupinami významně nelišilo ($P>0,05$). Zastoupení jednotlivých lymfocytárních subpopulací se významně nelišilo u skupiny tvořené jedinci od 7 let oproti jedincům mladším 7 let ($P>0,05$).

V BAL byl IFN- γ detekovatelný jen u těžkého astmatu, u skupiny mírné-střední astma byl pod mezí detekce. Naopak IL-10 a IL-17 byly detekovatelné jen u mírného-středního astmatu, u těžkého astmatu byly jejich koncentrace v BAL pod mezí detekce. Koncentrace hodnocených cytokinů v BAL nekorelovala s hodnotami zjištěnými v krevní plasmě. Koncentrace MMP-9 byla signifikantně vyšší u skupiny těžké astma ($P < 0,05$). Koncentrace MMP-9 v BAL pozitivně korelovala s procentuálním zastoupením neutrofilů ($r = 0,9772$, $P < 0,01$).

Bylo analyzováno 18 vzorků transudátů a 7 vzorků exsudátů. Procentuální zastoupení jednotlivých lymfocytárních subpopulací se mezi oběma skupinami významně nelišilo, stejně tak exprese znaků charakterizujících monocytární linii ($P > 0,05$). Exsudáty obsahovaly vysoce signifikantně vyšší koncentraci MMP-9 než transudáty ($P < 0,01$). Mezi expresí sledovaných znaků monocytární linie a koncentrací MMP-9 nebyla zjištěna korelace.

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Byly zjištěny souvislosti stupně závažnosti klinických příznaků s imunofenotypem lymfocytů a koncentrací vybraných cytokinů v BAL u koní s astmatem. Byla provedena charakteristika mononukleárních buněk v zánětlivých a nezánětlivých efuzích ve vztahu ke koncentraci MMP-9. Projekt významně přispěl k rozvoji výzkumné činnosti zúčastněných pracovišť a v rámci Klinické laboratoře pro malá zvířata umožnil zavedení průtokové cytometrie mezi analýzy equinních vzorků.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Výsledky budou publikovány ve vědeckém časopise s impakt faktorem. Část výsledků bude využita v disertační práci na téma Diferenciální diagnostika onemocnění dolních cest dýchacích (MVDr. Podojil).

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

Immunophenotypic characteristics of mononuclear cells and analysis of cytokines in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood in horses with mild to equine severe asthma. Research in Veterinary Science

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

| Položka | Finanční prostředky | |
|---------------------------------------|---------------------|----------------|
| | Přidělené (v Kč) | Čerpané (v Kč) |
| Osobní náklady celkem (včetně odvodů) | 630100 | 630100 |
| Služby | 0 | 0 |
| Cestovné | 0 | 0 |
| Další provozní náklady | 388761 | 388761 |
| Doplňkové náklady | 152829 | 152829 |
| Celkem | 1171690 | 1171690 |

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

(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: odměny pro členy řešitelského kolektivu za časově i odborně náročnou práci na projektu (vypracování literární rešerše, tvorba skórovacího systému, zavedení a optimalizace metodiky analýz, provádění analýz, statistické hodnocení dat, interpretace výsledků, sepsání vědeckého článku a publikace výsledků)

Služby: nebylo plánováno

Cestovné: nebylo plánováno

Další provozní náklady: pořízení fluoresceiny značených primárních protilátek pro detekci zvolených znaků metodou průtokové cytometrie (CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD21, CD86, FoxP3, MHC II), Leucopermu k zajištění detekce intracelulárních znaků, lyzačních roztoků VersaLyse a BD, dalšího spotřebního materiálu nezbytného pro analýzu metodou průtokové cytometrie (fosfátový pufr, SheathFluid, FluidClean, Histopaque, CellTrics 100 µm, Versa Comp Antibody Capture Kit, mikrozkuřavky), ELISA kitů pro stanovení cytokinů (IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17) a matrixové metaloproteinázy 9

Doplňkové náklady: režijní náklady

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

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

9. 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: MVDr. Pavla Hamouzová, 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 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:**
MVDr. Pavla Hamouzová, 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. Jaroslav Doubek, 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 2021
(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu:

2. Název projektu: Monitoring závažných bakteriálních a virových infekcí u prasete divokého v ČR.

3. 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

4. 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

Doc. MVDr. Petr Lány, CSc. úvazek na projektu 1.0

MVDr. Dušan Haas, úvazek na projektu 1.0

MVDr. Keyra Tesa, Ph.D. úvazek na projektu 1.0

DSP studenti:

- **Mgr. Lucie Hrubá** 2. ročník DSP
- **MVDr. Dagmar Břinek Kolařová** 3. ročník DSP

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

Tento návrh je společným projektem Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie a Ústavu patologické morfologie a parazitologie, Fakulty veterinárního lékařství. Do řešení projektu nejsou zapojeny další součásti VETUNI.

6. 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 2022, 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 (max. 5 řádků):

Cílem projektu bylo studium vybraných virových i bakteriálních infekcí divokých prasat. Část projektu byla věnována monitoringu těchto infekcí, a to především bakteriálním infekcím vyvolaným druhem *C. difficile* včetně analýzy antibiotické rezistence těchto kmenů (Dílčí cíl: Prase divoké jako možný zdroj infekce člověka toxinogenními izoláty *Clostridioides difficile* a *E. coli* rezistentními k beta-laktamovým antibiotikům). Dalším dílčím cílem projektu je zdokonalení sérologická detekce viru afrického moru prasat prostřednictvím rekombinantních a peptidových virových antigenů. (Dílčí cíl: Vývoj sérologického testu a monitoring ASFV u divokých prasat).

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany):

Dílčí cíle: Selektivní izolace a charakterizace *C. difficile* a rezistentních *E. coli*

V průběhu roku 2022 byla shromážděna sbírka 376 vzorků svaloviny bránice a 57 rektálních výtěrů prasat divokých odlovených v České republice.

Ze vzorků byly kultivačními postupy (v selektivním bujónu s taurocholátem sodným v případě *C. difficile*), získány a technikou MALDI-TOF druhově zařazeny kmeny bakterií *C. difficile* a *E. coli*

Citlivost k antimikrobikům amoxicilinu, ciprofloxacinu, klindamycinu, erytromycinu, metronidazolu, moxifloxacinu, tetracyklinu a vankomycinu byla vyšetřena E-testem na *Brucella* agaru v anaerobním boxu v případě *C. difficile* a dále stanovením hodnot MIC.

V případě *E. coli* byla schopnost produkce širokospektrých beta-laktamáz ověřena Double disc synergy testem. Na základě fenotypového profilu osmi izolátů *E. coli* stanoveného diskovým difúzním testem jsme přistoupili k identifikaci příslušných kódujících genů metodou PCR. Konkrétně jsme prokazovali geny *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, *bla*_{PSE}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{MOX}, *bla*_{CMY}, *bla*_{LAT}, *bla*_{DHA} a *bla*_{ACC} kódující rezistenci k beta-laktamům, geny *catA1*, *cmlA* a *floR* pro rezistenci k amfenikolům, geny *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, *oqxA*, *oqxB*, *gyrA*, *gyrB*, *parC* a *parE* odpovědné za rezistenci k chinolonům

Dílčí cíl: Vývoj sérologického testu a monitoring ASFV u divokých prasat).

Provedli jsme in silico analýzu proteinu p54 viru ASFV se zaměřením na predikci lokalizace B-buněčných epitopů. Využili jsme k tomu algoritmus Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 kombinovaný s algoritmy pro predikci antigenních oblastí, povrchové dostupnosti a hydrofilnosti dostupných na www.iedb.org. Analýza byla provedena na ORF E183L kódující p54 protein ASFV (GenBank: EU874362.1).

Následně byl p54 protein viru nasyntetizován jako 6 oligopeptidů, které byly použity jako antigeny v ELISA testu pro ověření sérologické reaktivity in-silico vytípaných epitopů s prasečími séry. Pro vyhodnocení reaktivity peptidů byly použity pozitivní séra získaná z ASFV referenční laboratoře EU a negativní séra získaná od prasat z chovů ČR.

Dosažené výsledky projektu (max. 1/2 strany):

- **Dílčí cíl:** Selektivní izolace a charakterizace *C. difficile*

Z 376 vzorků brániční svaloviny, jsme získali 21 izolátů morfologií kolonií klostridií (5,6 %). Definitivní identifikací metodou MALDI-TOF MS byla u všech potvrzena příslušnost k druhu *C. difficile*. Ze všech 21 izolátů bylo testováním označeno jako toxinogenních třináct (13/21; 61,9 %), z toho 4 z Olomouckého kraje (4/21; 19,0 %), osm z Kraje Vysočina (8/21; 38,1 %) a jeden z kraje hlavní město Praha (1/21; 4,8 %). Většina toxinogenních izolátů (10/13) nesla geny *tcdA* a *tcdB* (OK - 2, KV - 7, P-1), pouze u tří izolátů (OK - 2, KV - 1) byly identifikovány geny *cdtA/cdtB* pro binární toxin. Žádný z izolátů nebyl vybaven současně geny kódujícími toxiny A, B a binární toxin.

Všech třináct izolátů vykazovalo citlivost k antibiotikům amoxicilinu, erytromycinu, metronidazolu, moxifloxacinu, tetracyklinu a vankomycinu. Naopak sto procent izolátů vykazovalo rezistenci k ciprofloxacinu. Tři izoláty (3/13; 23,1 %), jeden z OK, dva z KV, byly navíc rezistentní také ke klindamycinu. Distribuce hodnot minimální inhibiční koncentrace (MIC) amoxicilinu se pohybovala v rozmezí 0,06 – 1 mg.l⁻¹, přičemž MIC₅₀ a MIC₉₀ dosáhly hodnot 0,125 a 0,5 mg.l⁻¹. Distribuce hodnot MIC erytromycinu se pohybovala v rozmezí 1 – 4 mg.l⁻¹ s MIC₅₀ i MIC₉₀ 2 mg.l⁻¹, metronidazolu 0,03 – 0,25 mg.l⁻¹ a MIC₅₀ a MIC₉₀ 0,125 a 0,25 mg.l⁻¹. Distribuce hodnot MIC moxifloxacinu se pohybovala v rozmezí 0,125 – 2 mg.l⁻¹, MIC₅₀ dosáhla hodnoty 1 mg.l⁻¹ a MIC₉₀ 2 mg.l⁻¹. Minimální inhibiční koncentrace tetracyklinu byly mezi 0,03 a 0,06 mg.l⁻¹ s MIC₅₀ i MIC₉₀ 0,06 mg.l⁻¹, vankomycinu 0,125 – 0,5 mg.l⁻¹ s MIC₅₀ i MIC₉₀ 0,5 mg.l⁻¹. Významným poznatkem především je, že žádný z našich izolátů neukázal rezistenci k antibiotikům volby v léčbě humánních pseudomembranózních kolitid vyvolaných toxinogenními kmeny *C. difficile*, což jsou metronidazol a vankomycin.

- **Dílčí cíl:** Selektivní izolace a charakterizace rezistentních *E. coli*

Selektivní kultivací vzorků brániční svaloviny divočáků, jsme izolovali 8 identifikovaných metodou MALDI-TOF MS jako *E. coli* (8/376; 2,1 %).

Schopnost produkce širokospektrých beta-laktamáz byla u všech osmi izolátů *E. coli* ověřena Double disc synergy testem. U šesti izolátů byla tvorba ESBL potvrzena, dva zbývající izoláty jsme zařadili do skupiny producentů AmpC beta-laktamáz.

U všech osmi izolátů jsme prokázali multirezistenci, tedy rezistenci ke třem a více antimikrobiálním látkám. Podrobněji: Jediný izolát z OK byl rezistentní ke čtyřem antibiotikům s fenotypem rezistence Amc, Amp, Kf, Ctx. Tři ze čtyř *E. coli* z divočáků ulovených v KV vykazovali rezistenci k šesti a čtvrtá *E. coli* k osmi látkám (fenotyp rezistence Amc, Amp, Kf, Ctx, Su, T a Amc, Amp, Kf, Ctx, Su, Sxt, S, T). Dva ze tří pražských izolátů byly rezistentní k šesti antimikrobikům (Amc, Amp, Kf, Caz, Ctx, Fox), třetí dokonce k jedenácti z celkem 16 testovaných látek (Amc, Amp, Kf, Caz, Ctx, Na, Su, Sxt, S, Gn, C).

U *E. coli* izolované z brániční svaloviny divočáka uloveného v OK s fenotypem rezistence Amc, Amp, Kf, Ctx jsme prokázali geny pro rezistenci k beta-laktamům *bla*_{TEM} a *bla*_{CTX-M}. Fenotyp rezistence Amc, Amp, Kf, Ctx, Su, T tří izolátů původem z KV kódovaly geny *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *sul1*, *tet(A)*, čtvrtý izolát s rezistencí k Amc, Amp, Kf, Ctx, Su, Sxt, S, T potom geny *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *sul1*, *sul2*, *strA* a *tet(A)*. Dva izoláty *E. coli* původem od divočáků ulovených v kraji hlavní město Praha s rezistencí k Amc, Amp, Kf, Caz, Ctx, Fox nesly geny *bla*_{TEM} a *bla*_{CMY}, třetí izolát rezistentní k jedenácti testovaným látkám pak geny rezistence *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *cmlA*, *sul1*, *sul2* a *strA*. Definitivní potvrzení výsledků genotypizace proběhne analýzou dat získaných celogenomovou sekvenací všech osmi izolátů na našem pracovišti v únoru tohoto roku.

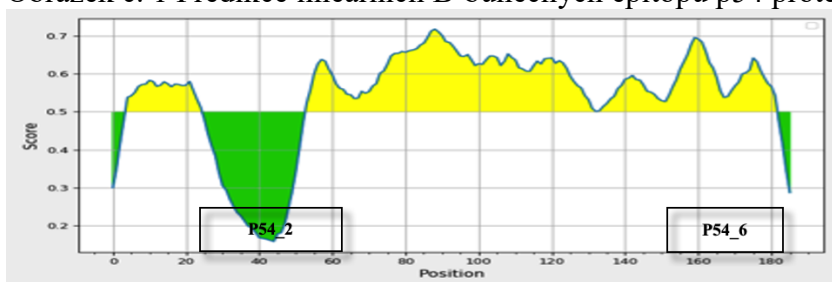
Dílčí cíl: Vývoj sérologického testu a monitoring ASFV u divokých prasat

Provedli jsme in silico analýzu proteinu p54 viru ASFV se zaměřením na predikci lokalizace B-buněčných epitopů. Využili jsme k tomu algoritmus Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 kombinovaný s algoritmy pro predikci antigenních oblastí, povrchové dostupnosti a hydrofilnosti dostupných na www.iedb.org. Analýza byla provedena na ORF E183L kódující p54 protein ASFV (GenBank: EU874362.1). In-silico analýza odhalila v N-terminální části proteinu významnou přítomnost antigenních oblastí a napříč celého proteinu přítomnost jak povrchově dostupných B-buněčných epitopů, tak hydrofilních oblastí.

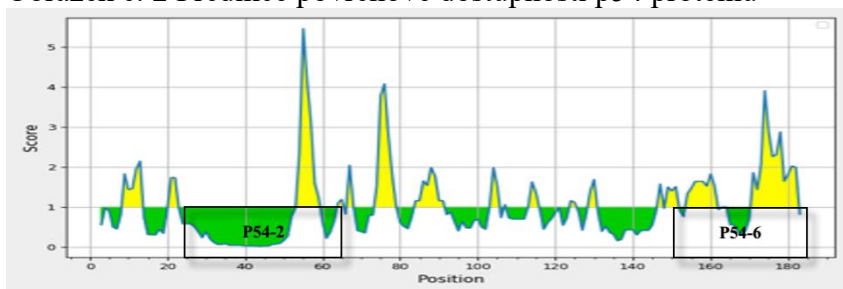
Následně byl p54 protein viru nasyntetizován jako 6 oligopeptidů, které byly použity jako antigeny v ELISA testu pro ověření sérologické reaktivity in-silico vytipovaných epitopů s prasečími séry. Pro vyhodnocení reaktivity peptidů byly použity pozitivní séra získaná z ASFV referenční laboratoře EU a negativní séra získaná od prasat z chovů ČR. **Největší reaktivitu a částečnou shodu s in-silico získanými výsledky vykazovaly peptidy v pořadí číslo 2 a 6.**

Následující obrázky ukazují výsledky in-silico analýzy kombinované s výsledky skutečné sérologické reaktivity ASFV pozitivních sér (lokalizace peptidů 2 a 6 v proteinu p54 vyznačena obdélníky)

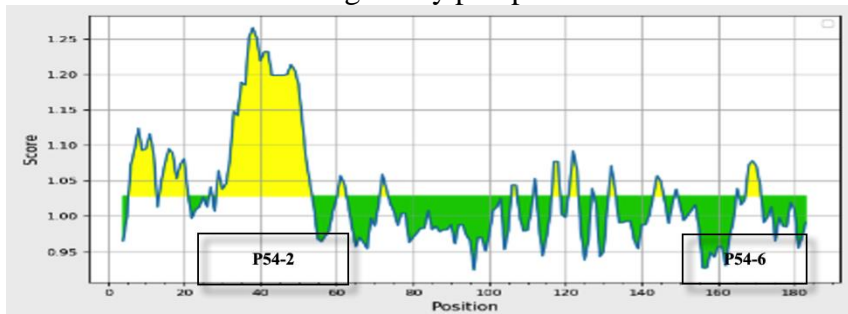
Obrázek č. 1 Predikce lineárních B-buněčných epitopů p54 proteinu



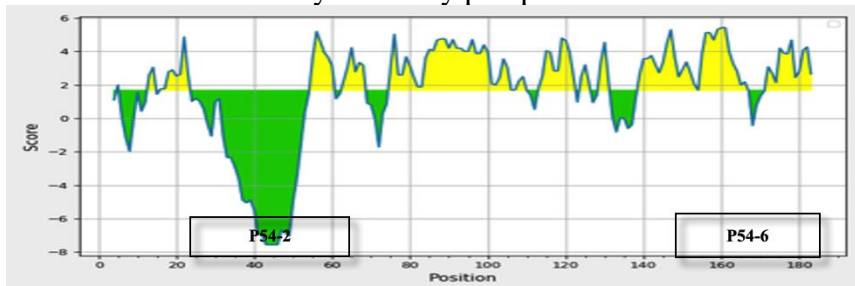
Obrázek č. 2 Predikce povrchové dostupnosti p54 proteinu



Obrázek č. 3 Predikce antigenicity p54 proteinu



Obrázek č. 4 Predikce hydrofilicity p54 proteinu



Přínos projektu (max. 5 řádků):

V posledních několika letech se intenzivně diskutuje otázka neobvykle vysokého nárůstu komunitních klostridiových kolitid člověka. Bakterie druhu *C. difficile* kolonizují střevo člověka a zvířat, kde se mohou toxinogenní typy patogenně uplatnit. Nálezy identických ribotypů u člověka a zvířat se staly podkladem pro hypotézu o jejich zoonotickém potenciálu. U hospodářských zvířat a potravin živočišného původu již byla provedena řada studií, u volně žijících zvířat však podrobnější epidemiologická data chybí. Analýzou dat z celogenomového sekvenování našich izolátů a jejich komparací s již dříve publikovanými výsledky sekvenací celých genomů izolátů *C. difficile* humánních klinických izolátů přispějeme k objasnění možného zoonotického potenciálu izolátů z volně žijících zvířat. V neposlední řadě mohou naše výsledky posloužit jako podklad pro zavedení preventivních opatření zabráňujících přenosu klostridií z kančího masa na člověka.

Podařilo se nám charakterizovat významný strukturální protein p54 ASFV viru s ohledem na přítomnost potenciálních B-buněčných epitopů, jejich přesná lokalizace pak byla dále potvrzena jejich sérologickým testováním prostřednictvím pepscan analýzy. Výsledky mohou být využity ke konstrukci přesnějších a lépe definovaných sérologických testů k sérologickému testování ASFV.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

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

- Kolarova, D.B., Ulehlova Z., Hrubá J. L., Klicova, K., Celer V. In-silico and pepscan analysis of African swine fever virus p54 protein, *Acta veterinaria Brno*, Nr. 1/2023.

Plánovaná publikace:

- Prevalence and characterization of *Clostridioides difficile* and extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* from wild boars., *Anaerobe*, IF = 3.331, do konce roku 2023

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

| Položka | Finanční prostředky | |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------|
| | Přidělené (v Kč) | Čerpané (v Kč) |
| Osobní náklady celkem (včetně odvodů) | 791 900,00 | 791 900,00 |
| Služby | 100 000,00 | 105 700,37 |
| Cestovné | 70 000,00 | 20 498,00 |
| Další provozní náklady | 385 179,00 | 428 980,63 |
| Doplňkové náklady | 202 061,00 | 202 061,00 |
| Celkem | 1 549 140,00 | 1 549 140,00 |

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

(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. Dále byly čerpány na stipendia studentů doktorského studia, kteří pracovali na různých částech řešení projektu. Osobní náklady byly čerpány přesně dle návrhu projektu.

Služby:

Služby byly čerpány v úhrnné hodnotě 105 700,37 Kč (sekvenování, opravy a udržování, licence)

Cestovné:

Částka určená na cestovné 70 000,00 Kč byla čerpána ve výši 20 498,00. V souladu se směrnicí byla převedena část ve výši 5 700,37 do služeb a dále část do položky další provozní náklady ve výši 43 801,63 Kč.

Další provozní náklady:

Další provozní náklady byly čerpány na pořízení laboratorních potřeb (platové mikropipety, sérologické pipety, petriho misky, zkumavky typu eppendorf a falcon), kultivačních médií pro pěstování bakterií, enzymy pro uskutečňování PCR a qPCR reakcí, izolační kity na virovou i bakteriální DNA, pipety,

Doplňkové náklady:

Doplňkové náklady ve výši 202 061,00 Kč byly čerpány přesně podle návrhu projektu.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

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

9. 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 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 2021 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 2022
(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu: 2022ITA13

2. Název projektu: Genetická vnímavost k sarkoidu u koní

3. Řešitel projektu:

Prof. MVDr. RNDr. Petr Hořín, CSc.

Ústav genetiky FVL VETUNI

E-mail: horinp@vfu.cz

Telefon: 605870237

4. Řešitelský kolektiv:

Řešitelský tým projektu je ve smyslu Směrnice rektora č. ZS 1/2022 složen z akademických pracovníků FVL VETUNI (Ústavu genetiky FVL a Kliniky chorob koní) a výzkumné skupiny Animal Immunogenomics Ceitec VETUNI Brno. Proto je vymezení řešitelského týmu uvedeno zvlášť pro každou z obou součástí VETUNI Brno. Uvedené úvazky platí pro příslušnou součást VETUNI.

Ústav genetiky FVL

Prof. MVDr. et RNDr. P. Hořín, CSc., řešitel: 0,7 FTE (+0,3 FTE v součásti Ceitec VETUNI = 1,0 FTE na VETUNI jako celku)

MVDr. Karla Stejskalová, Ph.D.: 1,0 FTE

Ing. Leona Vychodilová, Ph.D.: 0,65 FTE

Klinika chorob koní FVL

MVDr. Petr Jahn, CSc.: 1,0 FTE

Celkový FTE pro FVL: 3,35

MVDr. April Jelinek, PhD studentka (prezenční forma) Ústavu genetiky FVL (2. ročník)

MVDr. Andrea Kopecká: PhD studentka (prezenční forma) Kliniky chorob koní FVL (2. ročník)

Ceitec VETUNI RG Animal Immunogenomics

Mgr. Martin Plášil, Ph.D.: 1,0 FTE

Mgr. Ján Futas, Ph.D.: 0,8 FTE

Mgr. Eva Jánová, Ph.D.: 0,6 FTE

Celkový FTE pro Ceitec VETUNI: 2,40

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

Ústav genetiky FVL: Jednotliví akademičtí pracovníci se dlouhodobě zaměřují na analýzu genů souvisejících se zdravotním stavem zvířat. Karla Stejskalová a Leona Vychodilová provedly bioinformatické analýzy aktuálně dostupných genomových sekvencí kandidátních genů koní a jejich interpretaci, identifikaci primerů amplifikujících kódující oblasti každého genu, nastavení PCR protokolů a vlastních amplifikace pro účely NGS. Dr. Vychodilová zároveň koordinovala tuto část řešení projektu a provedla jednu část populační analýzy pomocí specializovaných softwarových nástrojů. Petr Hořín koordinoval řešení projektu a podílel se na interpretaci získaných výsledků. Bude korespondujícím autorem následné publikace.

Klinika chorob koní: Dr. Jahn se podílel na vyhledávání a klinickém vyšetření koní, odběrech vzorků pro genetickou analýzu a na klinické interpretaci získaných dat o genetické vnímavosti k sarkoidu.

Ceitec VETUNI RG Animal Immunogenomics: Skupina zajistila specializované genomické a bioinformatické analýzy. Dr. Plášil je certifikovaným pracovníkem oprávněným obsluhovat NGS sekvenátory a jako takový byl zodpovědný za sekvenování získaných PCR produktů, za následnou bioinformatickou analýzu takto získaného speciálního typu dat a navazující komparativní genomické analýzy jednotlivých oblastí MHC. Dále provedl genotypizaci vybraných MHC genů. Dr. Futas jako specialista na detailní anotaci genomových oblastí provedl revizi anotace získaných sekvencí genů pro NK receptory a genotypizaci vybraných genů NKR. Dr. Jánová analyzovala genetickou diverzitu populací a podílela se na výpočtu asociací vybraných polymorfismů se sarkoidem.

Studentky DSP. Dr. Kopecká provedla výběr klinicky postižených a kontrolních koní z modelových populací, zajistila odběry vzorků periferní krve koní podle předem stanovených kritérií a podílela se na klinické interpretaci získaných výsledků. Dr. Jelinek provedla genotypizaci vybraných genů pro NK receptory.

Z uvedeného je patrna komplementarita expertízy členů kolektivu, který také byl s tímto cílem dlouhodobě budován.

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Téma projektu se v širším kontextu týká jednoho z aktuálních vědeckých témat vztahujících se k problematice genetické vnímavosti k onemocnění domácích zvířat. V tomto kontextu i v kontextu použitých metodik tak navrhovaný projekt reflektuje priority Vyhlášení soutěže na projekty Institucionálního výzkumu podporované prostřednictvím ITA VETUNI Brno pro rok 2022.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Identifikovat polymorfní genetické markery oblastí hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) a genového komplexu NKC, testovat jejich asociaci s výskytem sarkoidu u tří modelových populací koní v ČR, na základě těchto výsledků upřesnit lokalizaci nejsilněji asociovaných kandidátních polymorfismů a formulovat předpoklad o mechanismu vnímavosti k sarkoidu.

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany):

Materiál. Byl analyzován výskyt klinického sarkoidu u koní. Tři různé populace byly studovány proto, že v markerech asociovaných se sarkoidem mohou existovat meziplemné rozdíly. Byl sestaven soubor koní plemen Arabský kůň, Český teplokrevník a Anglický plnokrevník. Každému koni s klinicky diagnostikovaným sarkoidem (15 koní) byli jako kontrola přiřazeni dva koně stejného plemene, pohlaví, srovnatelného věku (plus/mínus 1 rok) a pocházející ze stejného prostředí (ustájení, výživa, ošetřování, welfare a stejná pravděpodobnost expozice viru BPV)(30 koní). Pro každou skupinu bylo vyšetřeno 45 koní. Ve všech populacích byla analýzou stěrů ze sarkoidů prokázána přítomnost BPV.

Diagnostika sarkoidu. Sarkoid byl diagnostikován a klasifikován podle standardních kritérií (typ, velikost, lokalizace). Koně byli rozdělení na jedince s diagnostikovaným sarkoidem a negativní kontroly. S ohledem na etické i logistické limitace projektu nemohla být vyšetřována přítomnost BPV1/2 v bioptátech patologicky změněné tkáně.

Genomická analýza. Jako kandidátní byly primárně vybrány genomické oblasti MHC a oblast Natural Killer Cell Complex (NKC). U všech koní byl analyzován polymorfismus v daných kandidátních oblastech pro účely asocičních analýz. U oblastí MHC a NKC byl jejich polymorfismus

definován variabilitou v mikrosatelitních lokusech, které jsme spolu s metodikou jejich genotypizace popsali dříve (Horecký et al. 2018) a v kandidátních protein kódujících genech MHC (*Eqca DQA*, *DRA*, *MICB*, *GNL*, *TNF*), u jednoho z expandovaných genů *Ly49/KLR* byla metodika jejich identifikace a genotypizace shodná s publikovanou (Klumplerová et al. 2020; Stejskalová et al. 2019). U každého koně byl určen jeho genotyp ve všech testovaných polymorfismech. Na základě negativních výsledků asociační analýzy pro geny NKR nebyly další unikátní geny související s touto větví imunity analyzovány.

Asociační analýzy. Asociace mezi genetickými polymorfismy a výskytem sarkoidů byly testovány standardními metodami (chí-kvadrát test, Fisherův test) tak, jak jsme opakovaně popsali (např. Stejskalová et al. 2019, Bubeníková et al. 2020).

Dosažené výsledky projektu (max. 1/2 strany):

1. Byly získány informace o nukleotidové sekvenci a polymorfismu protein kódujících genů imunitní odpovědi u tří různých plemen;
2. Byly nalezeny statisticky signifikantní asociace mezi polymorfismy MHC mikrosatelitů s výskytem klinického sarkoidu. Nebyly nalezeny asociace s polymorfismy mikrosatelitů lokalizovaných v genomických oblastech kódujících receptory na NK buňkách a jednoho exprimovaného genu (Tabulka 1). Třetí populace (Anglický plnokrevník) je aktuálně genotypována a výsledky budou přidány k výsledkům předchozích skupin.
3. Dosavadní výsledky naznačují, že primárně je vnímavost k sarkoidu určena MHC oblastí třídy II. Vliv genů kódujících NK receptory se nepodařilo prokázat.
4. Získaná data naznačují, že imunologický mechanismus určující vnímavost ke klinickému sarkoidu je založen na rozpoznání a imunitní reakci na přítomnost rozvíjejícího se sarkoidu spíše než na přímém rozpoznání BPV-infikovaných buněk a jejich likvidaci CD8 pozitivními T lymfocyty. V případě rozpoznání BPV antigenů by se dal očekávat spíše primární efekt antigen prezentujících molekul třídy I. Tato interpretace je v souladu negativními výsledky asociačních analýz pro geny NKR. Výsledky se vztahují ke klinickému sarkoidu a nevylučují asociace genů MHC třídy I se sarkoidem u virologicky definovaných koní.
5. S ohledem na přetrvávající situaci s dodacími lhůtami u klíčových chemikálií pro molekulární analýzy často i v řádu měsíců budou některé další molekulární a zejména bioinformatické analýzy ještě dokončovány tak, aby byl možno je zahrnout do plánovaných publikací.

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Projekt přinesl prioritní data, která v případě MHC umožnila přesnější lokalizaci asociovaných polymorfismů a tím i zpřesnění dosud publikovaných informací. I když negativní, jsou výsledky asociační analýzy genů NKR prioritní a důležité pro celkovou interpretaci výsledků projektu. Z hlediska řešitelského týmu umožnil projekt získání kvalitních dat, která po jejich publikaci umožní získat lepší pozici v grantových soutěžích.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Výsledky budou využity v dalším výzkumu sarkoidu u již získaných vzorků (identifikace a analýza dalších exprimovaných genů MHC třídy I a II) a také v širším kontextu studia mechanismů genetické vnímavosti k významným nemocem koní.

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

Genetic susceptibility to equine sarcoid: associations with MHC and NKR genes. Animal Genetics.

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

FVL

| Položka | Finanční prostředky | |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------|
| | Přidělené (v Kč) | Čerpané (v Kč) |
| Osobní náklady celkem (včetně odvodů) | 628 000,00 | 628 000,00 |
| Služby | 20 000,00 | 0,00 |
| Cestovné | 20 000,00 | 0,00 |
| Další provozní náklady | 250 000,00 | 290 000,00 |
| Doplňkové náklady | 137 700,00 | 137 700,00 |
| Celkem | 1 055 700,00 | 1 055 700,00 |

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 na základě odvedených výsledků. Studentkám DSP bylo v souladu s plánem řešení vyplaceno stipendium.

Služby: Nečerpano (viz zdůvodnění níže)

Cestovné: Nečerpano (viz zdůvodnění níže)

Další provozní náklady:

Kity pro NGS: 208 tis. Kč, plasty (mikrozkumavky, destičky a pipetové špičky): 32 tis. Kč, laboratorní chemie: 50 tis. Kč. Celkem (zaokrouhлено na tis. Kč): 290 tis. Kč.

Doplňkové náklady: Byly čerpány v souladu s plánem projektu.

Ceitec

| Položka | Finanční prostředky | |
|---------------------------------------|---------------------|-------------------|
| | Přidělené (v Kč) | Čerpané (v Kč) |
| Osobní náklady celkem (včetně odvodů) | 232 812,00 | 232 812,00 |
| Služby | 3 000,00 | 0,00 |
| Cestovné | 0,00 | 0,00 |
| Další provozní náklady | 104 623,00 | 107 623,00 |
| Doplňkové náklady | 51 065,00 | 51 065,00 |
| Celkem | 391 500,00 | 391 500,00 |

Zdůvodnění nákladů:

Osobní náklady: Byly použity v souladu s plánem řešení ve formě odměn pro pracovníky na projektu.

Služby: Nečerpáno (viz zdůvodnění níže)

Cestovné: Nečerpáno (viz zdůvodnění níže)

Další provozní náklady:

Kity, chemie: 105 tis. Kč. DHM: 2.5 tis. Kč. Celkem: 107.5 tis.

Doplňkové náklady:

Byly čerpány v souladu s plánem projektu.

Zdůvodnění změn (společné pro obě součásti).

Protože některé konference a workshopy plánované na období řešení projektu se neuskutečnily nebo byly přesunuty do virtuálního prostoru nebylo možné čerpat cestovní náklady.

Služby (zakázkové sekvenování) nebylo možné vyčerpat v období řešení projektu kvůli výpadkům dodávek materiálu, který se používá k přípravě vzorků pro sekvenování. Veškerá získaná data jsou založena na NGS sekvencích, získaných v našich laboratořích.

V obou případech byly nevyčerpané částky přesunuty v souladu s příslušnou směrnicí do materiálových nákladů, což nám umožnilo vytvořit si předpoklady pro dokončení některých prací tak, aby bylo možné naplnit plán řešení a kompletovat data do výsledných publikací.

8.3. Náklady za projekt celkem

| Položka | Finanční prostředky | |
|---------------------------------------|---------------------|------------------|
| | Přidělené (v Kč) | Čerpané (v Kč) |
| Osobní náklady celkem (včetně odvodů) | 860 812 | 860 812 |
| Služby | 23 000 | 0 |
| Cestovné | 20 000 | 0 |
| Další provozní náklady | 354 623 | 397 623 |
| Doplňkové náklady | 188 765 | 188 765 |
| Celkem | 1 447 200 | 1 447 200 |

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

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

9. 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:

9.1.2023 Petr Hořín

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 2021 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:**

9.1.2023 Petr Hořín

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 vedoucího celoškolského pracoviště:

9.1.2023 Petr Hořín

9.1.2023 Prof. MVDr. Jiří Smola, 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

vedoucího celoškolského pracoviště

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2022
(vyplní řešitel)

1) **1. Identifikační číslo projektu: FVL/ ILLEK / ITA 2022**

2) **2. Název projektu: Problematika chorob přežvýkavců a prasat.**

- A) Poruchy energetického metabolismu krav v tranzitním období zaměřené na studium etiopatogeneze NEB, steatózy jater, ketózy a souvisejících onemocnění.
- B) Vyhodnocení úroveň zabřezávání krav ve vztahu k denní produkci, k ročnímu období a ke způsobu synchronizace
- C) Monitorování výskytu colibacilózních průjmů selat po odstavu po zákazu medikace krmiv ZnO

3. **Řešitel projektu:**

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

Fakulta/celoškolské pracoviště: FVL

E-mail: illekj@vfu.cz

Telefon: +420 541 562 438
+ 420 731 512 909

4. **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

A (KLVZ)

Doc. MVDr. Josef Illek, DrSc. akademický pracovník úvazek 1,0 KLVZ

MVDr. Romana Kadek, DSP, KLVZ, akademický pracovník, úvazek 0,5 KLVZ

MVDr. Zdeňka Bezděková, DSP, KLVZ, akademický pracovník, úvazek 0,5 KCHPP

MVDr. Ivana Šimková DSP KLVZ, akademický pracovník úvazek 0,5)KCHPP)

MVDr. Eva Indrová, Ph.D. (KCHPP)

B (KCHPP)

Doc. MVDr. Svatopluk Čech, Ph.D. akademický pracovník , úvazek 1,0

MVDr. Tomáš Páleník Ph.D akademický pracovník, úvazek 0,5

MVDr, Vojtěch Kos DSP KCHPP akademický pracovník úvazek 0,5

C (KCHPP)

Prof. MVDr. Jiří Smola , CSc, akademický pracovník KCHPP, úvazek 1,0

MVDr. Zdeněk Fajt, Ph.D. akademický pracovník, úvazek 1,0

MVDr. Bc. Jonáš Vaňhara PhD., akademický pracovník, úvazek 1,0

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

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Projekt je začleněn do rámce výzkumu VETUNI

Členové řešitelského týmu se dlouhodobě zabývají řešením zdravotní problematiky u skotu a prasat a mají velmi dobrou publikační aktivitu v uvedené oblasti.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

A) Cílem projektu je studium poruch energetického metabolismu u krav v průběhu tranzitního období zaměřeného na negativní energetickou bilanci (NEB), rozvoj steatózy jater, ketózy, a produkce mléka. Budou získány údaje o prevalenci uvedených poruch a stanoveny parametry vybraných analytů pro včasnou diagnostiku uvedených poruch metabolismu.

B) Cílem projektu je zhodnotit úroveň reprodukce na mléčné farmě. Bude vyhodnocena úroveň zabřezávání krav ve vztahu k denní produkci, k ročnímu období a ke způsobu synchronizace.

C) Cílem projektu je monitorování výskytu colibacilózních průjmů selat po odstavu po zákazu medikace krmiv ZnO v našich chovech. Na základě získaných výsledků vyhodnotit optimální postupy prevence těchto průjmů a na druhé straně označit hlavní negativní faktory související s výskytem kolibacilózních průjmů.

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany):

Metodika A

V chovu krav plemene H s užitkovostí 11 400 kg mléka za normovanou laktaci byl sledován zdravotní stav, úroveň výživa a metabolický profil se zaměřením na změny metabolitů v krvi v průběhu tranzitního období až do 60 dne laktace. Do sledování bylo zařazeno 20 dojnic a to na základě kondice krav v období 10 až 20 dnů před očekávaným porodem. Skupinu A tvořily krávy s optimální kondicí (BCS 3,5), skupinu B tvořily krávy se zvýšenou kondicí (BCS 4-4,5). U krav byla odebírána krev v období 10 až 20 dnů a.p., 1 až 3 dny a.p., v den porodu, v 10. až 15. dnu p.p. a v 25 až 30. dnu p.p. a 60. dnu p.p. V odebraných vzorcích krve byly v KLVZ stanoveny následující analyty. Krev Hematokrit, koncentrace hemoglobinu, koncentrace glukózy, Se a GPX. V krevním séru byla stanovena koncentrace celkové bílkoviny, albuminu, močoviny, BHB, NEMK, TAS, AST, GMT, CK, ALP, SOD, cholesterolu triglyceridů, Na, K, Ca, Mg, P, Zn, Cu., vit. A, E, beta karotenu. Ve stanovených intervalech bude sledována denní nádoj a skladba mléka. Získané výsledky budou statisticky vyhodnoceny s ohledem na kondici krav a průběh tranzitního období.

Metodika B

V rámci kontinuálního hodnocení reprodukce na mléčné farmě byla vyhodnocena úroveň zabřezávání krav ve vztahu k denní produkci, k ročnímu období a ke způsobu synchronizace. Krávy byly inseminovány běžným způsobem v přirozených říjích nebo po indukci a synchronizaci říje, sonografická diagnostika gravidity byla prováděna 1 x týdně v období 26. – 32. dnů po inseminaci. Krávy byly rozděleny do 4 skupin podle denní dojitosti: 1 (do 30 l), 2 (31 – 25 l), 3 (36 – 40 l), 4 (nad 40 l). Do letní sezóny byly zařazeny měsíce červen – srpen, do ostatní sezóny měsíce září – květen. Základní schéma synchronizace vycházelo z protokolu Ovsynch 56 (den 0, GnRH-1 50 µg i.m.; den 7, PGF_{2α} 500 µg i.m.; za 56 hod. v den 9, GnRH-2 50 µg i.m.; za 16 hod. v den 10, umělá inseminace). Bylo použito 5 variant zahájení protokolu synchronizace:

- 1 - Po známém termínu říje, kdy kráva nebyla inseminována, aktuálně přítomnost žlutého tělíska.
- 2 - Při nálezů mladšího žlutého tělíska (odhad stáří 5 – 7 dnů), 3 - Týden po nálezů vaječnicků bez výrazné aktivity, aktuálně přítomnost žlutého tělíska, 4 - Týden po ošetření ovariálních dysfunkcí (acyklie, cysty), aktuálně přítomnost žlutého tělíska, 5 - Po negativní diagnostice gravidity (26. – 32. den po inseminaci), aktuálně přítomnost žlutého tělíska.

Vyšetřování krav bylo prováděno v týdenních intervalech, což umožnilo začínat všechny varianty metody Ovsynch 56 mezi 5. – 11. dnem cyklu.

Metodika C

Ve spolupráci s chovateli a veterinárními lékaři byl sledován výskyt průjmových onemocnění selat v období do 14 dnů od jejich odstavu. Bylo sledováno celkem 30 různých farem s rozdílnou úrovní zdraví zvířat. Pouze 5 farem z nich nepoužívalo medikace krmiv ZnO a ostatní farmy s medikací krmiva ZnO pokračovaly i do konce roku 2022 (25 farmy).

Vzhledem k trvale přísným opatřením v biosekuritě farem nebyla možnost přímého vstupu a šetření na místě pracovníkem kliniky. V rámci šetření se zohledňovali základní produkční a klinické údaje o zvířeti (věk, průměrná hmotnost selat v den odstavu), den nástupu průjmu a jeho charakter, případná vakcinace proti *E. coli*. V případě výskytů průjmu byl sterilně odebrán vzorek z rekta do transportního média a doručen na kultivační vyšetření. Izolované kmeny byly vyšetřeny na faktory kolonizace F4, F18 a u vybraných vzorků stanoven antibiogram s cíleně stanovenou citlivostí na kolistin.

Dosažené výsledky projektu (max. 1/2 strany):

Výsledky A

U sledovaných vysokobřezích krav byl zdravotní stav dobrý. Krávy nejevily klinické příznaky onemocnění. Metabolický profil krav v 10. až 20 dnu před porodem odpovídal klinickému stavu krav a hodnoty sledovaných metabolitů se pohybovaly v referenčním rozmezí. Byly však zjištěny jisté rozdíly mezi skupinou A a B. Krávy skupiny B s BCS 4 až 4,5 měly významně vyšší hodnoty koncentraci TGL a významně nižší hodnoty Se a GPx.

Krávy v období 3-5 dnů před porodem rovněž nejevily klinické příznaky onemocnění a hodnoty sledovaných metabolitů se pohybovaly v referenčním rozmezí bez významných meziskupinových rozdílů.

Krávy v den porodu rovněž nejevily významné klinické příznaky onemocnění, porody u všech krav byly spontánní, u žádné krav s nevyskytl syndrom ulehnutí. Metabolický profil prokazoval jisté změny. U krav skupiny B byla zjištěna hypokalcémie (1,97 mmol/l) a byla zvýšená koncentrace NEMK (1,02 mmol/l a zvýšená koncentrace BHB (1,05 mmol/l.) U krav skupiny A činila koncentrace Ca v krevním séru 2,17 mmol/l, koncentrace NEMK 0,89 mmol/l a koncentrace BHB 0,71 mmol/l. Meziskupinové rozdíly rozdílů nebyly statisticky významné.

U krav 10-15 dnů po porodu byl zaznamenán mírné zhoršení kondice především u skupiny B a u 1 dojnice skupiny B byla diagnostikována subklinická mastitida. V metabolickém profilu byly zjištěny jisté změny. U krav skupiny B byla statisticky významně nižší koncentrace P (1,67 mmol/l). a

nevýznamně nižší koncentrace glukózy (2,32 mmol/l), dále nevýznamně vyšší koncentrace NEMK (0,98 mmol/l), BHB (1,65 mmol/l) a Ca (2,28 mmol/l). U krav skupiny A činila koncentrace NEMK (0,51 mmol/l), BHB (0,85 mmol/l) a Ca (2,38 mmol/l). U krav skupiny B byla zjištěna snížená koncentrace vit Av krevním séru a snížená hodnota GPx. Výsledky ukazují, že došlo k úpravě koncentrace vápníku do rozmezí referenčních hodnot u obou skupin a u krav skupiny B výsledky poukazují na výskyt subklinické ketózy.

U krav v období 30 dnů po porodu byla zaznamenána mírně zhoršená kondice krav obou skupin, přetrvávala zvýšená koncentrace BHB a snížená koncentrace fosforu a glukózy, což poukazuje na pokračující subklinickou ketózu. Hodnoty ostatních sledovaných analytů se pohybovaly v referenčním rozmezí. U 2 krav skupiny A i skupiny B se projevil příznak opatrné chůze až kulhání,

U krav v období 60 dnů laktace hodnoty glukózy, NEMK, BHB a Ca byly u obou skupin v referenčním rozmezí. U 1 krávy skupiny B byla diagnostikována levostranná dislokace slezu. Kulhání u 2 krav skupiny A a 2 krav skupiny B přetrvávalo. Kondice krav obou skupin se dále nesnižovala.

Složky mléka zaznamenaly v průběhu sledování jisté změny. Nevětší byly zjištěny v koncentraci tuku. V počátečním období laktace byla u krav skupiny B významně vyšší koncentrace tuku v mléce i vyšší počet somatických buněk.

Výsledky B

Celkem bylo hodnoceno 914 inseminací, kdy celková úroveň koncepce dosáhla hodnoty 41,9 %. Z výsledků sledování lze uzavřít, že úroveň koncepce závisí na denní užitkovosti v období před inseminací. Nejvyšší koncepce byla dosažena u krav s užitkovostí do 30 l/den (50,23%), nejnižší u krav s užitkovostí nad 40 l/den (36,11%). Úroveň koncepce je dále ovlivněna obdobím, kdy je provedena inseminace. V letním období (červen až srpen) je koncepce signifikantně nižší než v ostatních měsících roku (34,21% vs 43,78%). Úroveň koncepce po synchronizaci říje systémem Ovsynch nebyla rozdílná mezi 5 skupinami s rozdílným zahájením protokolu aplikace. Exaktní rektální diagnostika doplněná sonografií poskytuje přesný obraz ovariální aktivity vyšetřovaných krav a start synchronizace metodou Ovsynch může být proveden za přesně definovaných podmínek. Je zřejmé, že start synchronizace týden po ošetření patologických stavů, když je pozitivní odpověď zjištěna sonograficky, poskytuje obdobnou úroveň koncepce, jako start po fyziologických stavech.

Výsledky C

V námi sledovaných farmách, kde se nepoužívala medikace ZnO jsme u žádných vzorků nezjistili rezistenci na kolistin, ze sledovaných faktorů kolonizace *E. coli* (F4, F18) jsme oba faktory zaraz pouze na dvou farmách, faktor F4 samostatně byl zaznamenán pouze na jedné farmě a u zbylých dvou farem nebyl detekován ani jeden z těchto dvou faktorů kolonizace. Klinicky byla diarea detekována pouze u dvou farem z těchto pěti. Zbylých 25 farem, kde se nadále používala medikace ZnO, vykazovala klinické příznaky diarei i přes tuto medikaci celkem šest farem, faktory kolonizace byly zaznamenány u dvaceti farem a rezistence na kolistin nebyla zaznamenána ani u jednoho jediného vzorku.

| Farma bez medikace ZnO | Faktory kolonizace <i>E. coli</i> (F4, F18) | Rezistence na kolistin | Klinicky průjmové onemocnění |
|------------------------|---|------------------------|------------------------------|
| 1 | F4, F18 | - | + |
| 2 | F4, F18 | - | + |
| 3 | - | - | - |
| 4 | - | - | - |
| 5 | F4 | - | - |

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Získané poznatky budou využity v chovatelské praxi především ke zlepšení zdravotního stavu a reprodukce krav a povedou k zlepšení ekonomiky chovů. Velký význam dosažených výsledků spočívá v získání informací o vývoji metabolického profilu v průběhu tranzitního období a ve využití vhodných metabolitů pro preklinickou diagnostiku poruch metabolismu a produkčních chorob. Na úseku reprodukce výsledky řešeného projektu přináší informace o faktorech ovlivňujících úroveň koncepce dojených krav budou podkladem k sestavení standardních operačních postupů pro management reprodukce na farmách dojeného skotu. Získané poznatky na úseku chovu prasat i když v omezeném rozsahu v důsledku dalšího používání oxidu zinku v krmivu v některých chovech, představují rozšíření spolupráce s terénními veterinárními lékaři a rozšíření povědomí o nedořešené otázce zákazu použití forem zinku jako prevence průjmů u selat a její dopad na zdravotní stav zvířat. Jedná se především o poznání rozšiřující se incidenci podstavových průjmů *E. coli* v jednotlivých turnusech stáda a vliv na ekonomické ztráty chovatele. Dále řešený projekt představuje rozšíření povědomí o rezistenci na kolistin, jakožto významného antimikrobika používaného v boji s průjmy způsobené *E. coli* bakteriemi. Projekt přináší nové informace o různých faremních postupech, které vedou k prevenci kolibacilozních průjmů.

Projekt umožní získat data, která vzhledem ke své aktuálnosti mohou sloužit řešitelům v dalším snažení o získání výzkumných projektů.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Výsledky budou prezentovány na konferencích se zahraniční účastí a budou publikovány v odborných a vědeckých časopisech s IF. Budou využívány v pedagogickém procesu a celoživotním vzdělávání veterinárních lékařů.

Budou sloužit jako podklad pro rozšíření spolupráce a osvětu s terénními veterinárními lékaři, kteří mají přístup k získání vzorků pro laboratorní vyšetření a chtějí se tak podílet na hledání alternativ k náhradě zakázaných forem zinku.

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

Metabolický profil krav v průběhu tranzitního období (Acta Vet. Brno)

Diagnostika subklinické ketózy a jaterní steatózy u dojnic (Acta Vet. Brno)

Factors influencing conception rate in dairy cows (Acta Vet. Brno)

Incidence podstavových průjmů selat vyvolaných patogenními kmeny *E.coli* v období po zákazu používání ZnO v České republice

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

| Položka | Finanční Prostředky | |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------|
| | Přidělené (v Kč) | Čerpané (v Kč) |
| Osobní náklady celkem (včetně odvodů) | 642 240,00 | 642 240,00 |
| Služby | 0,0 | 0,0 |
| Cestovné | 10 000,00 | 10 000,00 |
| Další provozní náklady | 436 456,00 | 436 456,00 |
| Doplňkové náklady | 163 304,00 | 163 304,00 |
| Celkem | 1 252 000,00 | 1 252 000,00 |

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

(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 proti schválenému rozpočtu projektu)

Osobní náklady: osobní náklady ve výši 642 240,00 byly použity na mzdy řešitelů projektu a stanovené odvody. Byly čerpány dle plánu a nebyly překročeny.

Služby: výdaje na služby nebyly plánovány a nebyly ani čerpány.

Cestovné: cestovné ve výši 10 000 Kč bylo použito na krytí cestovních výloh na cesty na farmu, kde se realizoval projekt.

Další provozní náklady: tyto náklady ve výši 436 456,00 Kč byly použity na nákup chemických setů a chemikálií pro stanovená analytů v biologickém materiálu zvířat zařazených do pokusu a na nákup krmiv pro prasata. Čerpání těchto prostředků probíhalo podle plánu.

Doplňkové náklady: tyto náklady byly stanoveny platnými předpisy a byly dodrženy.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

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

9. 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 9.1.2023

řešitele projektu: Doc. MVDr. Josef Illek, DrSc.,Dipl. ECBHM

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 9.1.2023

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

Doc.MVDr. Josef Illek, DrSc., Dipl. ECBHM

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 9.1.2023

přednosty ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Doc. MVDr. Josef Illek, DrSc., Dipl.ECBHM

Prof. MVDr. Jiří Smola 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:

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2022
(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu: 2022ITA15

2. Název projektu: Autofagie a chondrogeneze: výzkum zaměřený na kaspázy a osteoartritidu

3. Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: prof. RNDr. Eva Matalová, Ph.D.

Fakulta/celoškolské pracoviště: Ústav fyziologie FVL VETUNI

E-mail: matalovae@vfu.cz

Telefon: 541562304

4. 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. RNDr. Eva Matalová, Ph.D. (Ústav fyziologie, řešitel, profesor) - experimentální design, rozdělení kompetencí, syntéza výsledků a příprava finálního výstupu řešení projektu

Prof. MVDr. Jaroslav Doubek, CSc. (Ústav fyziologie, přednosta, profesor) – propojení roviny fyziologické, patofyziologické a klinické, koordinace činnosti na Ústavu fyziologie

MVDr. Jana Doležalová, Ph.D. (Ústav fyziologie, asistent) – garant segmentu patofyziologie na Ústavu fyziologie, samostatné funkční analýzy

Prof. MVDr. František Tichý, CSc. (Ústav anatomie, histologie a embryologie, přednosta, profesor) - konzultant, koordinátor činnosti na Ústavu anatomie, histologie a embryologie

MVDr. Martin Pyzsko, PhD. (Ústav anatomie, histologie a embryologie, asistent) – samostatné morfologické analýzy

MVDr. Jan Chloupek, Ph.D. (Ústav farmakologie a farmacie, přednosta) - konzultant, koordinátor činnosti na Ústavu farmakologie a farmacie

MVDr. Pavel Svoboda (Ústav farmakologie a farmacie, doktorand) – provádění experimentů pod vedením školitele/koordinátora

Mgr. Klára Klíčová (Ústav farmakologie a farmacie, doktorand) – provádění experimentů pod vedením školitele/koordinátora

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

Projekt byl založen na spolupráci všech tří ústavů v Sekci morfologie a fyziologie a byl proto koncipován jako multioborový. Základní rámec vycházel z dlouhodobého zaměření Ústavu fyziologie, experimentální design ale kombinoval přístupy fyziologie (funkce na buněčné a molekulární úrovni), morfologie/histologie (metody imunohistochemie a další detekce morfogenetických událostí v kontextu tkání/orgánů) a farmakologie (farmakologické inhibice a terapeutické přístupy).

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Cílem projektu bylo 1) získání původních vědeckých výsledků k danému tématu, integrace výzkumu v rámci sekce, 2) zapojení mladých vědeckých pracovníků a studentů do výzkumné činnosti a 3) posílení mezinárodní spolupráce.

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany):

Výzkum probíhal dle schváleného projektového designu ve dvou paralelních směrech. První byl zaměřen na expresní profil autofagických molekul. Na základě výsledků morfologických analýz byl zjištěn významný dopad stimulace chondrocytů IL-1b na formování chrupavčitých nodulů v systému mikromas. Následný screening exprese autofagických molekul u IL-1b stimulovaných vs. kontrolních chondrocytů byl proveden s využitím Autophagic PCR Arrays (Qiagen, panel 84 genů). Kaspázové inhibice v této části výzkumu byly cíleny na kaspázu-1, která je známa také jako IL-1 konvertující enzym (Caspase-1/ICE Inhibitor Z-WEHD-FMK FMK002). Analýza inhibovaných a kontrolních chondrocytů založená na RNA sekvenování (externí servis – Lexogen) přinesla komplexní přehled změn na úrovni transkriptomu. Paralelní část výzkumu se věnovala kaspáze-11 v souvislosti se specifikací funkcí této kaspázy a kaspázy-1 (většina dosavadních výsledků *in vivo* byla získána u myši deficientních pro obě kaspázy). Exprese kaspázy-11 navíc signifikantně narůstá po stimulaci mikromas IL-1b. Hodnocení byla založena na PCR Array analýzách zaměřených na zánětové cytokiny a chondrogení/osteogení faktory.

Dosažené výsledky projektu (max. 1/2 strany):

Mezi 3 nejvýznamnější výsledky výzkumu patří:

- Přehled změn exprese autofagických molekul u IL-1b stimulovaných vs. kontrolních chondrocytů získaný s využitím Autophagic PCR Arrays (panel 84 genů). U 14 genů byl zjištěn statisticky významný rozdíl exprese po IL-1b (AO-like chondrocyty) s více než dvojnásobnou změnou
- Transkripční profil chondrocytů po farmakologické inhibici kaspázy-1 stanovený na základě sekvenační analýzy s identifikací 20 nejvýznamnějších up- a down-regulovaných genů
- Detekce signifikantních změn genové exprese (down-regulace) zánětových cytokinů po umlčení genu pro kaspázu-11

Dalšími výsledky projektu jsou:

- Zapojení postgraduálních studentů v rámci expanze jejich soft—skills
- Motivace pregraduálních studentů k vědecko-výzkumné činnosti a výzkumu v rámci vlastní odborné práce
- Posílení mezinárodní spolupráce (pokračující výzkum je začleněn do projektu, který je realizován pod hlavičkou Inter-Excellence, spolupráce s pracovištěm University Medical Center Regensburg, BRD)

Přínos projektu (max. 5 řádků):

V souladu s cíli: 1) získání původních vědeckých výsledků k danému tématu (autofagické změny u AO-like chondrocytů, dopad inhibice kaspázy-1 na expresní profil chondrocytů, specifikace funkcí kaspázy-1 a -11) 2) Zapojení mladých vědeckých pracovníků a studentů: kromě doktorandů se výzkumu zúčastnily pregraduální studentky, dvě z nich se rozhodly pro pokračování formou odborné práce, 3) posílení mezinárodní spolupráce (Prof. Grässel, Regensburg – Inter-Excellence).

Využití výsledků (max. 5 řádků):

1) Základ pro další vědecko-výzkumnou činnost na mezinárodní úrovni (např. projekt Inter-Excellence). 2) Vědecká publikace v časopise s IF, sdílení výsledků s mezinárodní odbornou komunitou. 3) Odborné práce zúčastněných pregraduálních studentů (VETUNI Brno). 4) Projektová zpráva a prezentace. 5) Potenciál přesahu do aplikační sféry (kaspáza-1 jako hlavní zánětová kaspáza patří v OA výzkumu ke klíčovým terapeutickým cílům).

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

Impact of caspase-1 inhibition on autophagic expression profile in OA-like chondrocytes

- e. g. Physiological Research (IF = 2,1)

Caspase-11 is involved in the regulation of inflammatory and osteogenic genes in chondrogenic cells

- e. g. Cartilage (IF = 3,85)

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

| Položka | Finanční prostředky | |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------|
| | Přidělené (v Kč) | Čerpané (v Kč) |
| Osobní náklady celkem (včetně odvodů) | 858 800,00 | 858 800,00 |
| Služby | 80 000,00 | 81 878,28 |
| Cestovné | 0,00 | 0,00 |
| Další provozní náklady | 511 583,00 | 509 704,72 |
| Doplňkové náklady | 217 557,00 | 217 557,00 |
| Celkem | 1 667 940,00 | 1 667 940,00 |

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

(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 sestávaly z fixní části (240 840,- Kč včetně odvodů) a motivační části (561 960,- Kč včetně odvodů). První část byla vyplácena proporčně ze mzdy jednotlivých členů projektového týmu, motivační pak měsíčně podle průběžného podílu na řešení projektu a na závěr projektu v souvislosti s jeho finalizací a přípravou výstupů.

Služby: Vzhledem k tomu, že publikace je mířena do nadprůměrně hodnoceného časopisu bez poplatku (Cartilage), byly služby využity na RNA sekvenování, výsledky jsou zahrnuty do závěrečné zprávy.

Cestovné: Nebylo součástí rozpočtu.

Další provozní náklady: Čerpání v této položce zahrnuje kity na izolaci a na prepis RNA-cDNA, desky a mixy na PCR Arrays, chemikálie na qPCR, protilátky (IHC), doplňkový laboratorní plastik (zkumavky, špičky), ochranné pomůcky a kultivační média/suplementy.

Doplňkové náklady: Dle schváleného rozpočtu.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

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

9. 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.

9. 1. 2023, prof. Eva Matalová

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 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.

9. 1. 2023, prof. Eva Matalová

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.

9. 1. 2023, prof. Jaroslav Doubek

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 2022

(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu: 2022ITA16

2. Název projektu:

Nové léčebné postupy v diagnostice a terapii onemocnění zvířat zájmových chovů

3. Řešitel projektu:

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

Fakulta/celoškolské pracoviště: FVL, Klinika chorob psů a koček

E-mail: crham@vfu.cz

Telefon: +420 541 562 582

4. 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.

Prof. MVDr. Alois Nečas, Ph.D., MBA (KCHPK, FVL, 1,0) – spoluřešitel, analýza a zpracování výsledku, podíl na publikačních výsledcích.

Prof. MVDr. Zdeněk Knotek, CSc., DECZM (KCHPPDS, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů.

MVDr. Ing. Eva Čermáková, Ph.D. (KCHPPDS, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů.

MVDr. Hana Černochová, Ph.D. (KCHPPDS, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, laboratorně-diagnostická práce, analýza výsledků.

MVDr. Zora Knotková, CSc. (KCHPPDS, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, laboratorně-diagnostická práce, analýza výsledků.

MVDr. Zita Filipejová, Ph.D. (KCHPK, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů.

MVDr. Jana Lorenzová, Ph.D. (KCHPK, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů.

MVDr. Lucie Urbanová, Ph.D. (KCHPK, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů.

MVDr. Tomáš Fichtel, Ph.D. (KCHPK, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů.

MVDr. Miloš Vávra, Ph.D. (KCHPK, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů.

MVDr. Andrea Nečasová (KCHPK, FVL, 0,5) - zapojení do shromažďování a zpracování výsledků v rámci řešení projektu.

MVDr. Michal Radó (DSP student) - zapojení do shromažďování a zpracování výsledků, klinická i laboratorní práce v rámci řešení projektu.

MVDr. Veronika Fojtíková (DSP student) - zapojení do shromažďování a zpracování výsledků, klinická i laboratorní práce v rámci řešení projektu.

MVDr. Henrieta Zbořilová (DSP student) - zapojení do shromažďování a zpracování výsledků, klinická i laboratorní práce v rámci řešení projektu.

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

Není společným projektem více součástí VETUNI.

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Předmět řešení projektu byl zaměřen na ověření nových diagnostických a terapeutických postupů u vybraných onemocnění zvířat zájmových chovů s důrazem na nejnovější trendy a směry v oblasti veterinární medicíny. 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 léčebných postupů, včetně využití biomateriálů a nanotechnologií v chirurgické léčbě onemocnění zvířat zájmových chovů.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Cíle projektu směřovaly k naplnění těchto dílčích cílů:

1) posouzení a zhodnocení antiadezivního vlivu nových biomateriálů na tvorbu adhezí v dutině břišní v podmínkách experimentu na modelu králíka; včetně posouzení, zda může konkrétní chirurgická technika ovlivnit vznik adhezí v dutině břišní po kastraci samice králíka domácího; 2) zhodnocení změn vybraných klinických a laboratorních parametrů v souvislosti s provedeným chirurgickým zákrokem a podmínkami ustájení zvířat; 3) stanovení referenčního rozmezí žlučových kyselin u zdravých ještěří a porovnání hodnot s výsledky získanými od pacientů vykazujících různé formy narušení hepatobiliárních funkcí; 4) určení referenčního rozmezí SDMA u zdravých drobných savců a vyhodnocení změn u pacientů vykazujících různé formy narušení renální funkce.

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany):

Dílčí cíl 1:

Experiment byl realizován v souladu se schváleným projektem pokusu (č. 14-2022 a 4-2022) na modelu králíka domácího (*Oryctolagus cuniculus*) v celkovém počtu 40 jedinců, rozdělených do čtyř skupin (A, B, C, D = 10) dle způsobu ošetření pahýlu děložního při ovariohysterovaginektomii. Ve skupině A (kontrola) byla ovariohysterovaginektomie provedena s ligací cév pahýlu vstřebatelným polyfilamentním šicím materiálem. Ve skupině B bylo kromě ligace cév pahýlu děložního provedeno uzavření (přešití) vaginálního pahýlu vstřebatelným monofilamentním šicím materiálem. Ve skupině C a D byl děložní pahýl ligován jako v kontrolní skupině, a navíc byl ošetřen aplikací antiadezivního materiálu 4DryField® PH, resp. aplikací Hyalobarrier gelu. Po 14 dnech klinického sledování byl experiment ukončen eutanazií a pitvou pokusných zvířat s následným histopatologickým vyšetřením. K posouzení množství a rozsahu adhezí byly použity scoring systémy (PAI dle Laudera, dle Boyerse, MCASM, dle Vetereho, modifikovaný scoring systém dle Müllera) s cílem statistického vyhodnocení získaných dat mezi jednotlivými skupinami.

Dílčí cíl 2:

U skupin zvířat A, C a D byla odebírána venózní krev z v. auricularis lateralis k hematologickému a biochemickému vyšetření, včetně stanovení hladiny kortizolu. Krev byla odebírána bezprostředně před chirurgickým zákrokem a 14 dní po chirurgickém zákroku. Statisticky jsou hodnoceny rozdíly ve vyšetřených parametrech ve vztahu k provedenému zákroku, bezpečnosti použitého antiadhezivního materiálu a posouzení vlivu ustájení v průběhu experimentu na celkový zdravotní stav jedinců.

Dílčí cíl 3:

Do studie byli zařazeni klinicky zdraví ještěři (*Pogona vitticeps*, *Iguana iguana*), kteří byli koprologicky a ultrasonograficky vyšetřeni a byla od nich opakovaně získána krev (odběr z v. *coccygea ventralis*). V laboratoři bylo provedeno biochemické vyšetření krve, včetně stanovení koncentrace žlučových kyselin.

Dílčí cíl 4:

Do SDMA studie byli zařazeni klinicky zdraví drobní savci. Moč byla získána manuální kompresí nebo katetrizací močového měchýře. Ve vzorcích krve odebrané z *a. auricularis centralis* bylo provedeno hematologické a biochemické vyšetření, včetně stanovení koncentrace SDMA. Rozmezí hodnot SDMA získaných od zdravých jedinců bylo porovnáno s hodnotami SDMA u jedinců se známkami odpovídajícími poškození renální funkce (azotémie, neregenerativní anémie, alterované hodnoty Up/Uc a strukturální změny ledvin).

Dosažené výsledky projektu (max. 1/2 strany):

S ohledem na stanovené dílčí cíle bylo dosaženo těchto výsledků:

- 1) Bylo posouzeno využití nových antiadhezivních materiálů v experimentální studii na modelu králíka. Ani jeden z králíků zahrnutých do experimentu neuhynul v průběhu provádění pokusu. U všech byla po skončení experimentu dle harmonogramu projektu pokusu provedena eutanazie s pitvou a odběrem vzorků na histopatologické vyšetření. Nejčastěji byly pozorovány adheze vaginálního pahýlu s močovým měchýřem a tlustým stěvem. U králíků kastrovaných bez přešití vaginálního pahýlu (skupina A) bylo při nekropsích pozorováno výrazně větší množství pevnějších, vaskularizovaných adhezí přirůstajících k více orgánů dutiny břišní oproti králíkům kastrovaným technikou s přešitím vaginálního pahýlu (skupina B). Při porovnávání množství srůstů dle scoring systému (PAI, dle Laudera, dle Boyerse, MCASM, dle Vetereho, modifikovaný scoring systém dle Müllera) bylo shodně zjištěno významně nižší bodové score (méně adhezí) u králíků skupiny B, oproti králíkům kontrolní skupiny A. Při porovnávání použití antiadhezivních materiálů jsme nejméně adhezí nacházeli u králíků skupiny D (ošetřených aplikací Hyalobarrier gelu), v porovnání se skupinou C (použití 4DryField® PH), respektive kontrolní skupinou A.
- 2) Při interpretaci výsledků vyšetření krve jsme nezaznamenali žádné změny ve sledovaných parametrech při zahájení a ukončení experimentu a ani žádné výrazné odchylky mezi skupinách králíků ve vztahu k použitému antiadhezivnímu materiálu. V současné době probíhá zpracování histologických vzorků a statistická analýza nashromážděných dat. Předběžné výsledky experimentální studie prokazují, že použitá chirurgická technika má vliv na vznik a rozsah pooperačních adhezí v dutině břišní, kdy k jejich prevenci lze využít vhodný antiadhezivní materiál.
- 3) U 10 klinicky zdravých agam vousatých byly stanoveny koncentrace žlučových kyselin v krvi po hladovce, 12 a 24 hodinách po nakrmení. Výsledky jsou statisticky zpracovávány. U 24 klinicky zdravých leguánů zelených byly stanoveny koncentrace žlučových kyselin po 24 a u 18 leguánů po 48 hodinách hladovky. Rozdíl mezi hodnotami po 24 a 48 hodinách hladovky je statisticky významný. Výsledky budou použity v připravované publikaci.
- 4) Rozmezí hodnot SDMA bylo stanoveno u 80 zdravých jedinců králíků u dalších 20 bude stanoveno v průběhu prosince) a u 10 pacientů se známkami odpovídajícími poškození renální funkce (azotémie). Získané výsledky jsou statisticky zpracovávány. K markantnímu zvýšení hodnoty SDMA dochází u pacientů až současně s azotémií zjištěnou při biochemickém vyšetření

krve. V porovnání s kočkami a se psy tedy dochází ke zvýšení hladiny SDMA u králíků až v pozdější fázi renálního onemocnění.

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Řešení projektu významně podpořilo rozvoj moderních diagnostických a terapeutických postupů pro experimentální i klinickou praxi. Přínosem projektu bylo ověření techniky použití a zhodnocení funkčnosti antiadhezivních biomateriálů pro prevenci tvorby srůstů v podmínkách experimentu. Získané výsledky by mohly přispět ke snížení pooperační morbidity u pacientů po chirurgickém zákroku v dutině břišní a mohou mít praktický dopad na zkvalitnění chirurgické léčby v rámci poskytované veterinární péče. Přínosem projektu je taktéž získání unikátních poznatků o možnosti využít metodu stanovení koncentrace žlučových kyselin u plazů pro intravitální diagnostiku narušení hepatobiliární funkce a metodu stanovení koncentrace SDMA u drobných savců pro včasnou intravitální diagnostiku poškození funkce ledvin.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Výsledky tohoto projektu budou publikovány v odborném časopise s impakt faktorem. Zjištěné poznatky budou navíc velmi přínosné i pro veterinární klinickou praxi – poslouží jako základ pro optimalizaci metodiky správné chirurgické techniky kastrace zájmových zvířat.

V případě, že bude výsledek studií pozitivní, vytvoří se tak podmínka pro uplatnění obou metod u pacientů s chronickým postižením funkce jater (plazi) a u pacientů s akutním postižením funkce ledvin (drobní savci). Přínosem projektu je rovněž získání prioritních údajů o rozmezí koncentrace žlučových kyselin významných skupin plazů a koncentrace SDMA u drobných savců v oblasti experimentální medicíny a uplatnění publikovaných dat ve vědeckých časopisech.

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

The effect of surgical technique on the formation of postoperative adhesions after ovari hysterovagnectomy; Veterinary Record

Influence of antiadhesive materials on the formation of adhesions in the abdominal cavity after ovari hysterovagnectomy – an experimental study on rabbits Laboratory animals

Influence of housing, surgery and biomaterials on the blood parameters in laboratory animals - Journal of Veterinary Behavior

Plasma bile acids concentration in clinically healthy lizards and lizards with chronic liver diseases. Journal of Exotic Pet Medicine

Medicine Plasma SDMA concentration in clinically healthy small mammals and patients with acute renal disease. Journal of Exotic Pet Medicine

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

| Položka | Finanční prostředky | |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------|
| | Přidělené (v Kč) | Čerpané (v Kč) |
| Osobní náklady celkem (včetně odvodů) | 1 053 120,00 | 1 053 120,00 |
| Služby | 50 000,00 | 50 000,00 |
| Cestovné | 0,00 | 0,00 |
| Další provozní náklady | 424 733,00 | 424 733,00 |
| Doplňkové náklady | 229 177,00 | 229 177,00 |
| Celkem | 1 757 030,00 | 1 757 030,00 |

**Na základě rozhodnutí ze dne 18.05.2022 pod číslem 2022ITA16.*

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

(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:

Celková výše osobních nákladů byla 1 053 120,00 Kč. Z této sumy tvořily mzdové prostředky (os. příplatky, příp. odměny) pro členy řešitelského týmu 990 120,00 Kč včetně zákonných odvodů a dále stipendia, která tvořila 63 000,00 Kč. V průběhu řešení projektu došlo ke změně v počtu DSP studentů zapojených do řešení projektu, kdy z důvodu zahraniční stáže MVDr. Michala Radó byl na základě schválené žádosti doplněn řešitelský tým o studentku doktorského studijního programu MVDr. Alenu Pompovou. Rozpočet projektu zůstal nedotčen a stipendium původně určené pro MVDr. Rada bylo dle skutečně odvedené práce přerozděleno mezi něj a MVDr. Pompovou.

Služby:

Služby (max. 10% celkových nákladů projektu) byly čerpány ve výši 50 000,00 na opravu a údržbu přístrojů 6 920,00 Kč; pronájem tlakových lahví, servis, statistická analýza, editace a úprava textů pro publikační výstupy 43 080,00 Kč.

Cestovné:

Mobility nebyly plánovány.

Další provozní náklady:

Provozní náklady ve výši 424 733,00 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 229 177,00 Kč.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

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

9. 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:

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:**

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 2022
(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu: 2022ITA21

2. Název projektu: Zdraví jako předpoklad welfare zvířat

3. 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: 541562773

4. 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

MVDr. Martin Hostovský, Ph.D. – spoluřešitel, akademický pracovník

MVDr. Monika Šebánková, Ph.D. – spoluřešitelka, akademická pracovnice

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

MVDr. Přemysl Mikula, Ph.D. – spoluřešitel, akademický pracovník

Mgr. et Mgr. Veronika Doubková, Ph.D. – spoluřešitelka, akademická pracovnice

Ing. Kamila Novotná Kružíková, Ph.D. – spoluřešitelka, akademická pracovnice

Mgr. Petr Linhart, Ph.D. – spoluřešitel, akademický pracovník

MVDr. Mgr. Veronika Zavřelová, Ph.D. – spoluřešitelka, akademická pracovnice

MVDr. Gabriela Kadlecová – spoluřešitelka, akademická pracovnice

Mgr. Lucie Hostovská – spoluřešitelka, akademická pracovnice

Mgr. Veronika Vojtkovská – spoluřešitelka, akademická pracovnice

MVDr. Lenka Válková – spoluřešitelka, studentka 3. ročníku DSP v prezenční formě

MVDr. Tereza Novotná – spoluřešitelka, studentka 3. ročníku DSP v prezenční formě

Mgr. Lucia Kotianová – spoluřešitelka, studentka 2. ročníku DSP v prezenční formě

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

-

6. 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 zvířat včetně ryb a vodních organismů.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Cílem projektu bylo hodnocení zdraví zvířat jako předpokladu dobrých životních podmínek hospodářských, zájmových a volně žijících zvířat se zaměřením na

- srovnání úrovně výskytu nálezů na plicích u různých druhů a kategorií zvířat porážených na jatkách s dovozením dopadu na welfare těchto zvířat
- hodnocení vlivu transportních podmínek na parametry vnitřního prostředí a stresu u králíka
- hodnocení úrovně zdravotního stavu koček v útulcích a sledování účinnosti aplikace ozonu na vybrané patogeny vyskytující se v útulcích pro kočky
- stanovení bílkoviny v moči pro hodnocení zdravotního stavu štěňat
- hodnocení vlivu perorálního podávání nesteroidních antiflogistik na zdravotní ukazatele kapra obecného (*Cyprinus carpio*)
- stanovení obsahu rtuti v srsti a tkáních netopýra velkého (*Myotis myotis*)

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany):

Srovnání úrovně výskytu nálezů na plicích u zvířat porážených na jatkách bylo provedeno na základě analýzy četností patoanatomických nálezů zjišťovaných v rámci veterinární prohlídky na jatkách. Ve spolupráci se Státní veterinární správou byly získány výsledky veterinární prohlídky plic skotu (v kategoriích dojnice, jalovice, býci ve výkrmu, telata), prasat (prasnice, prasata ve výkrmu, selata), ovcí (ovce a jehňata) a koz (kozy a kůzlata) pocházejících z chovů v České republice a porážených na jatkách v České republice za období let 2010 až 2021. Na základě výsledků bylo provedeno srovnání úrovně výskytu narušení plic u různých druhů a kategorií zvířat porážených na jatkách s dovozením dopadu na welfare těchto zvířat.

Sledování vlivu transportních podmínek bylo provedeno u králíků umístěných v přepravních kontejnerech v různém poměru hmotnosti na danou plochu. Byl sledován vliv hustoty zvířat v transportních kontejnerech a dalších faktorů působících na králíky v době přepravy (hustota nakládky, přítomnost jiných zvířat...) na vybrané ukazatele. Akutní stres vyvolaný v důsledku uzavření v transportních kontejnerech byl hodnocen prostřednictvím sledování změn povrchové teploty na těle králíků a změn hladin glukokortikoidů ve slinách. Pro získání bazálních hodnot bylo měření termokamerou (snímky v oblasti hlavy) provedeno ještě v ustájovacích kotcích a byly také odebrány vzorky slin pro laboratorní vyšetření ihned po odchytu ještě před umístěním králíků do transportních kontejnerů. Snímání termokamerou a odběr vzorků bylo opakováno v pravidelných intervalech po umístění králíků do transportních kontejnerů (po 20 minutách a po 40 minutách) pro stanovení vývoje hladin sledovaných ukazatelů v závislosti na době působení sledovaných faktorů.

Hladiny glukokortikoidů ve slinách králíků byly analyzovány pomocí imunochemických metod (ELISA).

Pro účely hodnocení zdravotního stavu koček v útulku byla analyzována databáze obsahující zdravotní záznamy všech koček přijatých do vybraných útulků. Účinnost ozonu na patogeny vyvolávající infekční onemocnění koček v útulcích (felinní parvovirus, felinní koronavirus, kalicivirus) byla experimentálně ověřována za použití komerčně dostupného generátoru ozonu (Trinizon 3500 family, GB). Vzorky obsahující živý virus o koncentraci odpovídající běžnému zatížení prostředí byly aplikovány na povrchy v experimentální místnosti. Po aplikaci ozonu byla viabilita patogenů ověřována pomocí kultivace suspenzních izolátů na buněčných liniích. Za aseptických podmínek byly patogeny inokulovány na buněčný monolayer linie Crandel Rees feline kidney (Sigma-Aldrich, USA) v 2 % médiu DMEM (Sigma-Aldrich, USA). Následně byla prováděna inkubace v termostatu při teplotě 37 °C s 5 % koncentrací oxidu uhličitého. Po inkubaci byl pozorován cytopatický efekt pod inverzním mikroskopem.

Stanovení referenčních hodnot UPC bylo provedeno ve vzorcích moči, které byly získané spontánní mikcí od štěňat různých plemen a různého věku. Rozhodnutí o dobrém zdravotním stavu a zařazení do plánované studie bylo provedeno na základě anamnézy získané od majitele. Bylo také provedeno základní vyšetření vzorku moči. V rámci studie bylo od štěňat získáno a vyšetřeno celkem 316 vzorků moči. Tato skupina štěňat byla rozdělena na dílčí skupiny podle věku (6 týdnů, 2 až 3 měsíce, 3 až 4 měsíce, 4 až 6 měsíců, 6 až 12 měsíců). Pro porovnání byla do plánované studie také zahrnuta kontrolní skupina (55 psů), která byla tvořena klinicky zdravými psy ve věku nad jeden rok. Pro stanovení koncentrace proteinu byly využity dvě běžně využívané spektrofotometrické metody založené na reakci analytu s pyrogallolovou červení a benzethonium chloridem. Stanovení obsahu kreatininu bylo provedeno spektrofotometricky s využitím Jaffého metody. Pro zařazení vzorků do studie byly také sledovány základní fyzikální a chemické parametry moči a močový sediment. Referenční rozmezí bylo vytvořeno pro skupinu šestitýdenních štěňat, od kterých bylo získáno 140 vzorků.

Pro sledování potenciálně negativních účinků vybraných nesteroidních antiflogistik byl jako modelový organismus zvolen kapr obecný (*Cyprinus carpio*). Předmětem testování byli dva zástupci farmak – diklofenak a ibuprofen. Obě léčiva byla aplikována samostatně v krmivu, a to v dávce, která odpovídá environmentálně relevantní koncentraci, a dávce, která byla násobkem nižší koncentrace pro zhodnocení vztahu dávky a odpovědi. Do experimentu byla zařazena také kontrolní skupina. Testované ryby se umístily do 10 nádrží po 12 kusech a testované krmivo bylo podáváno po dobu 6 týdnů. V průběhu experimentu byla každý den sledována případná mortalita, změny chování a byla také prováděna analýza základních fyzikálně-chemických parametrů vody (pH, teplota, kyslík, dusitany, dusičnany, amoniak). Po ukončení expozice byl proveden odběr krve pro základní hematologické a biochemické vyšetření. Bylo provedeno zhodnocení základních morfologických ukazatelů a při pitvě byly odebrány vybrané orgány pro histologické vyšetření, analýzu ukazatelů oxidativního stresu a endokrinní disrupce. Dále byly sledovány změny exprese vybraných mRNA genů. Koncentrace testovaných farmak v krmivu byla ověřena pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Test toxicity byl realizován v akreditovaném zařízení Ústavu ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství FVHE VETUNI v souladu se schváleným projektem pokusu (MSMT-23130/2022-4).

Pro stanovení obsahu rtuti v srsti a tkáních netopýra velkého byly zpracovány vzorky srsti a tkání uhynulých netopýrů velkých, které byly poskytnuty Ústavem biologie obratlovců AV ČR (v souladu s výjimkou z ochranných podmínek zvláště chráněných živočichů – povolení manipulace s jedinci, kadávery, částmi těl a tkání, odběr vzorků tkání ze živých i mrtvých jedinců nebo jejich částí, přeprava, držení a zpracování vzorků tkání zvláště chráněných druhů živočichů z přílohy III vyhl. č. 395/1992 Sb.; čísla jednací 181108/2016/KUSK, JMK 13759/2016, KUJCK 161737/2016/OZZL, 3640/ZPZ/2016/ZD-893, KUZL 68700/2016). Ve vzorcích byl analyzován obsah celkové rtuti pomocí metody atomové absorpční spektrometrie na přístroji AMA 254 (Altec, s. r. o., Praha). Byl hodnocen obsah rtuti v jednotlivých tkáních (srst, svalovina, kůže z létací blány, játra, ledviny)

netopýra velkého. Dle opotřebení chrupu byli jednotliví netopýři rozděleni do tří skupin dle věku a bylo zjištěno pohlaví jedinců. Následně byl vyhodnocen vliv lokality, věku a pohlaví na obsah rtuti v jednotlivých tkáních.

Dosažené výsledky projektu (max. 1/2 strany):

Výsledkem projektu v části zaměřené na srovnání úrovně výskytu nálezů na plících u různých druhů a kategorií zvířat porážených na jatkách je srovnání úrovně zdraví plic skotu, prasat, ovcí a koz porážených na jatkách s dovozením dopadu na welfare těchto zvířat.

Výsledkem projektu v části zaměřené na sledování vlivu transportních podmínek na parametry vnitřního prostředí u králíka je stanovení změn povrchové teploty na těle králíků a změn hladin glukokortikoidů ve slinách v důsledku umístění králíků v transportních kontejnerech při různé hustotě nakládky a stanovení vývoje hladin sledovaných ukazatelů v závislosti na době umístění králíků v přepravním kontejneru.

Výsledkem projektu v části zaměřené na hodnocení zdraví koček v útulcích a posouzení účinnosti aplikace ozonu na vybrané patogeny vyskytující se v útulcích pro kočky je analýza výskytu onemocnění a spektra podaných léčiv kočkám v útulcích a zhodnocení účinnosti plynného ozonu na vybrané patogeny způsobující infekční onemocnění zvířat.

Výsledkem projektu v části zaměřené na využití stanovení bílkoviny v moči při hodnocení zdravotního stavu štěňat je zhodnocení vlivu věku na hodnoty UPC a stanovení referenčních hodnot UPC pro 6-týdenní štěňata a porovnání dvou různých spektrofotometrických metod běžně používaných ve veterinární diagnostice pro stanovení koncentrace proteinu v moči.

Výsledkem projektu v části zaměřené na hodnocení vlivu perorálního podávání nesteroidních antiflogistik je posouzení chronického působení diklofenaku a ibuprofenu na zdravotní ukazatele kapra obecného.

Výsledkem projektu v části zaměřené na monitoring obsahu rtuti v srsti a tkáních netopýra velkého je stanovení obsahu rtuti v srsti a tkáních netopýra velkého a ověření možnosti využití této matrice pro dlouhodobý plošný monitoring zátěže prostředí rtutí.

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Přínosem projektu je získání poznatků o úrovni zdraví plic skotu, prasat, ovcí a koz porážených na jatkách na základě patoanatomických nálezů na plících zjišťovaných při veterinární prohlídce na jatkách a využití analýzy výsledků veterinární prohlídky zvířat po porážce pro směřování dalších chovatelských a veterinárních opatření pro zlepšování zdraví a pohody hospodářských zvířat chovaných v ČR.

Přínosem projektu v části zaměřené na sledování vlivu transportních podmínek na parametry vnitřního prostředí u králíka je určení dopadu různé hustoty zvířat v transportních kontejnerech a dalších faktorů působících na králíky v době přepravy na změnu povrchové teploty na těle králíků a hladiny glukokortikoidů ve slinách a stanovení vývoje hladin sledovaných ukazatelů v závislosti na době umístění králíků v přepravním kontejneru.

Přínosem projektu v části zaměřené na hodnocení zdraví koček v útulcích a posouzení účinnosti aplikace ozonu na vybrané patogeny vyskytující se v útulcích pro kočky je získání přehledu o podaných léčivech a zdravotním stavu koček umístěných v útulcích. Praktickým přínosem projektu je ověření účinnosti plynného ozonu na eliminaci vybraných patogenů vyvolávajících infekční onemocnění u koček v prostředí útulku.

Přínosem projektu v části zaměřené na využití stanovení bílkoviny v moči při hodnocení zdravotního stavu štěňat je stanovení fyziologických hodnot UPC pro 6-týdenní štěňata a porovnání výsledků koncentrace proteinu získaných s využitím dvou různých spektrofotometrických metod. Realizace navrhovaného projektu umožní validní zhodnocení výsledků biochemického vyšetření moči psů různých věkových kategorií v praxi.

Přínosem projektu v části zaměřené na hodnocení vlivu perorálního podávání nesteroidních antiflogistik na zdravotní ukazatele kapra obecného je rozšíření a prohloubení doposud nekompletních informací o toxických účincích testovaných farmak. Kapr obecný patří mezi hojně se vyskytujícího zástupce ryb v českých vodách a podle metodiky OECD je doporučeným modelovým organismem pro testy toxicity.

Přínosem projektu v části zaměřené na monitoring obsahu rtuti v srsti a tkáních netopýra velkého je stanovení obsahu rtuti v srsti a tkáních netopýra velkého a ověření možnosti využití této matrice pro dlouhodobý plošný monitoring zátěže prostředí rtutí.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Výsledky byly dosud prezentovány na dvou konferencích (Ochrana zvířat a welfare, Toxcon), publikovány v odborném časopise (Vojenské zdravotnické listy) a publikovány ve vědeckém časopise s impakt faktorem (Frontiers in Veterinary Science). Další články 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 spoluřešitelék MVDr. Lenky Válkové, Mgr. Veroniky Vojtkovské a Mgr. Lucie Kotianové.

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

Cíl 1: Srovnání úrovně výskytu nálezů na plicích u různých druhů a kategorií zvířat porážených na jatkách s dovozením dopadu na welfare těchto zvířat

1 Lenka Válková, Eva Voslářová, Vladimír Večerek: Pohoda zvířat z pohledu zdraví plic u skotu, prasat, ovcí a koz posuzovaného při porážení zvířat na jatkách, Veterinary Sciences

Cíl 2: Hodnocení vlivu transportních podmínek na parametry vnitřního prostředí a stresu u králíka

2 Gabriela Kadlecová, Monika Šebánková, Jan Chloupek, Lucie Hostovská, Lucia Kotianová, Eva Voslářová, Vladimír Večerek: Hodnocení změny povrchové teploty a koncentrace slinného kortikosteronu u králíků domácích v závislosti na hustotě a kontaktu s dalšími jedinci v přepravních kontejnerech, Scientific Reports

Cíl 3: Hodnocení úrovně zdravotního stavu koček v útulcích a sledování účinnosti aplikace ozonu na vybrané patogeny vyskytující se v útulcích pro kočky

3a Veronika Vojtkovská, Michal Kaluža, Eva Voslářová, Vladimír Večerek, Lenka Tomečková: Úroveň morbidity a spektrum podaných léčiv u koček v útulku v České republice, Frontiers in Veterinary Science – publikováno (2022, vol. 9, article nr. 1025197)

3b Veronika Vojtkovská, Dana Lobová, Eva Voslářová, Vladimír Večerek: Vliv aplikace plynného ozónu na vybrané patogeny vyskytující se v útulcích pro kočky a dalších zařízeních, Plos One

Cíl 4: Stanovení bílkoviny v moči pro hodnocení zdravotního stavu štěňat

4 Simona Kovaříková, Jana Blahová, Petr Maršálek: Stanovení poměru proteinu ke kreatininu v moči štěňat různého věku, Journal of Veterinary Internal Medicine

Cíl 5: Hodnocení vlivu perorálního podávání nesteroidních antiflogistik na zdravotní ukazatele kapra obecného (*Cyprinus carpio*)

5 Jana Blahová, Veronika Doubková, Petr Maršálek, Tereza Novotná, Zdeňka Svobodová: Vliv perorálního podávání nesteroidních antiflogistik na zdravotní ukazatele kapra obecného (*Cyprinus carpio*), Science of the Total Environment

Cíl 6: Stanovení obsahu rtuti v srsti a tkáních netopýra velkého (*Myotis myotis*)

6 Kamila Novotná Kružiková, Petr Linhart, Zdeňka Svobodová: Obsah celkové rtuti ve vybraných tkáních netopýra velkého (*Myotis myotis*) v závislosti na věku a pohlaví, Environmental Toxicology and Chemistry

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

| Položka | Finanční prostředky | |
|---------------------------------------|---------------------|------------------|
| | Přidělené (v Kč) | Čerpané (v Kč) |
| Osobní náklady celkem (včetně odvodů) | 1 976 020 | 1 966 489 |
| Služby | 103 750 | 101 967,23 |
| Cestovné | 14 078 | 11 004 |
| Další provozní náklady | 1 221 587 | 1 226 443,77 |
| Doplňkové náklady | 497 315 | 497 315 |
| Celkem | 3 812 750 | 3 803 219 |

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

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 4 856,77 Kč bylo převedeno do kategorie Další provozní náklady, ve které bylo čerpání o tuto částku navýšeno. Nedočerpání položky Osobní náklady bylo způsobeno slevou na odvodech (sníženy o 9 531 Kč), celkem tedy bylo v projektu čerpáno o tuto částku méně.

Osobní náklady:

Položka „Osobní náklady celkem“ zahrnuje odměny a odvody akademických pracovníků (Prof. MVDr. Vladimír Večerek, CSc., MBA, Prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D., Prof. MVDr. Zdeňka Svobodová, DrSc., Doc. Ing. Jana Blahová, Ph.D., Doc. MVDr. Petr Chloupek, Ph.D., Doc. Mgr. Petr Maršálek, Ph.D., MVDr. Martin Hostovský, Ph.D., MVDr. Monika Šebánková, Ph.D., MVDr. Simona Kovaříková, Ph.D., MVDr. Přemysl Mikula, Ph.D., Mgr. et Mgr. Veronika Doubková, Ph.D., Ing. Kamila Novotná Kružiková, Ph.D., Mgr. Petr Linhart, Ph.D., MVDr. Mgr. Veronika Zavřelová, Ph.D., MVDr. Gabriela Lukešová, Mgr. Lucie Hostovská, Mgr. Veronika Vojtkovská) a stipendia studentů DSP (MVDr. Lenka Válková, MVDr. Tereza Novotná, Mgr. Lucia Kotianová), kteří byli součástí řešitelského týmu a podíleli se na řešení tohoto projektu.

Odměny byly vyplaceny v celkové výši 1 290 000 Kč a stipendia v celkové výši 250 000 Kč. Celkem bylo v položce osobní náklady vyčerpáno 1 966 489 Kč. Rozdíl oproti přidělené částce činí -9 531 Kč, byl způsoben slevou na odvodech.

Služby:

Položka „Služby“ zahrnuje náklady, které byly využity na servis zařízení, která byla využívána při řešení dílčích úkolů (AMA 254, chlazená centrifuga, mycí automat Miele), na pronájem tlakových lahví, na překlad článku určeného k publikaci ve vědeckém časopise s IF, na úhradu vložného na tuzemské konferenci (3x Toxcon, 1x FECAVA Eurocongress 2022) a tisk posterů. Celkové náklady v této položce byly 101 967,23 Kč, zbývající částka ve výši 1 782,77 Kč byla převedena do položky Další provozní náklady.

Cestovné:

Položka „Cestovné“ zahrnuje náklady související s účastí spoluřešitelů na tuzemských konferencích (3x Toxcon, 1x FECAVA Eurocongress 2022), tj. jízdné, stravné a ubytování, v celkové výši 11 004 Kč. Zbývající částka ve výši 3 047 Kč byla převedena do položky Další provozní náklady.

Další provozní náklady:

Položka „Další provozní náklady“ představuje finanční prostředky, které byly využity pro nákup krmiva a akvaristických potřeb, komerčních kitů, kalibrátorů a kontrolního séra pro biochemické vyšetření krve, ELISA kitů pro stanovení vitellogeninu, komerčních kitů pro analýzu ukazatelů oxidativního stresu a markerů endokrinní disrupce, SPE kolonek pro úpravu vzorků před analýzou, sondy rozpuštěného kyslíku, spotřebního materiálu pro chromatografické analýzy, spotřebního materiálu pro analýzu biomarkerů (kyvety, kepičky, špičky, odběrové nádoby), chemikálií a rozpouštědel pro analýzu biomarkerů, vyšetření vody a kvantifikaci testovaných látek, nákup krmiva pro králíky, komerčních kitů pro stanovení stresových hormonů v krvi a ve slinách, spotřebního materiálu pro odběr a uchovávání vzorků slin, spotřebního materiálu pro biochemické vyšetření krve, spotřebního materiálu pro zpracování vzorků slin, chemikálií pro úpravu vzorků slin a krve, laboratorního skla, spotřebního materiálu pro práci s tkáňovými kulturami (plastové sérologické pipety, lahve na tkáňové kultury, injekční filtry Filtropur, destička na tkáňové kultury, DMEM médium pro kultivaci buněčných kultur), spotřebního materiálu pro izolaci a detekci RNA (stripy se zkumavkami, fetální bovinní sérum, injekční stříkačky), spotřebního materiálu a laboratorního vybavení pro vyšetření moči (diagnostické proužky pro základní screening moči, diagnostické kity pro vyšetření chemických parametrů moči, refraktometr), spotřebního materiálu pro odběr vzorků moči (zkumavky, odběrové nádoby, misky pro sběr moči, Pasteurova pipeta, špičky), spotřebního materiálu pro zpracování vzorků před analýzou (Eppendorf zkumavky, kyvety, mikrotitrační destičky, destičky pro vyšetření močového sedimentu, špičky, kepičky, jehly), SPE kolonek pro úpravu vzorků před analýzou, drobného hmotného materiálu využívaného pro zpracování vzorků moči (4 třepačky Vortex) a laboratorního skla, 3x kapesní pH metr pro měření pH v terénu, spotřebního materiálu a laboratorního vybavení pro vyšetření vzorků a stanovení obsahu rtuti (zipovací pytlíčky a obalový materiál, lodičky a další spotřební materiál na AMA 254, pitevní nástroje (nůžky a pinzety), medicínální kyslík), nákup pohonných hmot a kancelářských potřeb, které byly využity pro účely realizace předkládaného projektu. Celkové náklady v položce Další provozní náklady byly čerpány ve výši 1 226 443,77 Kč (původně přidělená částka byla navýšena o 4 856,77 Kč převedených z položky Služby a Cestovné).

Doplňkové náklady:

Položka „Doplňkové náklady“ představuje režijní náklady ve výši 497 315 Kč.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

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

9. 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:

5. 1. 2023

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 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:**

5. 1. 2023

Prof. Ing. Eva Voslářová, 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:

6. 1. 2023

Prof. MVDr. Vladimír Večerek, CSc., MBA

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

Příloha:

Vypracované články k publikaci k naplnění jednotlivých cílů projektu

Pohoda zvířat z pohledu zdraví plic u skotu, prasat, ovcí a koz posuzovaného při porážení zvířat na jatkách

Lenka Válková, Eva Voslářová, Vladimír Večerek

Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI

Abstrakt

Práce sleduje výskyt poškození plic u skotu, prasat, ovcí a koz u zvířat chovaných a porážených na jatkách v České republice v období let 2010 až 2021. Cílem práce bylo zjistit, u kterých kategorií porážených zvířat jsou nejvyšší a u kterých kategorií porážených zvířat jsou nejnižší výskyty poškození plic, protože zdraví plic významně ovlivňuje pohodu chovaných zvířat. U vykrmovaných zvířat (býci ve výkrmu, prasata ve výkrmu, jehňata a kůzlata) byl výskyt poškození plic statisticky významně nejvyšší u prasat ve výkrmu (39,08 %) a následně pak u jehňat (25,2 %), nižší je u býků ve výkrmu (13,1 %) a kůzlat (6,4 %). U dospělých zvířat (dojnice, prasnice, ovce a kozy) byl výskyt poškození plic statisticky významně nejvyšší u ovcí (39,5 %), následně pak u dojníc (36,4 %), nižší byl u prasníc (23,7 %) a koz (21,5 %). Pro chronické poškození plic výsledky ukázaly statisticky významně nejvyšší výskyt u prasat ve výkrmu (37,2 %) a mláďat vyřazovaných z chovu (telata 34,0 %, selata 31,3 %). Pro akutní poškození plic výsledky ukázaly statisticky významně nejvyšší výskyt u selat (27,4 %) a telat (9,7 %) ve srovnání s ostatními kategoriemi porážených zvířat. U dojníc a prasníc se nálezy pohybovaly přibližně mezi 6 % až 8 %, u ostatních kategorií nepřekročily 2 %. U parazitárního poškození plic byly zjištěny statisticky nejvyšší nálezy u ovcí (25,8 %) a následně u jehňat (17,1 %), následně u koz (5,8 %) a dále u kůzlat (1,0 %). Výskyt parazitárního poškození plic u skotu a prasat nepřekračoval 0,05 %. Rozdíly mezi chronickými, akutními a parazitárními nálezy u jednotlivých kategorií zvířat byly statisticky významné. Nálezy poškození plic dokládají skutečnost, že pohoda jatečných zvířat není odpovídající a měla by být zvýšena. Zlepšením zdraví plic v chovech jatečných zvířat by bylo možné dosáhnout významného zvýšení úrovně pohody u všech kategorií zvířat chovaných pro následnou porážku na jatkách.

Úvod

Plice jsou významným orgánem u zvířat, které ovlivňují úroveň svého zdraví celkovou pohodu zvířat. Onemocnění plic provází klinicky se projevující dýchací potíže a kašel ovlivňující celkovou kondici, růst, produkci i reprodukci zvířat, onemocnění plic na subklinické úrovni ovlivňuje pohybovou a případně další kondici zvířat. U akutních onemocnění plic je zjišťována dále zvýšená teplota, apatie, neochota k pohybu a další příznaky omezující přirozené chování zdravých zvířat. Zdravotní úroveň plic tak významně ovlivňuje pohodu zvířat.

Úroveň zdraví plic lze zjišťovat při prohlídce plic u zvířat porážených na jatkách. Při sledování velkého počtu porážených zvířat lze zhodnocením zdravotního stavu plic získat poznatky o celkové zdravotní úrovni plic a s ní související úrovni pohody jatečných zvířat v určitém regionu, na vysokých počtech zvířat pak lze získat poznatky na úrovni obecně platných pravidel.

Veterinární prohlídka tak má velký význam z hlediska kontroly zdraví hospodářských zvířat (Stark et al., 2014; Stark, 2017). Patoanatomické změny lze nejlépe monitorovat při postmortální prohlídce na jatkách (Huneau-Salaun et al., 2015). Důkladný rozbor četnosti trendů ve výskytu patoanatomických nálezů může chovatelům a veterinárním lékařům poskytnout zpětnou vazbu, na základě které mohou aplikovat vhodná preventivní opatření a eliminovat tak riziko ohrožení zdraví zvířat a také ekonomických ztrát v chovech (Ceccarelli et al., 2018; Januskeviciene et al., 2010).

Patoanatomické nálezy na plicích poražených zvířat jsou zmiňovány zejména ve studiích, které se zabývají příčinami konfiskace orgánů a jatečných těl hospodářských zvířat v rámci postmortální veterinární prohlídky. Nálezy na plicích patřily k nejčastějším příčinám konfiskace u skotu, ovcí a koní vyšetřovaných na jatkách v Itálii v období let 2010 až 2016 (Ceccarelli et al., 2018).

Januskeviciene et al. (2010) analyzovali výskyt patologických nálezů u jatečných zvířat poražených na vybraných jatkách v Litvě v letech 2000 až 2009 a zjistili, že nálezy na plicích se vyskytovaly na úrovni 7,4 % až 78,98 % u sledovaných druhů poražených hospodářských zvířat a drůbeže.

Cílem naší práce bylo na vysokých počtech zvířat porovnat pro různé druhy a kategorie jatečného skotu a prasat úroveň postižení plic projevující se nálezy na plicích při prohlídce zvířat po poražení, tzn. zjistit, u kterých kategorií je výskyt poškození plic nejvyšší a u kterých nejnižší, tzn. u kterých kategorií je pohoda zvířat související se zdravím plic nejhorší a u kterých nejlepší.

Z pohledu zaměření případných opatření ke zlepšení zdraví plic u jatečných zvířat bylo naším cílem zjistit, u kterých kategorií se vyskytuje nejvyšší a případně nejnižší výskyt akutních postižení plic, u kterých výskyt chronických postižení plic a u kterých výskyt parazitárních postižení plic.

Porovnáním celkových výskytů poškození plic mezi jednotlivými kategoriemi poražených zvířat bylo cílem zjistit, které kategorie jsou z pohledu zdraví plic nejvíce postiženy a které nejméně, tzn. které kategorie jatečných zvířat mají poškozením plic sníženou úroveň welfare nejvíce a které nejméně, a na základě zjištěných výsledků dovodit potřebu změn v chovech zvířat vedoucí ke zlepšení zdraví plic a tím také k zlepšení úrovně welfare chovaného skotu, prasat, ovcí a koz poražených na jatkách.

Materiál a metodika

Porovnávali jsme poškození plic mezi kategoriemi zvířat poražených na jatkách, a to pro dojnice, jalovice, býky ve výkrmu a telata vyřazovaná z chovu, dále pro prasnice, prasata ve výkrmu a selata vyřazovaná z chovu, dále pro bahnice a jehňata a dále pro kozy pro a kůzlata.

Sledování zahrnovalo velký počet zvířat získaný jako úplný soubor zvířat chovaných a poražených a prohlédnutých po poražení na jatkách v České republice v letech 2010 až 2021, tzn. jednalo se o 1 348 393 poražených dojnic, 315 406 poražených jalovic, 1 214 298 poražených býků ve výkrmu, 120 238 poražených telat vyřazených z chovu pro kondiční a nebo zdravotní důvody, 683 912 poražených prasnic, 29 628 524 poražených prasat ve výkrmu, 152 088 poražených selat vyřazených z chovu pro kondiční a nebo zdravotní důvody, 26 026 poražených ovcí, 132 553 poražených jehňat, 1 680 poražených koz a 7 690 poražených kůzlat.

Veterinární prohlídku plic po poražení vykonávali úřední veterinární lékaři, přičemž zaznamenávali počty zdravých plic a počty poškozených plic s členěním na poruchy chronické, akutní a parazitární.

Z počtu poražených zvířat a zjištěných počtů poškození plic jsme vypočítali za celé sledované období pro každou kategorii zvířat relativní počty vyjádřené v procentech.

U chronických, akutních a parazitárních poškození plic jsme zjišťovali, u kterých kategorií jatečných zvířat se vyskytuje poškození plic nejčastěji, u kterých méně často a u kterých nejméně. Z celkových počtů poškození plic jsme porovnáním jednotlivých kategorií zvířat navzájem zjišťovali, u kterých kategorií zvířat je celková míra poškození plic nejvyšší a tím je také nejhorší zdraví plic a s ním související nejhorší pohoda zvířat z pohledu zdraví a kondice plicní činnosti u jatečných zvířat.

K statistickému porovnání zjištěných počtů nálezů byl využit Chí kvadrát test.

Výsledky

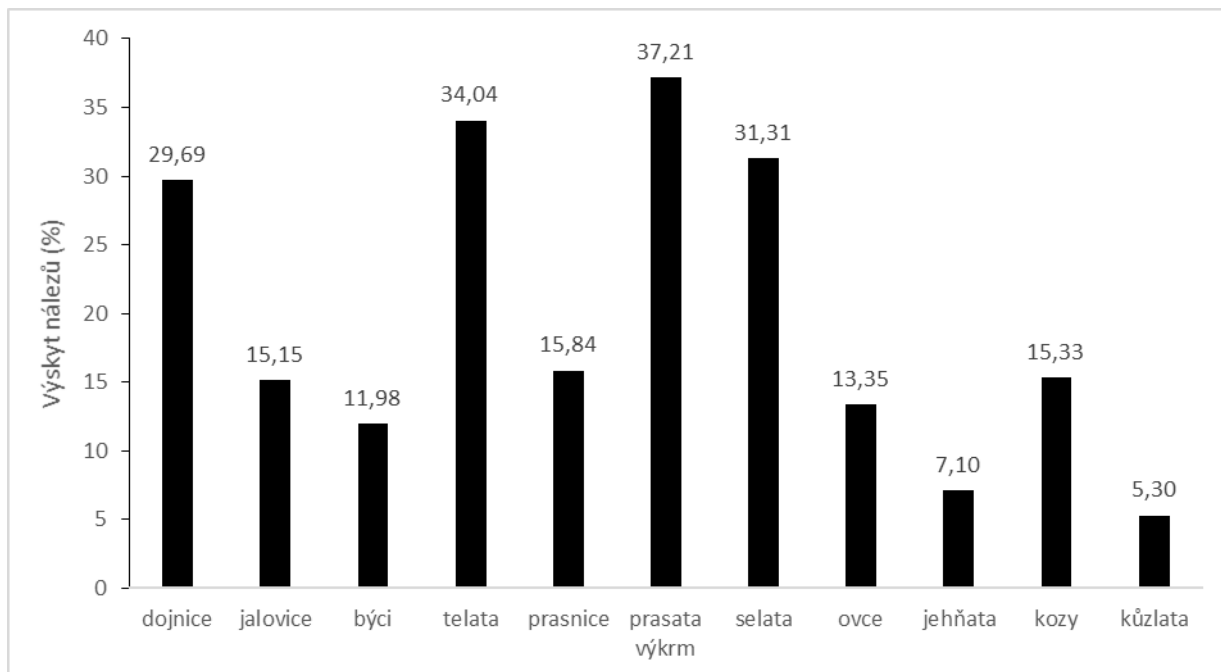
Výskyt chronického poškození plic u skotu, prasat, ovcí a koz poražených na jatkách je uveden v grafu č. 1.

Z výsledků vyplývá, že u mláďat vyřazovaných z chovu pro špatnou kondici nebo zdraví byly zjištěny velmi vysoké počty nálezů chronického poškození plic, a to u telat (34,0 %) a selat (31,3 %), tyto počty se statisticky významně ($P < 0,05$) lišily od ostatních kategorií poražených zvířat.

U vykrmovaných zvířat (býci ve výkrmu, prasata ve výkrmu, jehňata a kůzlata) je výskyt chronického poškození plic statisticky významně nejvyšší u prasat ve výkrmu (37,2 %) a následně pak u býků ve výkrmu (12,0 %) a nižší je u jehňat (7,1 %) a kůzlat (5,3 %).

U dospělých zvířat (dojnice, prasnice, ovce a kozy) je výskyt chronického poškození plic statisticky významně nejvyšší u dojnic (29,7 %) a následně pak u prasnic a koz (15,8 % a 15,3 %), mezi kterými nebyl statisticky významný rozdíl, a nejnižší je u ovcí (13,4 %).

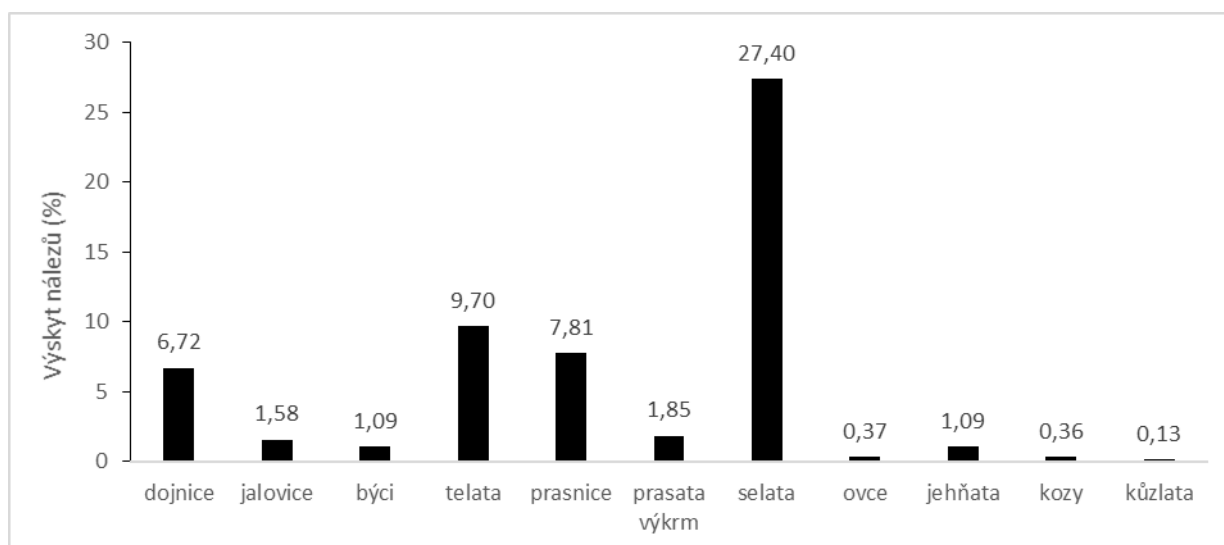
Graf č. 1. Výskyt chronického poškození plic u jednotlivých kategorií skotu, prasat, ovcí a koz poražených na jatkách



Rozdíly mezi jednotlivými kategoriemi zvířat byly statisticky významné ($P < 0,05$) s výjimkou porovnání nálezů u jalovic a koz ($P = 0,84$) a prasnic a koz ($P = 0,54$).

Výskyt akutního poškození plic u skotu, prasat, ovcí a koz poražených na jatkách je uveden v grafu č. 2.

Graf č. 2. Výskyt akutního poškození plic u jednotlivých kategorií skotu, prasat, ovcí a koz poražených na jatkách

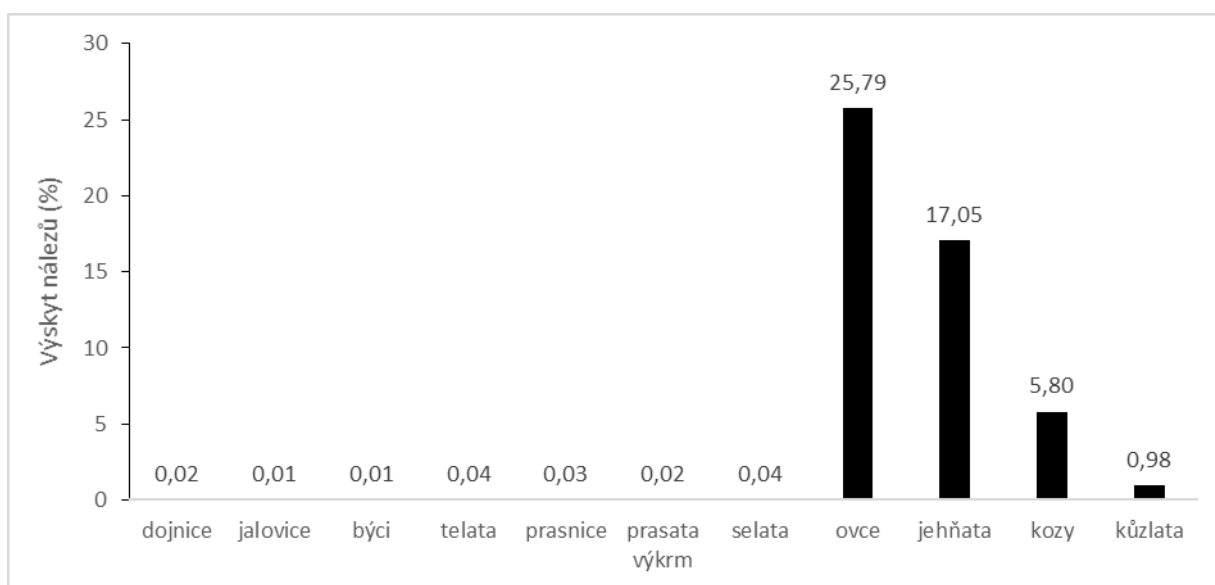


Rozdíly mezi jednotlivými kategoriemi zvířat byly statisticky významné ($P < 0,05$) s výjimkou porovnání nálezů u býků a jehňat ($P = 0,97$) a ovcí a koz ($P = 0,91$).

Z výsledků vyplývá, že nejvyšší počty nálezů akutního poškození plic byly zjištěny u selat (27,4 %) a telat (9,7 %), u kterých byl výskyt nálezů statisticky významně ($P < 0,05$) vyšší ve srovnání s ostatními kategoriemi porážených zvířat.

Výskyt parazitárního poškození plic u skotu, prasat, ovcí a koz porážených na jatkách je uveden v grafu č. 3.

Graf č. 3. Výskyt parazitárního poškození plic u jednotlivých kategorií skotu, prasat, ovcí a koz porážených na jatkách



Rozdíly mezi jednotlivými kategoriemi zvířat byly statisticky významné ($P < 0,05$) s výjimkou porovnání nálezů u dojnic a prasnic ($P = 0,56$), dojnic a prasat ve výkrmu ($P = 0,92$), jalovic a býků ve výkrmu ($P = 0,28$), telat a selat ($P = 0,55$), prasnic a prasat ve výkrmu ($P = 0,43$).

Z výsledků vyplývá, že nejvyšší počty nálezů parazitárního poškození plic byly zjištěny u ovcí (25,8 %) a následně u jehňat (17,1 %), u kterých byly počty nálezů statisticky významně vyšší ($P < 0,05$) ve srovnání se všemi ostatními kategoriemi porážených zvířat.

Vysoké počty parazitárního poškození plic byly zjištěny také u koz (5,8 %) a u kůzlat (1,0 %), u kterých byly počty nálezů významně vyšší ($P < 0,05$) ve srovnání se skotem a prasaty.

Výskyt parazitárního poškození plic u skotu a prasat byl statisticky významně nižší (nepřekračoval 0,05 %) ve srovnání s nálezy parazitárního poškození u ovcí, jehňat, koz a kůzlat.

Rozdíly mezi chronickými, akutními a parazitárními nálezy u jednotlivých kategorií zvířat byly statisticky významné ($P < 0,01$).

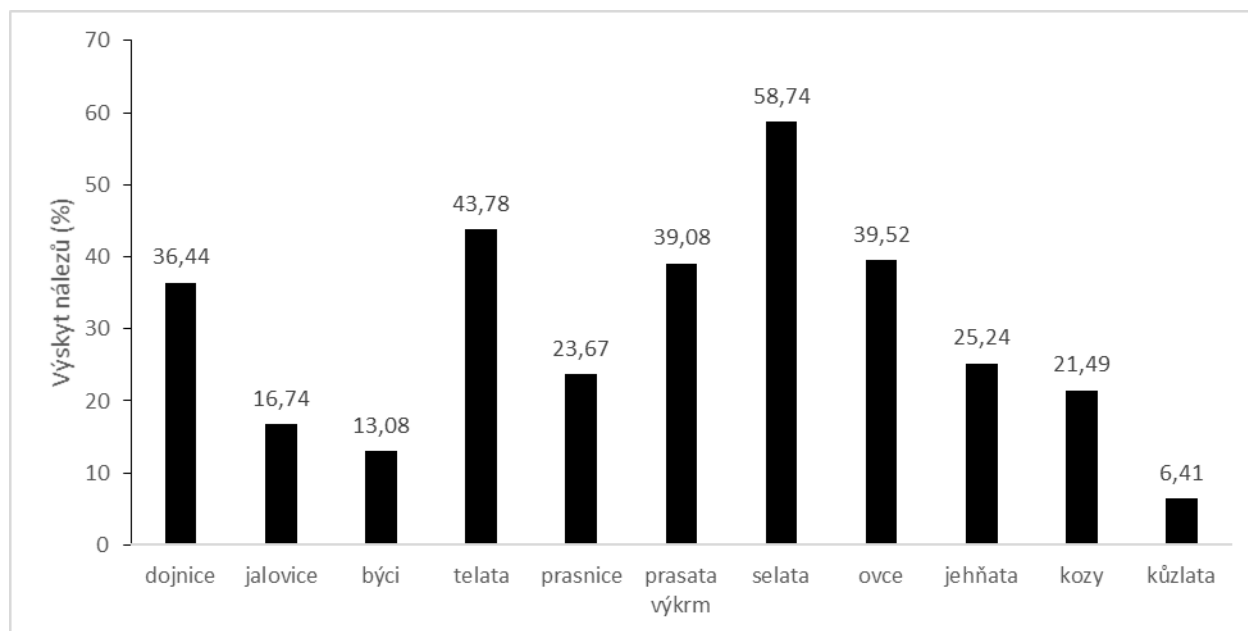
Porovnáním úrovně poškození plic uvedených v grafu č. 1, č. 2, č. 3 výskytu nálezů chronických, akutních a parazitárních změn u skotu a prasat, zjišťovaných na jatkách je zřejmé, že úroveň nálezů poškození plic u všech kategorií porážených prasat a skotu je nejvyšší pro chronická poškození, poté pro akutní poškození a nejnižší pro parazitární poškození.

U ovcí a jehňat je nejvyšší výskyt parazitárních poškození plic, po té chronických a následně akutních.

U koz a kůzlat je nejvyšší výskyt chronických poškození plic, po té parazitárních a následně akutních. Výskyt poškození plic celkem u skotu, prasat, ovcí a koz porážených na jatkách je uveden v grafu č. 4.

Z výsledků vyplývá, že celkově nálezy na plicích u porážených kategorií skotu, prasat, ovcí a koz jsou velmi vysoké, pohybují se v rozmezí 6,4 % (kozy) až do 58,7 % (selata).

Graf č. 4. Výskyt všech poškození plic celkem u jednotlivých kategorií skotu, prasat, ovcí a koz porážených na jatkách



Rozdíly mezi jednotlivými kategoriemi zvířat byly statisticky významné ($P < 0,05$) s výjimkou porovnání počtu nálezů u prasat ve výkrmu a ovcí ($P = 0,15$).

Diskuze

Z analýzy počtu nálezů na plicích vyplývá, že u mláďat vyřazovaných z chovu (telata, selata) byly zjištěny velmi vysoké počty nálezů chronického poškození plic, tyto počty se statisticky významně lišily od ostatních kategorií porážených zvířat. Toto zjištění odpovídá skutečnosti, že z chovu vyřazovaná mláďata pro špatnou kondici anebo zdraví mají různé stupně zasažení plic chronickými záněty. Používané technologie odchovu telat a selat často vykazují nedostatky ve smyslu špatné podlahy a nebo podestýlky, průvanu, nemožnosti se zahřát, nebo nízké teploty okolí při snížené termoregulaci zvířat vedoucí k podchlazení zvířat a následným zánětům plic, které s ohledem na dlouhodobé působení nedostatků v chovu přechází u zvířat do chronických stavů poškození plic. Chronické záněty plic ovlivňují celkové zdraví, a zvířata tak vykazují nižší přírůstky, které jsou příčinou jejich eliminace z chovu. Dysfunkce v dýchání a kašel provázející chronické záněty plic významně ovlivňují pohodu telat i selat v chovech.

Velmi vysoký výskyt chronického poškození plic u prasat ve výkrmu ve srovnání s ostatními vykrmovanými kategoriemi zvířat je dán pravděpodobně technologií chovu v uzavřeném prostoru s vysokou koncentrací zvířat umožňující snadný přenos onemocnění mezi zvířaty a druhově vysokou citlivostí prasat na respirační onemocnění, zpravidla infekčního původu. Negativním faktorem může být také zvýšená prašnost v chovech daná krměním sypkými směsmi a tím působící negativně na dýchací aparát a zvyšující jeho citlivost k infekčním onemocněním. Tyto faktory podporují šíření respiračních onemocnění v chovech pro výkrm prasat a rozvoj dlouhodobých zánětů plic u velkého počtu zvířat projevující se na jatkách vysokým podílem zvířat s chronickými nálezy poškození plic.

Januskeviciene et al. (2010), kteří analyzovali výskyt patologických nálezů u jatečných zvířat porážených na jatkách v Litvě v letech 2000 až 2009, zjistili, že nálezy na plicích se vyskytovaly u 70,4 % porážených klinicky zdravých prasat. Vysoký výskyt nálezů na plicích u prasat odpovídá zjištěním jiných studií, podle kterých jsou patologické nálezy na plicích nejčastěji diagnostikovanou patologií u prasat při post-mortem prohlídce (Hanson et al., 2000; Osborne et al., 1981; Wilson et al., 1986). Na výskyt patologických nálezů na plicích prasat upozorňují také Köfer et al. (1993) a Schuh et al. (2000) v Rakousku.

Býci ve výkrmu nejsou odchováni v uzavřeném prostoru a také druhová citlivost na respirační onemocnění není tak vysoká jako u prasat. S ohledem na způsob chovu a krmení býků ve výkrmu je tak výskyt chronických onemocnění výrazně nižší než u prasat ve výkrmu. Jehňata jsou odchována na pastvách, kde faktory působící na šíření respiračních onemocnění jsou omezeny a výskyt chronických poškození plic u jehňat je tak výrazně nižší než u prasat ve výkrmu a nebo býků ve výkrmu. Obdobně je tomu i u kůzlat, která jsou odchována s vysokým podílem přirozené pastvy.

U dospělých zvířat (dojnice, prasnice, ovce a kozy) byl zjištěn nejvyšší výskyt poškození plic u dojníc (20,7 %) a následně pak u prasnic a koz (15,8 % a 15,3 %) a nejnižší byl u ovcí (13,4 %). Tyto výsledky jsou poměrně překvapivé. Způsob chovu dojníc ve smyslu volného ustájení ve velkých skupinách v kryté hale by neměl vést k výrazně vyšším počtům nálezů u dojníc ve srovnání s prasnicemi, u kterých naopak chov v uzavřených halách s vysokou koncentrací zvířat a citlivostí prasat na respirační onemocnění by dával předpoklad k vyšším počtům nálezů chronických poškození plic. Vysvětlením vysokého výskytu chronických poškození plic u dojníc ve srovnání s prasnicemi snad může být vyšší délka života dojníc ve srovnání s prasnicemi zvyšující pravděpodobnost chronického onemocnění plic u dojníc, a dále vyšší péče o prasnice a jejich zdraví v chovu, protože reprodukční potenciál prasnic je výrazně vyšší než u dojníc a nemoc a nebo ztráta každé prasnice významně snižuje ekonomiku chovu.

U koz a ovcí je výskyt chronického poškození plic nižší než u dojníc, kdy pastevní chov ovcí a koz mimo haly ve volné přírodě umožňuje zvířatům regulovat prostředí podle jejich pohody a tím snížit možnost podchlazení zvířat s následným dopadem na zánět plic, navíc některé nálezy na plicích chronického původu mohou být původu parazitárního s překonáním invaze zvířetem, a tak hodnota počtu chronických nálezů na plicích u ovcí a koz může být ve skutečnosti nižší, což by bylo odpovídající.

Výskyt nejvyššího počtu nálezů akutního poškození plic u selat (27,4 %) a telat (9,7 %) ve srovnání s ostatními kategoriemi porážených zvířat odpovídá skutečnosti, že z chovu vyřazovaná mláďata pro špatnou kondici a nebo zdraví mají v kategorii selat i telat různé stupně zasažení plic akutními záněty, které ovlivňují celkové zdraví, a proto vykazují nižší přírůstky, které jsou příčinou jejich eliminace z chovu. Akutní poškození plic s klinickými projevy nejčastěji zvýšené teploty, různého stupně apatie, ztíženého dýchání, kašle nebo i subklinickými projevy významně ovlivňují welfare zvířat.

Nálezy parazitárního poškození plic byly u prasat a skotu nízké a nepřekračovaly 0,05 %. Naopak vysoký výskyt nálezů parazitárního poškození plic byl zjištěn u ovcí (25,8 %) a jehňat (17,1 %), u kterých se jednalo o nejčastější typ nálezů poškození plic na rozdíl od prasat, skotu a koz, u kterých byly častější nálezy chronického poškození plic. Zjištěné výsledky odpovídají skutečnosti, že ovce a jehňata jsou odchována na pastvách, kde dochází k invazi plicnívek a k následnému poškození plic, přičemž u ovcí s ohledem na věk ve srovnání s jehňaty je problém zasažení plic parazitární invazí plicnívek vyšší. U koz je odchov kombinací pastvy a chovu koz v hospodářstvích, invaze plicnívkami je tak výrazně nižší než u ovcí, přičemž u koz s ohledem na věk je opět ve srovnání s kůzlaty tento problém výraznější. Tomu odpovídají nižší počty parazitárního poškození plic zjištěné u koz (5,8 %) a kůzlat (1,0 %). Parazitární poškození plic je spojeno s klinickými projevy ztíženého dýchání a kašle, tyto zdravotní poškození významně ovlivňují kondici a přirozené chování zvířat, a tak snižují významně dobré životní podmínky ovcí, jehňat, a také koz a kůzlat.

Celkově nálezy na plicích u porážených kategorií skotu, prasat, ovcí a koz jsou velmi vysoké a dokládají skutečnost, že pohoda jatečných zvířat by měla být zvýšena cílenou péčí o zdraví zvířat směřující k snížení výskytu onemocnění plic.

Závěr

U vykrmovaných zvířat (býci ve výkrmu, prasata ve výkrmu, jehňata a kůzlat) byl výskyt poškození plic statisticky významně nejvyšší u prasat ve výkrmu (39,08 %) a následně pak u jehňat (25,2 %), nižší je u býků ve výkrmu (13,1 %) a kůzlat (6,4 %).

U dospělých zvířat (dojnice, prasnice, ovce a kozy) byl výskyt poškození plic statisticky významně nejvyšší u ovcí (39,5 %), následně pak u dojníc (36,4 %), nižší byl u prasnic (23,7 %) a koz (21,5 %).

Pro chronické poškození plic výsledky ukázaly statisticky významně nejvyšší výskyt u prasat ve výkrmu (37,2 %) a mláďat vyřazovaných z chovu (telata 34,0 %, selata 31,3 %).

Pro akutní poškození plic výsledky ukázaly statisticky významně nejvyšší výskyt u selat (27,4 %) a telat (9,7 %) ve srovnání s ostatními kategoriemi porážených zvířat. U dojnic a prasníc se nálezy pohybovaly přibližně mezi 6 % až 8 %, u ostatních kategorií nepřekročily 2 %.

U parazitárního poškození plic byly zjištěny statisticky nejvyšší nálezy u ovcí (25,8 %) a následně u jehňat (17,1 %), následně u koz (5,8 %) a dále u kůzlat (1,0 %). Výskyt parazitárního poškození plic u skotu a prasat nepřekračoval 0,05 %.

Rozdíly mezi chronickými, akutními a parazitárními nálezy u jednotlivých kategorií zvířat byly statisticky významné.

Nálezy poškození plic dokládají skutečnost, že pohoda jatečných zvířat není odpovídající a měla by být zvýšena. Zlepšením zdraví plic v chovech jatečných zvířat by bylo možné dosáhnout významného zvýšení úrovně pohody u všech kategorií zvířat chovaných pro následnou porážku na jatkách.

Tato práce byla financována ITA VETUNI (projekt č. 2022ITA21).

Literatura

Ceccarelli, M., Leprini, E., Sechi, P., Iulietto, M.F., Grispoli, L., Goretti, E., Cenci-Goga, B.T. 2018. Analysis of the causes of the seizure and destruction of carcasses and organs in a slaughterhouse in central Italy in the 2010-2016 period. *Italian Journal of Food Safety* 7: 6899.

Hansson, I., Hamilton, C., Ekman, T., Forslund, K. 2000. Carcass quality in certified organic production compared with conventional livestock production. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 47: 111-120.

Huneau-Salaun, A., Stark, K.D.C., Mateus, A., Lupo, C., Lindberg, A., Le Bouquin-Leneveu, S. 2015. Contribution of meat inspection to the surveillance of poultry health and welfare in the European Union. *Epidemiology & Infection* 143: 2459-2472.

Januskeviciene, G., Paulauskas, V., Dailidaviciene, J., Juozaitiene, V. 2010. Analysis of pathologic lesions in the livestock and poultry slaughtered in the meat establishments of Lithuania. *Veterinarija ir Zootechnika* 52: 33-42.

Köfer, J., Awad-Masalmeh, M., Thiemann, G. 1993. Der Einfluß von Haltung, Management und Stallklima auf die Lungenveränderungen bei Schweinen. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 100: 319-322.

Osborne, A.D., Saunders, J.R., K-Sebunya, T. 1981. An abattoir survey of the incidence of pneumonia in Saskatchewan swine and an investigation of the microbiology of affected lungs. *Canadian Veterinary Journal* 22: 82-85.

Schuh, M., Köfer, J., Fuchs, K. 2000. Installation of an information feedback system for control of animal health - frequency and economical effects of organ lesions in slaughtered pigs. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 87: 40-48.

Stark, K.D.C. 2017. Abattoir condemnation data remain underused in decision making. *Veterinary Record* 180: 514-515.

Stark, K.D.C., Alonso, S., Dadios, N., Dupuy, C., Ellerbroek, L., Georgiev, M., Hardstaff, J., Huneau-Salaun, A., Laugier, C., Mateus, A., Nigsch, A., Afonso, A., Lindberg, A. 2014. Strengths and weaknesses of meat inspection as a contribution to animal health and welfare surveillance. *Food Control* 39: 154-162.

Wilson, M.R., Takov, R., Friendship, R.M., Martin, S.W., McMillan, I., Hacker, R.R., Swaminathan S. 1986. Prevalence of respiratory diseases and their association with growth rate and space in randomly selected swine herds. *Canadian Journal of Veterinary Research* 50: 209-216.

Hodnocení změny povrchové teploty a koncentrace slinného kortikosteronu u králíků domácích v závislosti na hustotě a kontaktu s dalšími jedinci v přepravních kontejnerech

Gabriela Kadlecová¹, Monika Šebánková¹, Jan Chloupek², Lucie Hostovská¹, Lucia Kotianová¹, Eva Voslášková¹, Vladimír Večerek¹

¹ Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI,

² Ústav farmakologie a farmacie, FVL VETUNI

Abstrakt

Králíci domácí jsou obvykle přepravováni v přepravních kontejnerech, kde na zvířata působí celá řada stresových faktorů souvisejících s manipulací, omezeným prostorem a pohybem a kontaktem s cizími jedinci. Za účelem sledování dopadu různých podmínek přepravy byla hodnocena stresová reakce u králíků v přepravních kontejnerech v závislosti na tom, zda zvířata mají větší prostor k pohybu a nejsou v kontaktu s dalšími jedinci (individuální přeprava) nebo jsou přepravována společně (skupinová přeprava). Zatímco hladina kortikosteronu ve slinách se významně ($p < 0,05$) nelišila mezi skupinami ani mezi jednotlivými měřeními v průběhu umístění v kontejneru, povrchová teplota vnitřního koutku oka se u králíků při skupinovém umístění v přepravním kontejneru významně zvýšila ($p < 0,05$) z výchozí hodnoty 37,33 °C (před umístěním do kontejneru) na 39,31 °C naměřených po 40 minutách v přepravních kontejnerech a byla také významně ($p < 0,05$) vyšší než u králíků umístěných v kontejneru po stejně dlouhou dobu individuálně.

Úvod

Králík domácí je chován k produkci masa nebo také jako laboratorní zvíře. Intenzivní chov je spojen s celou řadou faktorů ovlivňujících jejich welfare. Jedním z hlavních faktorů je přeprava mezi těmito chovy nebo na jatka (Buil et al., 2010), která je spojena s manipulací, výskytem zranění, omezeným pohybem a nevhodnou teplotou prostředí nebo hlukem, na který mohou být králíci vysoce citliví (Nielsen et al., 2019; Abioja et al., 2021; Nayfield and Besch, 1981). Přeprava začíná procesem nakládky, kdy je potřeba zajistit, že nakládána jsou pouze zvířata způsobilá k přepravě. Samotná nakládka může ovlivnit nejen welfare zvířat, ale také kvalitu masa (Coppings et al., 1989) a mít tak negativní dopad na ekonomický zisk. Významným faktorem ovlivňujícím welfare králíků při transportu je také délka přepravy (Luzi et al., 1992) a velikost transportních kontejnerů a hustota osazení (Lambertini et al., 2006). V České republice se obvykle přepravují na jatka králíci ve věku 8 – 10 týdnů, při porážkové hmotnosti 2,5 – 2,9 kg (Volek, 2022). V současné době legislativa neupřesňuje technické požadavky pro transportní kontejnery a ani hustotu osazení kontejneru, v literatuře je uváděno rozmezí 130 – 160 cm²/kg živé hmotnosti (Verga et al., 2009; de la Fuente et al., 2004). Z analýzy EFSA vyplývá, že v Evropské unii se obvykle využívají plastové přepravní boxy, které se používají také pro přepravu drůbeže (Nielsen et al., 2022).

Přes zvýšenou pozornost věnovanou hodnocení úrovně welfare hospodářských zvířat chovaných intenzivním způsobem, sledování welfare brojlerových králíků je dosud omezené. Dalmau et al. (2020) se zaměřili na využití protokolů v oblasti welfare chovaných králíků, nicméně ten se zabývá pouze králíky umístěnými na farmách s důrazem na krmivo, prostor ustájení a zdraví zvířat a nelze jej využít při přepravě. Doporučení, která lze uplatnit při hodnocení welfare zvířat při přepravě v kontejnerech, zahrnujících také králíky, vydala EFSA v roce 2022 (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2022). Zaměřuje se na proces přípravy zvířat na nakládku a nakládku samotnou, cestu a příjezd na místo určení a vykládku a posouzení mnoha vlivů jako je stres, rizika zranění, smyslová stimulace, vlivy okolní teploty, přítomnost hladu a žízně a dalších.

V současnosti vzrůstá tlak na vývoj inovativních metod hodnocení welfare zvířat spojenými se snahou zjistit, jaké faktory a jakým způsobem na zvířata během přepravy působí, a to například hodnocením přítomnosti akutní stresové reakce. Jsou vyvíjeny metody neinvazivního hodnocení stresu, kdy jsou

zvířata minimálně ovlivněna manipulací, fixací a bolestí v souladu se zachováním dobrých životních podmínek zvířat i během sběru dat při jejich hodnocení. Stres lze neinvazivně hodnotit prostřednictvím stanovení hladiny glukokortikoidních hormonů ve slinách zvířat či trusu (Prola et al., 2013; Munari et al., 2020). Další rozvíjenou metodou je také využití infračervené termografie, kde se jedná o zcela bezkontaktní metodu, kdy je zvíře snímáno termokamerou z větší vzdálenosti a nedochází k žádnému kontaktu ze strany osoby, která sbírá data o jedinci. Snímky získané z termokamery umožňují zjistit hodnotu povrchové teploty zvířete a její změny v souvislosti s akutní stresovou reakcí, která byla dokázána u více druhů hospodářských, zájmových i volně žijících zvířat (Jerem et al., 2018; Ludwig et al., 2010; Luzi et al., 2007; Travain et al., 2015). Stanovení kortikosteronu ve slinách, tedy dominantního stresového hormonu u králíků, se doposud věnovala jediná studie autorů Munari et al. (2020).

Cílem práce bylo zjistit, jak umístění králíků v transportních kontejnerech simulující nákladku před přepravou ovlivňuje změnu povrchové teploty vnitřního koutku oka a hladinu kortikosteronu ve slinách králíků v souvislosti s tím, zda jsou zvířata umístěna v jedné přepravní bedně s větší hustotou zvířat omezující jejich pohyb nebo samostatně s větším prostorem a bez kontaktu s jinými králíky.

Materiál a metodika

Zvířata

Pro účely hodnocení stresu u králíků v důsledku umístění v transportních kontejnerech bylo vybráno 7 králíků domácích hybridu HYLEA (Farma Kočárovi s.r.o., Jaroměřice nad Rokytnou). Jednalo se o samice chované v laboratorním zařízení, krmené ad libitum kompletní krmnou směsí (Biokron, Blučina) a napájené ad libitum, ustájené samostatně v nerezových koticích s vizuálním, čichovým i hlasovým kontaktem s ostatními jedinci v chovu. Teplota v ustájecím prostředí byla 20 °C a relativní vlhkost vzduchu 45,6 %.

Sběr vzorků

Králíci byli náhodně rozděleni do skupiny Individuální přeprava (3 králíci) a Skupinová přeprava (4 králíci). Všech 7 králíků bylo nejdříve snímáno ve svém ustájení termokamerou a poté všem byl v krátkém sledu odebrán vzorek slin po odchyty a fixaci (výchozí hodnota). Následně byli králíci umístěni do přepravních boxů o velikosti 72 x 49 x 25 cm a to tak, že králíci v rámci individuální přepravy měli pro sebe plochu odpovídající polovině transportního kontejneru a byli od ostatních králíků odděleni tak, aby mezi sebou neměli vizuální kontakt. Králíci ze skupinové přepravy byli umístěni společně do jednoho transportního kontejneru. Po 20 minutách bylo opakováno snímání termokamerou v přepravních boxech a odběr slin (Měření 1) a po dalších 20 minutách se proces snímání termokamerou i odběr slin opakoval (Měření 2).

K získání vzorku slin byly využity zkumavky Salivette (Sarstedt, Nümbrecht, Německo), které byly upevněny v peanu a vloženy králíkovi do tlamy, kde jej 60 – 90 sekund žvýkal. Vzorky byly okamžitě po odebrání umístěny přechodně do termotašky s chladicími deskami a bezprostředně po ukončení všech odběrů centrifugovány (6 000 otáček/min). Vzorek slin byl poté přesunut do zkumavek Eppendorf pro další použití. Pro detekci kortikosteronu ve slinách králíků byl využit kit Corticosterone Competitive ELISA Kit (ThermoFisher Scientific, Česká republika) s citlivostí 18,6 pg/ml a detekčními limity 78,125 – 10 000 pg/ml. Hodnocení bylo provedeno na kalorimetrickém snímači při vlnové délce 450 nm a výsledky byly odečteny z křivky navržené v software Arigo's ELISA calculator (www.arigobio.com).

Data o povrchové teplotě byla získána s využitím termokamery testo 890-2 (Testo SE & Co. KGaA, Německo). Termokamera měla parametry obrazu 640x480 pixelů, senzitivu < 0,04 °C a rozmezí teploty -30 až 100 °C. Emisivita byla nastavena na hodnotu 0,97. Snímky byly pořizovány v pravém úhlu ke hlavě králíka ze vzdálenosti cca 0,5 metru, zvířata se po celou dobu sběru dat nacházela ve stejných podmínkách prostředí. U všech králíků byla odečtena povrchová hodnota vnitřního koutku oka jako maximální hodnota povrchové teploty v dané oblasti v programu IRSoft (Testo SE & Co. KGaA, Německo).

Statistické vyhodnocení

Ke statistickému zpracování byl využit program UNISTAT 6.5 for Excel (Unistat Ltd., London, UK). Pro porovnání koncentrace kortikosteronu ve slinách a povrchové teploty vnitřního koutku oka králíků umístěných v kontejneru individuálně a skupinově a mezi jednotlivými měřeními byla využita ANOVA a Tukey-HSD test. Hladina pravděpodobnosti $p < 0,05$ byla u všech testů stanovena jako statisticky významná.

Výsledky

Srovnání hladiny kortikosteronu ve slinách králíků přepravovaných individuálně a skupinově zjištěné při jednotlivých měřeních zobrazuje tabulka č. 1. V případě hladiny kortikosteronu ve slinách nebyl prokázán rozdíl ($p > 0,05$) v rámci skupiny individuálně nebo skupinově přepravovaných králíků a rovněž nebyl prokázána rozdíl ($p > 0,05$) mezi králíky v rámci jednotlivých měření (výchozí hodnota, měření 1 a měření 2).

Tabulka č. 1. Srovnání hladiny kortikosteronu ve slinách králíků umístěných v přepravních kontejnerech individuálně a skupinově zjištěné při jednotlivých měřeních (výchozí hodnota, měření 1 po 20 min v přepravním kontejneru, měření 2 po 40 min v přepravním kontejneru)

| Měření | Kortikosteron (pg/ml) | |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Individuální přeprava | Skupinová přeprava |
| Výchozí hodnota | 488,42 ^{a,x} | 554,00 ^{a,x} |
| Měření 1 | 784,46 ^{a,x} | 944,60 ^{a,x} |
| Měření 2 | 845,57 ^{a,x} | 760,49 ^{a,x} |

^a Hodnoty se stejným indexem v rámci stejného řádku indikují statisticky nevýznamný ($p > 0,05$) rozdíl

^x Hodnoty se stejným indexem v rámci stejného sloupce indikují statisticky nevýznamný ($p > 0,05$) rozdíl

U povrchové teploty vnitřního koutku oka králíků bylo zjištěno, že králíci umístění v kontejneru ve skupině měli při snímání po 40 min umístění v kontejneru (Měření 3) významně vyšší ($p < 0,05$) hodnoty povrchové teploty než byla hodnota teploty u těchto králíků před umístěním do přepravního kontejneru (Výchozí hodnota). Rovněž byla povrchová teplota u králíků umístěných v kontejneru ve skupině po dobu 40 minut významně ($p < 0,05$) vyšší než u králíků umístěných v přepravním kontejneru individuálně (tabulka č. 2).

Tabulka č. 2. Srovnání povrchové teploty vnitřního koutku oka králíků umístěných v přepravních kontejnerech individuálně a skupinově zjištěné při jednotlivých měřeních (výchozí hodnota, měření 1 po 20 min v přepravním kontejneru, měření 2 po 40 min v přepravním kontejneru)

| Měření | Povrchová teplota (°C) | |
|------------------------|------------------------|------------------------|
| | Individuální přeprava | Skupinová přeprava |
| Výchozí hodnota | 37,76 ^{a,x} | 37,33 ^{a,x} |
| Měření 1 | 37,77 ^{a,x} | 38,31 ^{a,x,y} |
| Měření 2 | 37,36 ^{b,x} | 39,31 ^{a,y} |

^{a,b} Hodnoty s rozdílným indexem v rámci jednoho řádku indikují statisticky významný ($p < 0,05$) rozdíl

^{x,y} Hodnoty s rozdílným indexem v rámci jednoho sloupce indikují statisticky významný ($p < 0,05$) rozdíl

Diskuze

Přeprava je pro králíky vždy stresující, jejich stresové zatížení může ovlivnit také velikost prostoru v přepravním kontejneru a přítomnost jiných králíků. Přestože jsou králíci druhem žijícím ve skupinách, nevhodně složená nebo příliš velká skupina může vyvolat zvýšenou agresi mezi zvířaty nebo jiné poruchy chování (Gerencsér et al., 2019). U králíků, kteří byli ustájeni samostatně, a i přes vizuální a čichový kontakt dříve nepřišli do přímého kontaktu s jinými králíky, může přemístění do transportních kontejnerů mít také vliv na jejich chování a akutní stresovou reakci obdobně jako uzavření do omezeného prostoru v kontextu s neznámou situací. V souvislosti s přepravou a kontaktem s neznámými jedinci de la Fuente et al. (2007) zjistili u králíků zvýšenou aktivitu kreatininkinázy.

Detekce kortikosteronu, který je u králíků dominantním stresovým glukokortikoidem (Palme, 2019), je možná nejen v krvi, ale také ze vzorků moči či trusu, které lze odebrat neinvazivně. Studií, ve kterých byly sledovány změny v hladině kortikosteronu ve slinách králíků v důsledku stresu je však dosud omezené množství. Munari et al. (2020) zjistili u králíků při stresové situaci ve slinách 1 036 – 2 929 ng/ml kortikosteronu. Více studií se zabývalo hodnocením kortikosteronu v krvi králíků, kde je jako referenční hodnota uváděna hladina 15 200 pg/ml (Schoemaker and van Zeeland, 2021), přičemž se předpokládá, že sliny obsahují zhruba 10 % kortikosteronu obsaženého v krvi (Fell et al., 1985; Fell and Shutt, 1986; Schoemaker and van Zeeland, 2021). Tomu odpovídají hodnoty naměřené v naší studii u králíků před umístěním do přepravních kontejnerů (výchozí hodnota), u kterých se hladina kortikosteronu ve slinách pohybovala okolo 525,89 pg/ml.

Při transportu na králíky působí také další faktory, například vnější teplota v souvislosti s ročním obdobím, kdy jsou králíci přepravováni. Accorsi et al. (2017) stanovovali hladinu kortizolu a glukózy v séru při přepravě králíků a zjistili vyšší hodnoty bez ohledu na roční období. Naopak De La Fuente et al. (2004) zjistili významný nárůst sledovaných ukazatelů v závislosti na ročním období a nezjistili významný nárůst ukazatelů stresu v souvislosti s hustotou osazení v přepravních kontejnerech nebo teplotou, nicméně doba přepravy sledovaná v jejich studii byla krátká (1 hodina a 20 minut). Hladinu kortikosteronu v krvi při přepravě hodnotili Mazzone et al. (2010) a zjistili dvojnásobný nárůst při měření před transportem a po něm (6,23 ng/ml a 14,88 ng/ml). Výsledky publikovaných studií jsou nejednotné, lze předpokládat, že roli hrály odlišné podmínky sledování. V naší studii nebyl zjištěn nárůst hladiny kortikosteronu ve slinách při srovnání hodnot naměřených před umístěním do přepravního kontejneru a hodnot naměřených po 20 ani po 40 minutách umístění v kontejneru. To však nemusí znamenat absenci stresu, ale může být důsledkem manipulace s králíky nezbytné pro odběr vzorků slin, které byli vystaveni všichni králíci. Poměrně krátká doba sledování pak nemusela být dostatečná k tomu, aby se odlišné stresové zatížení v důsledku odlišných podmínek v kontejneru promítlo do rozdílné hladiny kortikosteronu ve slinách králíků.

Naopak při hodnocení povrchové teploty vnitřního koutku oka králíků pomocí termokamery, tedy zcela bezkontaktně, byly mezi skupinami králíků pozorovány statisticky významné rozdíly. Na přítomnost stresové reakce u králíků umístěných do přepravního kontejneru ve skupině ve srovnání s individuálním umístěním ukazuje vzestup povrchové teploty vnitřního koutku oka králíků pozorovaný v naší studii. Zvýšení povrchové teploty v důsledku stresového zatížení bylo popsáno také u mnoha jiných zvířat, v důsledku vazodilatace indukované akutní stresovou reakcí dochází k vzestupu povrchové teploty, kterou lze detekovat termokamerou (Jerem et al., 2018; Ludwig N. et al., 2010, 2010; Travain et al., 2015).

Pro přepravu králíků nejsou legislativně stanovená pravidla, která by upravovala maximální povolenou hustotu nakládky při transportu ani složení skupin v transportních kontejnerech. Výsledky naší studie ukazují, že skupinová přeprava je spojena s nárůstem povrchové teploty vnitřního koutku oka z výchozí hodnoty 37,33 °C na hodnotu 39,31 °C po 40 minutách v transportním kontejneru. Fyziologická hodnota tělesné teploty u králíků se pohybuje v rozmezí 38,3 °C – 39,4 °C a obvykle je vyšší než povrchová teplota těla, při zvýšení povrchové teploty dochází také ke zvýšení teploty jádra a dalším reakcím organismu. Při teplotním diskomfortu poté dochází ke změnám v pozici uší

(expozice do prostoru), může se vyskytovat lapání po dechu a rovněž změny polohy těla a zvýšená salivace (Abioja et al., 2021), zvýšená teplota má vliv rovněž na kvalitu masa (Astruc et al., 2002).

Závěr

Přeprava králíků je doprovázena mnoha stresovými vlivy, mezi které patří také omezení prostoru v přepravních kontejnerech při nakládce a kontakt s dalšími jedinci. Zatímco hladina kortikosteronu ve slinách se významně ($p < 0,05$) nelišila mezi skupinami ani mezi jednotlivými měřeními v průběhu umístění v kontejneru, povrchová teplota vnitřního koutku oka se u králíků při skupinovém umístění v přepravním kontejneru významně zvýšila ($p < 0,05$) z výchozí hodnoty 37,33 °C (před umístěním do kontejneru) na 39,31 °C naměřených po 40 minutách v přepravních kontejnerech a byla také významně ($p < 0,05$) vyšší než u králíků umístěných v kontejneru po stejně dlouhou dobu individuálně. Výsledky ukazují přítomnost stresové reakce, která má dopad na welfare králíků při přepravě.

Tato práce byla financována ITA VETUNI (projekt č. 2022ITA21).

Literatura

- Abioja, M.O., Johnson, T., Metwally, K.A., Farghly, M., Mahrose, K. 2021. Environmental heat stress in rabbits: implications and ameliorations. *International Journal of Biometeorology* 66: 1.
- Astruc, T., Talmant, A., Fernandez, X., Monin, G. 2002. Temperature and catecholamine effects on metabolism of perfused isolated rabbit muscle. *Meat Science* 60: 287–293.
- 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.
- Buil, T., Maria, G.A., Villarroel, M., Liste, G., Lopez, M. 2004. Critical points in the transport of commercial rabbits to slaughter in Spain that could compromise animals' welfare. *World Rabbit Science* 12: 269–279.
- Coppings, R.J., Ekhtor, N., Ghodrati, A. 1989. Effects of antemortem treatment and transport on slaughter characteristics of fryer rabbits. *Journal of Animal Science* 67: 872–880.
- Dalmau, A., Moles, X., Pallisera, J. 2020. Animal welfare assessment protocol for does, bucks, and kit rabbits reared for production. *Frontiers in Veterinary Science* 7: 1-18.
- de la Fuente, J., Diaz, M., Ibañez, M., Gonzalez de Chavarri, E. 2007. Physiological response of rabbits to heat, cold, noise and mixing in the context of transport. *Animal Welfare* 16: 41–47.
- EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), Nielsen, S.S., Alvarez, J., Bicout, D.J., Calistri, P., Canali, E., Drewe, J.A., Garin-Bastuji, B., Gonzales Rojas, J.L., Gortázar Schmidt, C., Herskin, M., Michel, V., Miranda Chueca, M.Á., Padalino, B., Roberts, H.C., Spoolder, H., Stahl, K., Viltrop, A., Winckler, C., Mitchell, M., Vinco, L.J., Voslarova, E., Candiani, D., Mosbach-Schulz, O., Van der Stede, Y., Velarde, A. 2022. Welfare of domestic birds and rabbits transported in containers. *EFSA Journal* 20: 7441.
- Fazio, F., Casella, S., Giudice, E., Giannetto, C., Piccione, G. 2015. Evaluation of secondary stress biomarkers during road transport in rabbit. *Livestock Science* 173: 106–110.
- Fell, L.R., Shutt, D.A. 1986. Adrenocortical response of calves to transport stress as measured by salivary cortisol. *Canadian Journal of Animal Science* 66: 637-641.
- Gerencsér, Z., Matics, Z., Szabó, R.T., Kustos, K., Mikó, A., Nagy, I., Odermatt, M., Atkári, T., Szendrő, Z. 2019. Aggressiveness, mating behaviour and lifespan of group housed rabbit does. *Animals (Basel)* 9: 708.
- Giannetto, C., Di Pietro, S., Falcone, A., Pennisi, M., Giudice, E., Piccione, G., Acri, G. 2021. Thermographic ocular temperature correlated with rectal temperature in cats. *Journal of Thermal Biology* 102: 103104.

- Jakubas, D., Wojczulanis-Jakubas, K., Grissot, A., Devogel, M., Cendrowska, M., Chastel, O. 2022. Eye region surface temperature and corticosterone response to acute stress in a high-arctic seabird, the little auk. *Animals* 12: 499.
- Jerem, P., Jenni-Eiermann, S., Herborn, K., McKeegan, D., McCafferty, D.J., Nager, R.G. 2018. Eye region surface temperature reflects both energy reserves and circulating glucocorticoids in a wild bird. *Scientific Reports* 8: 1907.
- Lambertini, L., Vignola, G., Badiani, A., Zaghini, G., Formigoni, A. 2006. The effect of journey time and stocking density during transport on carcass and meat quality in rabbits. *Meat Science* 72: 641–646.
- Ludwig, N., Gargano, M., Luzi, F., Carezzi, C., Verga, M. 2010. Technical note: Applicability of infrared thermography as a non invasive measurements of stress in rabbit. *World Rabbit Science* 15: 199–206.
- Luzi, F., Heinzl, E., Crimella, C., Verga, M. 1992. Influence of transport on some production parameters in rabbits. *Journal of Applied Animal Research* 15: 758–765.
- Luzi, F., Ludwig, N., Gargano, M., Milazzo, M., Carezzi, C., Verga, M. 2007. Evaluation of skin temperature change as stress indicator in rabbit through infrared thermography. *Italian Journal of Animal Science* 6: 769–769.
- Munari, C., Ponzio, P., Macchi, E., Elkhawagah, A.R., Tarantola, M., Ponti, G., Mugnai, C. 2020. A multifactorial evaluation of different reproductive rhythms and housing systems for improving welfare in rabbit does. *Applied Animal Behaviour Science* 230: 105047.
- Nayfield, K.C., Besch, E.L. 1981. Comparative responses of rabbits and rats to elevated noise. *Laboratory Animal Science* 31: 386–390.
- Nielsen, S.S., Alvarez, J., Bicout, D.J.B., Calistri, P., Klaus, D., Drewe, J., Garin-Bastuji, B., Rojas, J., Gortázar, C., Schmidt, M.V., Miranda, M.A., Sihvonen, L.H., Spooler, H., Stahl, K., Velarde, A., Viltrop, A., Buijs, S., Edwards, S., Candiani, D., Mosbach-Schulz, O., Van der Stede, Y., Winckler, C. 2019. Health and welfare of rabbits farmed in different production systems. *EFSA Journal* 18: 5944.
- Palme, R. 2019. Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. *Physiology & Behavior* 199: 229-243.
- Cornale P., Macchi E., Renna M., Prola L., Perona G., Mimosi, A. 2016. Effect of cage type on fecal corticosterone concentration in buck rabbits during the reproductive cycle. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 19 90-96.
- Schoemaker, N.J., van Zeeland, Y.R.A. 2021. Endocrine Diseases of Ferrets. In: *Ferrets, Rabbits, and Rodents*. Elsevier, pp. 77-91.
- 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.
- Verga, M., Luzi, F., Petracci, M., Cavani, C. 2009. Welfare aspects in rabbit rearing and transport. *Italian Journal of Animal Science* 8: 191–204.
- Volek, Z. 2020. Krmiva, krmné směsi a technika krmení králíků v intenzivních chovech a drobnochovech. Agrární komora České republiky, Praha.
- Weimer, S.L., Wideman, R.F., Scanes, C.G., Mauromoustakos, A., Christensen, K.D., Vizzier-Thaxton, Y. 2020. Broiler stress responses to light intensity, flooring type, and leg weakness as assessed by heterophil-to-lymphocyte ratios, serum corticosterone, infrared thermography, and latency to lie. *Poultry Science* 99: 3301-3311.

Úroveň morbidity a spektrum podaných liečív u mačiek v útulku v Českej republike

Veronika Vojtkovská¹, Michal Kaluža¹, Eva Voslášková¹, Vladimír Večerek¹, Lenka Tomečková²

¹ Ústav ochrany a welfare zvierat a verejného veterinárneho lékařství, FVHE VETUNI, ČR,

² Katedra verejného veterinárskeho lékařstva a welfare zvierat, UVELF Košice, SK

Abstrakt

Udržiavanie dobrých životných podmienok a zdravia zvierat by malo byť jednou z hlavných priorít útulkov pre mačky. Cieľom tejto štúdie bolo analyzovať úroveň morbidity a zdravotné záznamy mačiek počas pobytu v útulku v Českej republike z pohľadu charakteru a počtu podaných liečivých, resp. podporných preparátov. Predmetom štúdie boli zdravotné záznamy 1884 mačiek, ktoré boli prijaté do vybraných útulkov od 1.1.2013 do 31.12.2021 a ich pobyt v útulku bol v tomto sledovanom období zároveň ukončený. U viac ako polovice všetkých mačiek, ktorých záznamy boli analyzované, bol zistený aspoň jeden zdravotný záznam. Celková dĺžka pobytu mačiek v útulku (bez ohľadu na spôsob ukončenia pobytu), u ktorých bol zistený jeden alebo viacero zdravotných záznamov, bola významne dlhšia v porovnaní s dĺžkou pobytu mačiek bez akýchkoľvek zdravotných záznamov. Najvyšší počet zdravotných záznamov bol zistený u mláďat mladších ako 6 mesiacov. Spomedzi všetkých podávaných preparátov boli najviac používané antibiotiká, antiparazitiká a doplnkové/protektívne látky. Najčastejšie boli mačkám podávané širokospektrálne antibiotiká. Z hľadiska klasifikácie antibiotík podľa účinnej látky boli najpoužívanejšími antibiotikami penicilíny, tetracyklíny a fluorochinolóny. Antibiotiká boli v najväčšej miere využívané k liečbe ochorení súvisiacich s hornými a dolnými dýchacími cestami a ich symptómami a gastrointestinálnymi problémami. Zistenia tejto štúdie prispievajú k pochopeniu zdravotných problémov a prístupov k liečbe mačiek v útulkoch.

Úvod

Útulky predstavujú zariadenia s veľkou koncentráciou a dynamikou zvierat, čo je z epidemiologického pohľadu predispozičný faktor k rozvoju zdravotných problémov (Dean et al., 2018). Podobne z etologického pohľadu neprispieva zvýšená koncentrácia zvierat k rozvoju dobrých životných podmienok u druhov, ktoré za normálnych okolností vedú samotársky spôsob života. Prostredie útulku je pre množstvo mačiek stresujúcim miestom (Grant a Warrior, 2019) v dôsledku výskytu nových podnetov a celkovo nedostatočnej kontroly nad prostredím (Amat et al., 2016). Stres sa vo významnej miere podieľa na zvyšovaní morbidity zvierat, znižuje obranyschopnosť organizmu (Tanaka et al., 2016) a je spájaný s rozvojom príznakov gastrointestinálnych problémov (Stella et al., 2011). Stres sa uplatňuje aj v prípade rozvoja idiopatickej cystitídy (Buffington, 2011) a dermatologických problémov (Koblenzer, 1999). Nájdená bola i súvislosť rozvoja diabetu a obezity s inaktivitou (Scarlett et al., 1994; Slingerland et al., 2009), ktorou je stres u mačiek často manifestovaný (Koblenzer, 1999). V priebehu pobytu v útulku sa zhoršenie stavu v aspoň jednom zo sledovaných zdravotných indikátorov týkalo až 41,6 % mačiek (Vojtkovská et al., 2021).

Úroveň morbidity v útulku súvisí s dvoma skupinami faktorov. V prvom prípade sa jedná o aspekty, ktorých regulácia je do určitej miery možná, keďže súvisia s prostredím útulku (typom ustajnenia mačiek, členením ustajňovacích priestorov a ich vybavením) a uplatňovaním protinákazových opatrení (zavedenie preventívnych asanačných stratégií vedúcich k účinnému odstraňovaniu patogénov z prostredia, umiestňovanie prijatých jedincov do karantény, izolácia jedincov s príznakmi ochorenia, úroveň poskytovanej veterinárnej starostlivosti). Udržiavanie populácie v dobrej kondícii by malo patriť medzi hlavné priority útulkov, keďže dobrý zdravotný stav zvierat je faktor, ktorý zvyšuje ich adopčný potenciál (Weng a Hart, 2012; Peng et al., 2012; Vitulova et al., 2019) a tým skracuje ich pobyt v útulku. Kvalita poskytovanej veterinárnej starostlivosti v útulku súvisí s kapacitou útulku, typom útulku, finančnými možnosťami, dostatkom spôsobilého personálu,

vybavením a ďalšími faktormi; jej úroveň sa teda môže medzi zariadeniami výrazne líšiť (Horecka a Neal, 2022).

Do druhej skupiny faktorov súvisiacich s morbiditou patria faktory ovplyvniteľné zariadením len do malej miery, pretože súvisia s individuálnou históriou a stavom do útulku prijímaných jedincov. Ako uvádzame v nedávnej štúdií (Vojtkovská et al., 2021), zhoršený zdravotný stav sa týkal až 54,5 % do útulku prijímaných jedincov. Podľa štúdie od Marston a Bennett (2009) vykazovala polovica všetkých prijatých mačiek príznaky infekcie horných dýchacích ciest, 30 % prijatých mačiek nebolo v optimálnej telesnej kondícii a u 10,9 % mačiek boli prítomné zranenia staršieho či novšieho charakteru.

Úlohou ošetrojúceho veterinárneho lekára je zvoliť čo najefektívnejší liečebný postup s prihliadnutím na riziko ohrozenia celej populácie v útulku v prípade zavlečenia nákazy. Voľbe konkrétneho liečebného preparátu by malo predchádzať aj uvažovanie nad možnými vedľajšími účinkami, nákladmi (Maxwell, 2009) a čo najmenej stresujúcim spôsobom podania. V prípade použitia preparátov s antibiotickým efektom je potrebné vziať do úvahy možnosť vzniku antibiotickej rezistencie (Passantino, 2007).

Cieľom tejto štúdie bolo analyzovať zdravotné záznamy mačiek počas pobytu v útulku v Českej republike z pohľadu charakteru a množstva podaných liečivých, resp. podporných preparátov.

Materiál a metodika

Popis útulkov

Za účelom realizácie štúdie bola nadviazaná spolupráca s dvoma súkromnými útulkami, v ktorých boli zvieratá ustajnené v skupine. Zariadenia boli vybrané na základe spôsobu vedenia evidencie – v Českej republike zariadeniam poskytujúcim starostlivosť túlavým a opusteným zvieratám nevzniká zákonná povinnosť vedenia evidencie týkajúcej sa zdravotného stavu a podaných liečiv, množstvo zariadení si preto takúto evidenciu nevedie. Zariadenia boli tiež vybrané s ohľadom na podobnosti v managemente. Kapacita útulkov bola v sledovanom období 100 (útulok A) a 25 mačiek (útulok B). Oba útulky sú zriadené v domácom prostredí (v prípade útulku A sa jedná o rodinný dom (206 m²), v prípade útulku B o bytové priestory (38 m²)). V oboch útulkoch majú zvieratá okrem interiéru prístup aj do zastrešenej voliéry o rozmeroch 24m² (útulok A) a 15m² (útulok B). Celková podlahová plocha pripadajúca na jedno zviera je 2,3 m² (útulok A) a 2,1 m² (útulok B).

Po prijatí do zariadení sú zvieratá umiestňované samostatne (resp. v páre alebo skupine v prípade, že pochádzajú z rovnakého prostredia) do karanténnych boxov. Dĺžka karantény sa odvíja od zdravotného stavu a histórie jedinca (u žiadneho zvieratá však nie je kratšia ako 5 dní). V priebehu karantény sú zvieratá prehliadnuté veterinárnym lekárom, ošetrované (vakcinované, zbavené vnútorných a v prípade potreby aj vonkajších parazitov), očipované a v prípade, že to dovoľuje ich zdravotný stav vykastované. Ani jeden z útulkov nedisponuje vlastnou veterinárnou ošetrovňou, zvieratá sú preto za účelom náročnejších veterinárných úkonov prevezené na zazmluvnené veterinárne pracovisko. V oboch útulkoch sú zvieratá pri prijíme otestované na prítomnosť vírusovej imunodeficiencie (FIV) a vírusovej leukémie mačiek (FeLV). V útulku A poskytuje starostlivosť zvieratám 1 ošetrovateľ a traja dobrovoľníci, v útulku B jeden stály ošetrovateľ a podľa potreby jeden ďalší dobrovoľník. V oboch útulkoch sú zvieratá kŕmené ad libitne suchým, granulovaným krmivom v superprémiovej kvalite, ktoré je podľa potreby dopĺňané mokrým, konzervovaným krmivom rôznych značiek. V oboch útulkoch zdieľajú zvieratá misky na krmivo a vodu; nádoby sú umiestnené rovnomerne v jednotlivých priestoroch útulkov, tak aby k nim malo prístup každé zviera. V miestnostiach, ktoré slúžia k ustajneniu mačiek sa tiež nachádza množstvo obohacovacích prvkov v podobe hračiek, mačacích stromov a vyvýšených miest s úkrytmi. Útulku A má k dispozícii celkom 32 mačacích toaliet otvoreného i uzatvoreného typu, útulok B disponuje 8 mačacími toaletami uzatvoreného typu (v oboch útulkoch pripadá jedna toaleta na cca 3 mačky). Toalety sú čistené denne podľa potreby. Očista ostatných priestorov prebieha každodenne za použitia bežných dezinfekčných prostriedkov.

Zdravotné záznamy

Predmetom štúdie boli záznamy týkajúce sa zdravotného stavu 1884 mačiek, ktoré boli do útulkov A a B prijaté od 1.1.2013 do 31.12.2021 a zároveň v tomto období ukončili svoj pobyt. Poskytnuté záznamy obsahovali základné informácie o pohlaví a veku zvierat (v prípade, že nebol známy, bol približný vek určený ošetrovateľom v útulku), dátum prijatia do zariadenia, dátum ukončenia pobytu v útulku, spôsob ukončenia pobytu (adopcia, spontánny úhyn/eutanázia, vrátenie pôvodnému majiteľovi, vrátenie do lokality odchyty, premiestnenie do iného zariadenia, strata zvierat'a), záznamy týkajúce sa liečby (názov liečiva, počet podaní, dôvod podania) a vyskytujúcich sa príznakov zhoršeného zdravotného stavu mačiek. Súčasťou záznamov neboli informácie o zákrokoch a liečbe, ktorá bola mačkám poskytnutá mimo útulkov, na veterinárnych pracoviskách. Za účelom sledovania vplyvu dĺžky pobytu mačiek v útulku (resp. dĺžky pobytu mačiek v útulku do osvojenia) na počet zdravotných záznamov, bola z dátumu prijatia a dátumu ukončenia pobytu v útulku vypočítaná dĺžka pobytu mačiek v útulku v dňoch.

S ohľadom na analýzu veku ako možného faktora ovplyvňujúceho morbiditu mačiek boli zvieratá zatriedené do 4 vekových kategórií (mláďatá: ≤ 6 mesiacov, mladé mačky: $6 < x \leq 12$ mesiacov, dospelé mačky: $1 < x \leq 8$ rokov, staršie mačky: > 8 rokov). Pre účely analýzy typu podaných antibiotík boli roztriedené podľa účinku na širokospektrálne, stredne až širokospektrálne a úzkospektrálne. Rozdelenie antibiotík v rámci tejto štúdie vychádza z ich kategorizácie podľa účinku na bakteriálnu flóru uvedenú v rámci súhrnu údajov o prípravku (SPC), ktorý je dostupný pre každý registrovaný veterinárny či humánny liečivý prípravok. Spektrum podaných antibiotík bolo členení aj podľa chemickej štruktúry na amfenikoly, cefalosporíny, fluorochinolóny, linkosamidy, makrolidy, nitroimidazoly, penicilíny, potencované sulfonamidy a tetracyklíny (Adefegha, 2019). V rámci analýz počtu podaní preparátov s antiparazitickým efektom boli zahrnuté iba podania nad rámec rutinného odčervenia po prijatí do útulku (toto podanie bolo vykonané za účelom hubenia endoparazitov). Útulky po prijatí zvierat nevykonávali koprologické vyšetrenie; preparát proti endoparazitom bol preventívne podaný všetkým prijatým mačkám. Rutinné podanie vakcín a podanie preparátov za účelom eutanázie zvierat nebolo podobne ako ošetrovanie proti endoparazitom zahrnuté do analýzy typu a počtu podaní preparátov s liečebným, resp. podporným efektom. Mačky, ktoré prešli vakcináciou, odčervení a kastráciou a nebol u nich nájdený žiaden iný zdravotný záznam boli považované za zdravé a v rámci uvádzania výsledkov boli označené za zvieratá bez zdravotného záznamu.

Štatistická analýza

Dáta boli analyzované pomocou štatistického softwaru Unistat 6.5 for Excel (Unistat Ltd., UK). Normalita dát bola overovaná Shapiro-Wilkovým testom (zistená bola nepravidelná distribúcia). K analýze rozdielov v počtoch zvierat v kategóriách základných premenných (pohlavie, vek, spôsob ukončenia pobytu v útulku) bol využitý χ^2 test. Tento test bol využitý i v prípade ďalších analýz, v ktorých sa jednalo o porovnanie počtu zvierat vo vytvorených kategóriách, resp. o počet zdravotných záznamov alebo liečiv. Mann-Whitney test bol využitý k overeniu vplyvu pohlavia na dĺžku pobytu v útulku a tiež za účelom sledovania rozdielov v dĺžkach pobytu v útulku do osvojenia u mačiek bez zdravotných a s jedným resp. viacerými zdravotnými záznamami v rámci jednotlivých kategórií veku. V prípade analýz dĺžok pobytu u premenných s viacerými kategóriami bola využitá Kruskal-Wallis ANOVA a následne neparametrický Tukey - typ test, ktorý bol použitý ako post hoc test pre porovnanie dvojíc porovnávaných skupín. Korelácia medzi celkovou dĺžkou pobytu resp. dĺžkou pobytu v útulku do osvojenia a počtom zdravotných záznamov bola overovaná Spearmanovým korelačným koeficientom. Za štatisticky významnú bola považovaná hodnota $p \leq 0,05$.

Výsledky

Úroveň morbidity sledovanej populácie mačiek v útulkoch

V priebehu sledovacieho obdobia bolo do útulkov prijatých 1884 mačiek, ktoré v tomto období zároveň svoj pobyt v útulku ukončili. Priemerná dĺžka pobytu mačiek v útulkoch bola 69,4 dní,

medián 39 dní, minimum 0 dní, maximum 1348 dní. Tabuľka č. 1 sumarizuje dĺžku pobytu a počet mačiek prijatých do útulku podľa pohlavia, veku a spôsobu ukončenia pobytu v útulku.

Tabuľka č. 1. Počet a dĺžky pobytu mačiek prijatých do útulku podľa pohlavia, veku, typu a farby srsti a spôsobu ukončenia pobytu v útulku

| | Počet (%) | LOS v dňoch (medián) |
|--------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| pohlavie | p=0,4339 [#] | p= 0,0504 ^{&} |
| samice | 955 (50,7) ^a | 39,5 ^a |
| samce | 929 (49,3) ^a | 37,0 ^a |
| vek | p=0,0000 [#] | p=0,7113 ^{&} |
| ≤ 6 mesiacov | 1120 (59,5) ^a | 39 ^a |
| 6 < x ≤ 12 mesiacov | 236 (12,5) ^c | 37 ^a |
| 1 < x ≤ 8 rokov | 481 (25,5) ^b | 38 ^a |
| > 8 rokov | 47 (2,5) ^d | 34 ^a |
| spôsob ukončenia pobytu | p=0,0000 [#] | p=0,0000 ^{&} |
| osvojená | 1540 (81,7) ^a | 42 ^{ac} |
| úhyn (spontánne/eutanázia) | 266 (14,1) ^b | 23,5 ^b |
| vrátená majiteľovi | 42 (2,2) ^c | 7 ^e |
| vrátená do lokality odchyty | 31 (1,6) ^c | 16 ^{bd} |
| premiestnená | 2 (0,1) ^d | 20,5 ^{bcde} |
| strata | 3 (0,2) ^d | 63 ^{abcd} |

^{a, b, c, d, e} percentá and mediány v stĺpci v rámci premennej sa v prípade označenia odlišným písmenom líšia štatisticky významne ($p < 0,05$)

[#] χ^2 test

[&] Kruskal-Wallis ANOVA (v prípade pohlavia Mann-Whitney test)

Z celkového počtu 1884 mačiek nebol ani jeden zdravotný záznam nájdený u 727 (38,6 %) mačiek. U významne ($p < 0,01$) vyššieho počtu mačiek (1157, 61,4 %) bol zaznamenaný jeden alebo viac zdravotných záznamov. Celková dĺžka pobytu mačiek v útulku (bez ohľadu na spôsob ukončenia pobytu), u ktorých bol zistený jeden resp. viacero zdravotných záznamov, bola významne ($p < 0,01$) dlhšia (medián 51 dní), v porovnaní s dĺžkou pobytu mačiek, u ktorých nebol nájdený ani jeden zdravotný záznam (medián 26 dní). Dĺžka pobytu adoptovaných mačiek, u ktorých nebol zistený žiaden zdravotný záznam, bola významne ($p < 0,01$) kratšia (medián 28 dní), v porovnaní s dĺžkou pobytu adoptovaných mačiek s jedným resp. viacerými zdravotnými záznamami (medián 54 dní). Celková dĺžka pobytu mačiek v útulku významne korelovala s počtom zdravotných záznamov ($r_s = 0,3894$, $p < 0,01$), rovnaká súvislosť sa našla aj v prípade počtu zdravotných záznamov a dĺžky pobytu mačiek do osvojenia ($r_s = 0,4092$, $p < 0,01$).

U sledovanej populácie mačiek bolo zaznamenaných celkom 4389 zdravotných záznamov. Z tohto počtu sa 3722 záznamov (84,8 %) týkalo podania preparátu s liečebným alebo podporným efektom, 663 záznamov (15,2 %) súviselo s ošetrením vykonaným mimo útulku (hospitalizácia na veterinárnej klinike, chirurgický zákrok) resp. opisovalo konkrétny stav alebo indikátor zhoršeného zdravotného stavu (napr. prítomnosť hnačky). Rozdiel medzi počtom mačiek, ktorým bol podaný preparát s liečebným resp. podporným efektom minimálne raz (1075) a počtom mačiek, ktorým nebol žiaden takýto preparát podaný (82) bol významný ($p < 0,01$). Tabuľka č. 2 sumarizuje počet mačiek, ktorým bol preparát s liečivým resp. podporným efektom podaný práve jeden resp. viac krát. Maximálny zaznamenaný počet podaní preparátov u jedného zvieraťa bol 23, priemerný počet podaní bol 3,2.

Tabuľka č. 2. Počet mačiek, ktorým bol podaný prípravok s liečebným, resp. podporným efektom

| Počet podaní prípravku s liečebným resp. podporným efektom | Počet mačiek | |
|--|--------------|-------------------|
| | n | % |
| 1 | 314 | 29.2 ^a |
| 2 | 256 | 23.8 ^b |
| 3 | 135 | 12.6 ^c |
| 4 | 83 | 7.7 ^d |
| 5 | 69 | 6.4 ^d |
| 6 | 74 | 6.9 ^d |
| 7 | 44 | 4.1 ^e |
| 8 | 30 | 2.8 ^e |
| 9 | 15 | 1.4 ^f |
| 10 | 11 | 1.0 ^f |
| >10 | 44 | 4.1 ^e |
| celkom | 1075 | 100.0 |

^{a,b,c,d,e,f} χ^2 - percentá v stĺpci označené odlišným písmenom sa navzájom štatisticky významne líšia ($p < 0,05$)

Vplyv veku sa uplatňoval v prípade počtu mačiek, u ktorých nebol počas pobytu v útulku zistený žiaden zdravotný záznam (Tabuľka č. 3). Významný rozdiel v počte mačiek bez zdravotných záznamov a so zdravotnými záznamami bol nájdený iba v prípade najmladšej a najstaršej vekovej kategórie.

Tabuľka č. 4 sumarizuje porovnanie dĺžok pobytu rôznych vekových kategórií mačiek s ohľadom na množstvo zistených zdravotných záznamov. U mačiek nad 8 rokov sa dĺžka pobytu do osvojenia nelíšila medzi zvieratami, u ktorých nebol zistený žiaden zdravotný záznam a zvieratami s jedným, resp. viacerými záznamami. Vo všetkých ostatných vekových kategóriách bol rozdiel v dĺžke pobytu do osvojenia zaznamenaný ($p < 0,05$).

Pri porovnaní dĺžok pobytu do osvojenia u zvierat rôzneho veku bez zdravotného záznamu, bol významný rozdiel nájdený iba medzi kategóriou najmladších mačiek (< 6 mesiacov) a dospelých mačiek (1-8 rokov). U zvierat s jedným, resp. viacerými záznamami bol výsledok obdobný (najmladšie mačky zostávali v útulku významne kratšie ako dospelé zvieratá).

Spomedzi všetkých sledovaných vekových kategórií mačiek bol najvyšší počet zdravotných záznamov zaznamenaný u mačiek mladších ako 6 mesiacov, podobne bol počet podaní liečivého, resp. podporného preparátu u tejto kategórie mačiek najvyšší (Tabuľka č. 5).

Spektrum preparátov s liečivým, resp. podporným efektom podaných sledovanej populácii mačiek počas pobytu v útulku

V priebehu sledovaného obdobia bolo populácii mačiek v útulku podaných celkom 112 rôznych preparátov s liečebným alebo podporným efektom obsahujúcich celkom 127 účinných, resp. podporných látok. Na základe mechanizmu pôsobenia a účinnej látky boli preparáty kategorizované do 22 skupín (Tabuľka č. 6).

Tabuľka č. 3. Porovnanie počtu mačiek bez záznamov a so zdravotnými záznamami v štyroch vekových kategóriách mačiek

| Veková kategória | Počet mačiek (bez zdravotného záznamu) | | Počet mačiek (1 a viac zdravotných záznamov) | |
|------------------------|---|----------------------|--|----------------------|
| | n | % | n | % |
| ≤ 6 mesiacov | 343 | 47,18 ^{a,y} | 777 | 67,16 ^{a,x} |
| 6 < x ≤ 12 mesiacov | 124 | 17,06 ^{c,x} | 112 | 9,68 ^{c,x} |
| 1 < x ≤ 8 rokov | 246 | 33,84 ^{b,x} | 235 | 20,31 ^{b,x} |
| > 8 rokov | 14 | 1,93 ^{d,y} | 33 | 2,85 ^{d,x} |
| celkom | 727 | 100 | 1157 | 100 |

^{a,b,c,d} χ^2 test - percentá v stĺpci označené odlišným písmenom sa navzájom štatisticky významne líšia ($p < 0,05$)

^{x,y} χ^2 test - percentá v riadku označené odlišným písmenom sa navzájom štatisticky významne líšia ($p < 0,05$)

Tabuľka č. 4. Porovnanie dĺžky pobytu mačiek rôznych vekových kategórií, u ktorých neboli zistené žiadne zdravotné záznamy a mačiek, u ktorých bol zistený 1 resp. viac zdravotných záznamov

| Veková kategória | Počet mačiek (bez zdravotného záznamu) | Počet mačiek (1 a viac zdravotných záznamov) |
|------------------------|---|--|
| | dĺžka pobytu do osvojenia (medián) | dĺžka pobytu do osvojenia (medián) |
| ≤ 6 mesiacov | 26 ^{a,w} | 53 ^{b,w} |
| 6 < x ≤ 12 mesiacov | 28 ^{a,wx} | 54 ^{b,wx} |
| 1 < x ≤ 8 rokov | 30 ^{a,x} | 67 ^{b,x} |
| > 8 rokov | 37,5 ^{a,wx} | 67 ^{a,wx} |

^{a,b} Mann-Whitney U test - percentá v riadku označené odlišným písmenom sa navzájom štatisticky významne líšia ($p < 0,05$)

^{w,x} Kruskal-Wallis ANOVA – dĺžka pobytu mačiek do adopcie uvedená v rovnakom stĺpci sa štatisticky významne líši ($p < 0,05$) v prípade označenia odlišnými písmenami

Tabuľka č. 5. Vplyv veku na počty zistených zdravotných záznamov a na počty podaní preparátov s liečivým resp. podporným efektom

| Veková kategória | Počet všetkých zdravotných záznamov | | Počet záznamov (podanie liečivého resp. podporného preparátu) | |
|---------------------|--|--------------------|---|--------------------|
| | n | % | n | % |
| ≤ 6 mesiacov | 3163 | 72,07 ^a | 2705 | 72,68 ^a |
| 6 < x ≤ 12 mesiacov | 337 | 7,68 ^c | 283 | 7,60 ^c |
| 1 < x ≤ 8 rokov | 806 | 18,36 ^b | 674 | 18,11 ^b |
| > 8 rokov | 83 | 1,89 ^d | 60 | 1,61 ^d |
| celkom | 4389 | 100 | 3722 | 100 |

^{a,b,c,d} χ^2 test - percentá v stĺpci označené odlišným písmenom sa navzájom štatisticky významne líšia ($p < 0,05$)

Tabuľka č. 6. Počet podaní preparátov s liečebným resp. podporným efektom využitých k terapii sledovanej populácie mačiek v priebehu pobytu v útulku

| Skupina preparátov (počet zaradených preparátov) | Počet podaní preparátu | |
|--|------------------------|--------------------|
| | n | % |
| ATB (42) | 2552 | 68,57 ^a |
| ATB v kombinácii s kortikosteroidmi (6) | 67 | 1,80 ^f |
| ATB v kombinácii s kortikosteroidmi a ďalšími účinnými látkami (3) | 70 | 1,88 ^f |
| Kortikosteroidy (6) | 31 | 0,83 ^g |
| Antiparazitiká (9) | 284 | 7,63 ^b |
| Antimykotiká (4) | 53 | 1,42 ^f |
| Antivirotiká (1) | 5 | 0,13 ^{hi} |
| NSAID (7) | 101 | 2,71 ^e |
| NSAID v kombinácii s ďalšími účinnými látkami (1) | 1 | 0,03 ⁱ |
| Analgetika a spazmolytiká (2) | 8 | 0,21 ^h |
| Doplňkové a protektívne látky (8) | 194 | 5,21 ^{cd} |
| Choleretiká (1) | 169 | 4,54 ^d |
| Antiemetiká (2) | 102 | 2,74 ^e |
| Antidiaroidiká (2) | 7 | 0,19 ^{hi} |
| Laxatíva (1) | 1 | 0,03 ⁱ |
| Diuretiká (1) | 5 | 0,13 ^{hi} |
| Vazodilatanciá (2) | 7 | 0,19 ^{hi} |
| Antikoagulanciá (1) | 1 | 0,03 ⁱ |
| Antihypertenzíva ¹ (2) | 2 | 0,05 ^{hi} |
| Antikonvulzíva a anxiolytiká (2) | 2 | 0,05 ^{hi} |
| Vybrané prípravky pre imunomoduláciu ² (6) | 55 | 1,48 ^f |
| Špeciálna liečba ³ (3) | 5 | 0,13 ^{hi} |
| celkom (112) | 3722 | 100 |

^{a-i} χ^2 test - percentá v stĺpci označené odlišným písmenom sa navzájom štatisticky významne líšia ($p < 0,05$)

¹ očné beta blokátory (1; 0,03 %); inhibítory angiotenzín konvertujúceho enzýmu (1; 0,03 %)

² imunoglobulíny (15; 0,40 %); imunostimulanciá (19; 0,51 %); interferóny (18; 0,48 %); antihistaminiká (3; 0,08 %)

³ liečba inkontinencie (1; 0,03 %); liečba hypertyreózy (1; 0,03 %); liečba neurologických problémov (3; 0,08 %)

Antibiotiká patrili medzi najčastejšie používané spomedzi všetkých podaných preparátov. Z 1157 mačiek, u ktorých bol zistený aspoň jeden zdravotný záznam bolo antibiotikum, antibiotikum v kombinácii s kortikosteroidmi, resp. antibiotikum s kortikosteroidmi a ďalšími účinnými látkami podané aspoň raz 1023 zvieratám (96,9 %) (Tabuľka 7). Najvyšší počet podaní antibiotika u jedného zvieratá bol 17, priemerný počet podaní bol 2,6.

Tabuľka č. 7. Počet mačiek, ktorým bolo podané antibiotikum, antibiotikum v kombinácii s kortikosteroidmi, resp. antibiotikum s kortikosteroidmi a ďalšími účinnými látkami

| Počet podaní antibiotika | Počet mačiek | |
|--------------------------|--------------|--------------------|
| | n | (%) |
| 1 | 388 | 37,93 ^a |
| 2 | 274 | 26,78 ^b |
| 3 | 133 | 13,00 ^c |
| 4 | 74 | 7,23 ^{de} |
| 5 | 56 | 5,47 ^e |
| > 5 | 98 | 9,58 ^d |
| celkom | 1023 | 100 |

a-e χ^2 test - percentá v stĺpci označené odlišným písmenom sa navzájom štatisticky významne líšia ($p < 0,05$)

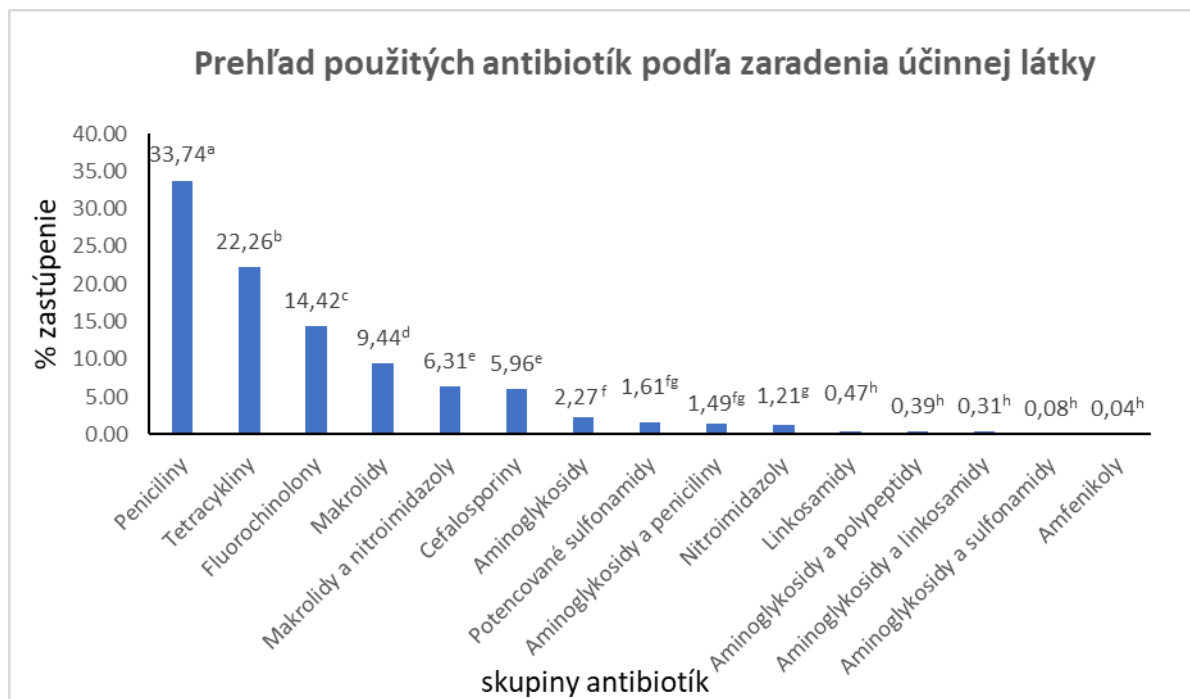
Oproti ostatným účelom boli antibiotiká v štatisticky väčšej miere ($p < 0,01$, 52,2 %) využité k liečbe ochorení horných a dolných dýchacích ciest a ich príznakov (výtok z oka, zápal spojiviek, výtok z nosa, sťažené dýchanie, viditeľnosť tretieho viečka, prítomnosť patologických zvukov súvisiacich s dýchaním – kašeľ, kýchanie). 28,4 % antibiotík bolo podaných za účelom liečby gastrointestinálnych problémov (v najväčšej miere sa jednalo o hnačku, zvracanie a nechutenstvo), v 7,9 % prípadov bola antibiotická liečba nasadená k liečbe a potlačeniu nešpecifických príznakov (apatia, horúčka, bolesť). 11,6 % antibiotík bolo podaných za účelom prevencie a liečby sekundárnych bakteriálnych infekcií v rámci postoperačnej starostlivosti, ošetrenia rán a zápalov a tiež v prípade pridruženej bakteriálnej infekcie v rámci multisystémových ochorení vírusového charakteru (typicky panleukopénia).

Z hľadiska spektra účinku boli antibiotiká rozdelené do troch skupín (Tabuľka č. 8). Antibiotiká so širokospektrálnym účinkom boli využívané v najväčšej miere. Z pohľadu kategorizácie antibiotík podľa účinnej látky (Graf č. 1) boli najviac využívané antibiotiká na báze penicilínov (amoxicilín v kombinácii s kyselinou klavulanovou (838), ampicilín (6) a benzylpenicilín (17)), tetracyklínov (doxycyklín (568)) a fluorochinolónov (enrofloxacín (182), pradofloxacín (95), ofloxacín (50), marbofloxacín (38), moxifloxacín (2) a ciprofloxacín (1)).

Tabuľka č. 8. Rozdelenie použitých antibiotík podľa spektra účinku

| Spektrum účinku antibiotik | Počet podaní (%) | |
|----------------------------|------------------|--------------------|
| | n | % |
| širokospektrálne | 2084 | 81,66 ^a |
| stredne - širokospektrálne | 401 | 15,71 ^b |
| úzkospektrálne | 67 | 2,63 ^c |
| Celkem | 2552 | 100 |

a,b,c χ^2 test - percentá v stĺpci označené odlišným písmenom sa navzájom štatisticky významne líšia ($p < 0,05$)

Graf č. 1. Rozdelenie použitých antibiotík podľa zaradenia účinnej látky

^{a-h} χ^2 test – percentá označené odlišným písmenom sa navzájom štatisticky významne líšia ($p < 0,05$)

Po antibiotikách, tvorili druhú najvýznamnejšiu skupinu preparáty s antiparazitickým efektom (284, 7,63 %). Tento počet predstavuje množstvo podaných antiparazitických preparátov, ktoré boli mačkám podané nad rámec preventívneho ošetrenia proti vnútorným parazitom pri príchode do útulku. 122krát boli mačkám podané preparáty za účelom liečby obľých a plochých červov a kokcií (účinná látka febendazol (87x), toltrazuril (32x) a emodepsid v kombinácii s toltrazurilom (3x)), 114krát boli podané preparáty k liečbe ušných roztočov na báze ivermektínu. Liečivé preparáty obsahujúce fipronil za účelom hubenia blch a všieniek boli podané 47krát. Iba jedenkrát bol podaný preparát s efektom pôsobiacim proti vnútorným aj vonkajším parazitom zároveň (kombinácia fipronilu, metoprenu, eprinomektínu a praziquantelu). Z pohľadu štatistickej významnosti bol počet podaní preparátov za účelom hubenia endoparazitov (plochých/obľých červov a kokcií) významne nižší ($p < 0,05$, 122 vs. 161) ako počet podaných preparátov použitých k ektoparazitov (ušných roztočov, blch a všieniek).

Významnú skupinu preparátov tvorili aj doplnkové a protektívne látky, choloretiká, antiemetiká a nesteroidné antiflogistiká (NSAID). Do skupiny doplnkových a protektívnych látok (podané 194krát, 5,21 %) boli zaradené probiotiká (podané 4krát) a preparáty na báze vitamínov a minerálov (podané 190krát). Vo všetkých prípadoch boli zmienené preparáty podané za účelom kompenzácie zlého výživného stavu, gastrointestinálnych problémov alebo celkového oslabenia organizmu. Choloretiká (podané 169krát, 4,54 %, účinná látka kyselina metylfenoxypriónová (169)) boli zvieratám podávané za účelom terapie zlyhania pečene, nechutenstva, hnačky, zvracania a ako adjuvans pri liečbe panleukopénie. K terapii a prevencii zvracania boli v rámci antiemetík (podané 102krát, 2,74 %) využívané účinné látky maropitant (90x) a monohydrát metoklopramid-hydrochlorid (12x). Nesteroidné antiflogistiká (podané 101, 2,71 %, účinné látky: kyselina tolfenamová (53x), meloxicam (37x), kaprofen (5x) diklofenak (5x)) boli najčastejšie využívané k terapii horúčky, pooperačných bolestí a zápalu muskuloskeletálneho systému.

Diskusia

Celkové zhodnotenie zdravotných záznamov mačiek v útulkoch

Nedostatok publikovaných výsledkov v tejto problematike je prekvapujúci, pretože informácie sú kľúčové pre pochopenie zdravotných problémov a princípov liečby zvierat v útulkoch. Doterajšie publikované štúdie sa zameriavali najmä na mortalitu mačiek v útulkoch a rizikové faktory, ktoré sa s ňou spájajú (Murray et al., 2008; Alberthsen et al., 2013; Večerek et al., 2017; Berliner et al., 2022). Výsledky našej štúdie poukazujú na skutočnosť, že u viac ako polovice všetkých mačiek, ktorých záznamy boli sledované, bol v rámci pobytu v útulku zistený najmenej jeden zdravotný záznam. Viac ako polovica mačiek teda trpela v priebehu pobytu v útulku zhoršeným zdravotným stavom, vo väčšine prípadov došlo k riešeniu zdravotného problému podaním preparátu s liečivým, resp. podporným efektom.

Z analýzy vplyvu veku na počet zdravotných záznamov mačiek vyplynulo, že v rámci vekových kategórií sa počet mačiek bez zdravotných a so zdravotnými záznamami líšil významne iba v prípade mačiatok mladších ako 6 mesiacov a mačiek starších ako 8 rokov. V oboch vekových kategóriách bol počet mačiek so záznamami štatisticky významne vyšší ako počet mačiek, ktoré boli považované za zdravé (teda sa u nich nenašiel ani jeden záznam). Jednoznačne najvyšší počet zdravotných záznamov bol zaznamenaný u najmladšej vekovej kategórie mačiek, rovnaký výsledok bol zistený i v prípade počtu zdravotných záznamov, ktoré sa týkali podania preparátov s liečivým, resp. podporným efektom. Faktorom prospievajúcim k daným výsledkom je prijímanie mačiek do 6 mesiacov do útulkov v najväčšej miere, tento trend potvrdzujú aj ďalší autori (Marston a Bennett, 2009; Alberthsen et al., 2013; Edinboro et al., 2016; Voslarova et al., 2019). Vek má vplyv na riziko rozvoja ochorení, staršie mačky a mačiatka sú najzraniteľnejšou kategóriou z pohľadu frekvencie, i z pohľadu závažnosti (Miller a Zawistowski, 2012). Vysoká morbidita mačiatok súvisí s ich nedokonalou vyvinutým imunitným systémom (Schultz et al., 2010) a celkovo zlým zdravotným stavom pri prijímaní do útulku, ktorý sa podľa Levy et al. (2003) vo väčšej miere týka ferálnych mačiek ako tých, ktorým bola poskytovaná starostlivosť zo strany človeka. U mačiatok tiež bola zistená najvyššia miera mortality v štúdiu, ktorá monitorovala faktory zvyšujúce riziko mortality v útulkoch v Českej republike (Večerek et al., 2017).

U 70,8 % mačiek bol preparát s liečivým, resp. podporným efektom nasadený opakovane. Je pravdepodobné, že percento mačiek, ktorým je poskytnutá terapia, sa vo veľkej miere odvíja od prístupu konkrétneho zariadenia. Niektoré útulky volia cestu eutanázie v prípadoch, v ktorých by iné zariadenie zvolilo cestu terapie, hoci i napriek nejasnému výsledku (Horecka a Neal, 2022). Postup v terapii je limitovaný finančnými prostriedkami a personálom, odvíja sa od času, skúseností a poznatkov osôb poskytujúcich starostlivosť. Dostupnosť liekov, vybavenia ale i zvyklosti v poskytovaní veterinárnej starostlivosti na úrovni zariadenia, regiónu, resp. štátu, dopĺňajú zoznam faktorov, ktoré majú dopad na voľbu liečebného postupu.

Počet a typ podaných liečiv sa do značnej miery odvíja od stavu do útulku prijímaných jedincov, ťažko zranené zvieratá budú napr. potrebovať vyššiu úroveň poskytovanej starostlivosti spojenú s väčšou spotrebou analgetík. Útulky, ktoré poskytli zdravotné záznamy mačiek pre účely tejto štúdie neboli zamerané na príjem určitej skupiny zvierat; do zariadení boli prijímané zvieratá z rôznych zdrojov s rôznou zdravotnou históriou. Obe zariadenia sa vyznačovali politikou, ktorá neumožňuje utrácanie zvierat z iných ako zdravotných dôvodov; ani jedno zo zariadení však nepoužívalo nástroje (hodnotiace škály, protokoly) pre hodnotenie progresu, resp. regresu nasadenej terapie alebo welfare protokol. Použitie hodnotiacich nástrojov pritom môže uľahčiť prípadné rozhodovanie o ďalšom osude zvierat, o pokračovaní v terapii alebo eutanázii.

Počet liečebných zásahov sa okrem terapie novo prijatých zvierat odvíja i od úrovne zdravotného stavu ostatných zvierat, ktoré sú už v útulku umiestnené dlhšie obdobie. Populácia v útulkoch sa dynamicky mení, prijímané sú jedince s rôznou úrovňou imunity a zdravotným statusom, prostredie vytvára na zvieratá tlak a je pre ne stresujúce. Jedným z dôsledkov stresu je potlačenie funkcie imunitného systému a rozvoj infekcie alebo jej reaktivácia (Griffin, 1989). Stres sa uplatňuje napr. v prípade reaktivácie herpesvírusu (Bannasch a Foley, 2005; Gaskell et al., 2007), v zvyšovaní rizika

vyučovania felinného koronavírusu (FCoV) (Pedersen et al., 2008) a rozvoja infekčnej peritonitídy (Vennema et al., 1998), ktorá je typická vysokou mortalitou zvierat. Predpokladá sa, že stresom zvýšená hladina glukokortikoidov zodpovedá za potlačenie bunkami sprostredkovanej imunity, čo vedie k zvýšeniu replikácie FCoV (Vennema et al., 1998). Tvrdenie, že prostredie útulku môže mať na zvieratá negatívny efekt v podobe zhoršenia zdravotného stavu bolo podporené aj našou predchádzajúcou štúdiou, v ktorej sme sa zamerali na sledovanie zdravotných indikátorov welfare v čase. Počas pobytu v útulku došlo k zhoršeniu zdravotného stavu u 41,6 % mačiek (Vojtkovská et al., 2021).

Dĺžka pobytu mačiek v útulku v našej štúdii korelovala s počtom nájdených zdravotných záznamov. Mačky, u ktorých nebol nájdený žiaden záznam pobudli v útulku do adopcie významne kratšiu dobu v porovnaní so zvieratami, u ktorých boli zdravotné záznamy nájdené. Toto zistenie nie je prekvapením, zdravotný stav je faktorom ovplyvňujúcim adopčný potenciál zvierat. Jav preferencie zvierat bez zdravotných problémov bol tiež opísaný v štúdiách zameraných na analýzu faktorov zvyšujúcich pravdepodobnosť adopcie u psov (Diverio et al., 2016; Vitulova et al., 2019). Pri porovnaní dĺžky pobytu do adopcie u zvierat so zdravotnými záznamami a u zdravých zvierat, nehral vek rolu iba v prípade mačiek starších ako 8 rokov. Z toho vyplýva, že na dĺžku pobytu do adopcie tejto kategórie mačiek nemal zdravotný stav vplyv. Osvojiteľia ochotní adoptovať si staršie zviera pravdepodobne očakávajú možný výskyt zdravotných problémov, resp. sú s týmito problémami zmierení a rozhodnú sa poskytnúť zvieratám nový domov i napriek nim. V našej štúdii zotrvali v útulku mačky nad 8 rokov spomedzi všetkých vekových kategórií najdlhšiu dobu. Skutočnosť, že staršie mačky nie sú pre potenciálnych osvojiteľov také atraktívne ako mladšie jedince, vyplýva i z ďalších štúdií (Kubesova et al., 2017; Vojtkovská et al., 2019). Množstvo nových majiteľov si riziko zhoršenia zdravotného stavu a s ním spojené zvýšenie finančných nákladov na jeho riešenie pravdepodobne uvedomuje, výhoda adopcie mláďat ale spočíva i v ďalších aspektoch napr. v prítlačivom výzore a vo vysokej miere adaptability a hravého správania, ktoré boli v štúdii od Sinn (2016) opísané ako atraktívne.

Spektrum podaných liečiv

Výsledky tejto štúdie ukázali, že zo spektra použitých liečiv boli mačkám najčastejšie aplikované antibiotiká (68,57 %), čo je záver ku ktorému sa dopracovali aj iní autori (Hölsö et al., 2005; Weese, 2006; Murphy et al., 2012). Buckland et al. (2016), ktorí sledovali využitie antibiotík vo veterinárnej praxi vo Veľkej Británii uvádzajú, že z celkového počtu vyšetrených zvierat (594 812 mačiek) boli u 21 % aplikované antibiotiká. Títo autori tiež uvádzajú, že u 42 % psov a mačiek boli antibiotiká aplikované opakovane, čo potvrdzujú aj výsledky našej štúdie - opakovaná aplikácia zaznamenaná u 62,07 % zvierat.

Základom úspechu antimikrobiálnej terapie sú vhodne zvolené antimikrobiálne látky so žiadaným spektrom účinku. Nevyhnutným predpokladom je presná diagnóza (Regula et al., 2009). V prostredí útulku však nie je praktické odoberať z každého zvierat'a vzorku na kultiváciu a testovanie citlivosti. U zvierat v útulkoch sa preto antibiotiká často používajú empiricky (Dean et al., 2018). Nadmerná aplikácia antibiotík, ktorá je dôsledkom tohto prístupu je problémom nie len v humánnej, ale i veterinárnej medicíne (Schmitt et al., 2019). Využitie antibiotík by malo byť obmedzené na situácie, kedy je podanie skutočne potrebné (Passantino, 2007). Pri výbere vhodného antibiotika je potrebné vziať do úvahy niekoľko faktorov. Výber by mal byť založený na znalostiach štruktúr baktérií, farmakodynamike a farmakokinetike (Schwarz et al., 2001). Antibiotická terapia môže potenciálne zmeniť črevnú, kožnú, resp. respiračnú mikroflóru liečených zvierat. Zdokumentované následky antibiotickej liečby zahŕňajú premnoženie črevných baktérií napr. *Clostridium difficile* (Ichinohe et al., 2011).

Penicilíny a tetracyklíny patrili v našej štúdii medzi všeobecne najčastejšie využívané antibiotiká (penicilíny tvorili 33,74 % všetkých podaných antibiotík, tetracyklíny 22,26 %). Treťou najpočetnejšou skupinou podaných antibiotík boli fluorochinolóny (14,42 %). De Briyne et al. (2014), ktorí sledovali použitie antibiotík na veterinárnych pracoviskách u zvierat v európskych krajinách

(Belgicko, Francúzsko, Nemecko, Španielsko, Švédsko) uvádzajú, že najčastejšie boli mačkám predpisované penicilíny (37 %), tetracyklíny (14 %), tretia a štvrtá generácia cefalosporínov (14 %) a tiež fluorochinolóny (13 %). Z vymenovaných skupín antibiotík sa vo viacerých štúdiách (Buckland et al., 2016; Murphy et al., 2012; Singleton et al., 2017) spomína časté využívanie cefalosporínov 3. generácie. Hardefeldt et al. (2018) uvádzajú, že 25 % všetkých antimikrobiálnych látok aplikovaných u mačiek tvoril z cefalosporínov 3. generácie cefovecin. Príčinou vysokej miery použitia cefalosporínov tretej generácie môže byť jednoduchá aplikácia (jednorazová subkutánna aplikácia) a dlhý dávkovací interval u vybraných prípravkov (napr. 14 dní u prípravku Convenia s účinnou látkou cefovecin). Preferencia tohto prípravku môže navyše súvisieť so skutočnosťou, že orálna liečba mačiek nie je úspešná, preto sa pristupujem k injekčnej aplikácii (Burke et al. 2017). Cefalosporíny však tvorili v nami sledovaných útlkoch iba minoritnú skupinu (5,96 %) podávaných antibiotík.

Z analýzy zdravotných záznamov mačiek vyplynulo, že pre efektivitu liečby boli antibiotiká podľa diagnózy podávané samostatne alebo v kombinácii s kortikosteroidmi či ďalšími účinnými látkami. Pre zvýšenie účinnosti antibiotík bolo tiež pristupované ku kombinácii antibiotík rôzneho charakteru. Schmitt et al. (2019), ktorí sledovali využitie antibiotík na veterinárnych pracoviskách vo Švajčiarsku uvádzajú, že u ochorení zahŕňajúcich akútne ochorenie horných dýchacích ciest, ochorenie dolných močových ciest a abscesy, boli spravidla aplikované aminopenicilíny spolu s ďalšími antibiotikami (fluorochinolónmi, cefalosporínmi prvej generácie, tetracyklínmi, amfenikolmi alebo cefalosporínmi tretej generácie). Penicilíny boli však v nami sledovaných útlkoch aplikované hlavne samostatne (33,74 %). Výnimku predstavovala kombinácia penicilínov s aminoglykozidmi (1,49 %).

Z pohľadu spektra účinku použitých antibiotík u mačiek je zjavné, že prevažuje využitie antibiotík so širokým spektrom účinku (81,66 %). Prednostné využitie širokospektrálnych antibiotík u mačiek potvrdzujú tiež Mateus et al. (2011). Autori však upozorňujú na už vyššie načrtnutú skutočnosť – preferencia širokospektrálnych antibiotík je riziková z pohľadu rozvoja antimikrobiálnej rezistencie. Úzkospektrálne antibiotiká boli v našej štúdii využité iba v 2,63 % prípadov. Vyššiu mieru využitia úzkospektrálnych antibiotík (18 %) zmieňujú vo svojej štúdii Hardefeldt et al. (2018). Tieto antibiotiká majú účinok na obmedzené spektrum bakteriálnej flóry, a to len na grampozitívne alebo gramnegatívne baktérie, prípadne na vybrané rody baktérií. Takáto cieleňá liečba má svoje výhody iba v prípade detegovaného pôvodcu ochorenia.

V našej štúdii bola viac ako polovica všetkých podaní antibiotík zaznamenaná z dôvodu terapie infekcií dýchacích ciest, čo je jeden z najčastejších sa vyskytujúcich problémov u mačiek v útlkoch (Gourkow et al., 2013). Ochorenia dýchacieho aparátu sú významnou príčinou morbidita mačiek, ktorých management komplikuje vysoká koncentrácia zvierat a imunosupresia v dôsledku stresu (Cohn, 2011). Príznaky sú však okrem bakteriálnych pôvodcov *Chlamydophila felis*, *Bordetella bronchiseptica*, a *Mycoplasma felis* spájané aj s infekciou felinného herpesvírusu (FHV) a felinného kalicivírusu (FCV) (napr. Hartmann et al., 2010). Podľa štúdie vylučovalo FHV pri prijíme do útulku približne 4 % mačiek, FCV asi 11 %. Po prvom týždni došlo k reaktivácii infekcie, vylučovanie sa v prípade FHV zvýšilo až na úroveň 52 %, FCV vylučovalo 15 % mačiek (Pedersen et al., 2004). V prípade FCV poskytuje očkovanie dobrú ochranu proti akútnej orálnej a respiračnej forme, vo väčšine prípadov ale nezabraňuje nakazeniu a vylučovaniu vírusu. Žiadna z vakcín navyše nechráni proti všetkým terénnym kmeňom FCV (Southerden a Gorrel, 2007). Podobne ako u FCV, očkovanie proti FHV poskytuje ochranu pred rozvojom klinických príznakov a znižuje vylučovanie vírusu v priebehu jedného týždňa po podaní (Jas et al., 2009), no neposkytuje zvieratám plnú ochranu. Napriek tomu sa vakcinácia proti FHV aj FCV v útlkoch odporúča (Day et al., 2016). Oba útluky, ktoré poskytli záznamy pre účely tejto štúdie, rutinne vakcinovali zvieratá proti kalicivíróze, herpesvírusu a panleukopénii pri prijíme do útulku ak spĺňali vyžadovaný vek. V prípade terapie infekcií horných dýchacích ciest by antibiotiká mali byť využívané primárne v liečbe infekcií vyvolaných *Mycoplasma felis*, *Chlamydophila felis* a *Bordetella bronchiseptica*, u ktorých je antibiotikom prvej voľby doxycyklín. Terapiu antibiotikami je tiež možné využiť všade tam, kde je zrejme uplatňovanie bakteriálnych patogénov napr. v prípadoch chronickej rinitídy a sinusitídy. V týchto prípadoch je amoxicilín v kombinácii s kyselinou klavulanovou vhodnou voľbou (Dean et

al., 2018). Pre liečbu respiračných ochorení je možné ale tiež využiť antibiotika zo skupiny fluorochinolónov (enrofloxacín) (Murphy et al., 2012) či ampicilín (Lappin et al., 2017).

Ďalším z dôvodov aplikácie antibiotík bola prevencia a liečba sekundárnych bakteriálnych infekcií v rámci postoperačnej starostlivosti, ošetrovania rán a zápalov. Antibiotická liečba bola nasadená tiež v prípade pridruženého bakteriálneho infekcie v rámci multisystémových ochorení vírusového charakteru a v prípade nešpecifických príznakov. Podľa De Briyne et al. (2014) sú najčastejšou indikáciou pre použitie antibiotík u mačiek kožné ochorenia (42 %), respiračné ochorenia (24 %), infekcie močového traktu (16%) a ochorenia parodontu (14 %). Miera využitia antibiotík je v prípade kožných ochorení vysoká, čo potvrdzuje rada ďalších autorov (Radford et al., 2011; Sarrazin et al., 2017; Schmitt et al., 2019). K liečbe kožných tráum a abscesov sa často využíva cefovecin zo skupiny cefalosporínov 3. generácie (Singleton et al., 2017). Vysoká miera indikácie antibiotík pre kožné ochorenia nebola v tejto štúdii potvrdená.

Významnou skupinou zdravotných problémov, u ktorých bola zvolená terapia antibiotikami boli gastrointestinálne problémy (28,4 %). Tie môžu indikovať problém lokalizovaný priamo v tráviacom trakte; gastrointestinálne príznaky však môže sprevádzať množstvo ďalších patologických zmien. V našej štúdii patrili medzi najviac sa vyskytujúce príznaky hnačka, zvracanie a nechutenstvo. Hnačka a zvracanie sú typickým príznakom napr. i pre infekciu parvovírusom, ktorý spôsobuje felinnú panleukopéniu. Hoci sa jedná o patogén vírusového pôvodu, je v tomto prípade podanie antibiotík nevyhnutné, pretože sepsa spojená s translokáciou baktérií gastrointestinálneho traktu a imunospresia sú hlavnou príčinou úmrtí. Vhodnou voľbou v terapii je amoxicilín s kyselinou klavulonovou v kombinácii s marbofloxacinom (Barrs, 2019). Podľa dostupnej literatúry je v liečbe gastrointestinálnych ochorení vo všeobecnosti vhodné využiť mimo iné amoxicilín s kyselinou klavulonovou a tiež doxycyklín (Stavroulaki et al., 2021). Okrem patogénov vírusového, bakteriálneho a parazitického pôvodu prispieva k rozvoju gastrointestinálnych problémov vo významnej miere stres. Jedným z dôsledkov stresu je narušenie črevnej bariéry, čo spôsobuje zvýšenie jej permeability a lokálnu zápalovú reakciu (Lambert, 2009). Hnačka, ktorá sa vyskytuje ako dôsledok zápalových procesov sa ale môže vyskytnúť i z dôvodu zmeny diéty po prijatí do útulku. German et al. (2015) uvádzajú výskyt hnačky u 11,9 % mačiek v útulkoch, Andersen et al. (2018) zmiňuje jej prítomnosť až u polovice všetkých zvierat v útulku. V našej štúdii boli gastrointestinálne problémy okrem podania antibiotík riešené tiež aplikáciou ďalších typov preparátov (predovšetkým choloretík, antiemetík, antidiaríí a doplnkových a protektívnych látok). Doplnkové a protektívne látky v podobe probiotík a preparátov na báze vitamínov a minerálov boli mačkám podávané za účelom zlepšenia imunity a zmiernenia gastrointestinálnych príznakov. Podanie probiotík preukázateľne zmiernuje výskyt hnačky u mačiek v útulkoch (Baybee et al., 2011).

Po antibiotikách tvorili druhú najpočetnejšiu skupinu (7,63 %) podaných preparátov antiparazitiká. Preparáty za účelom eliminácie endoparazitov boli zvieratám podávané rutinne pri prijímaní do útulku; napriek tomu bolo v niektorých prípadoch nutné ich opakované podanie v priebehu pobytu. Preventívne podanie preparátov proti endoparazitom pravdepodobne súvisí so zistením, že preparáty proti ektoparazitom boli v porovnaní s preparátmi proti endoparazitom mačkám nasadzované vo vyššej miere (4,33 % vs. 3,28 %). Z endoparazitov bol výskyt helmintov a kokcií potláčaný za pomoci prípravkov obsahujúcich febendazol, toltrazuril a emodepsid v kombinácii s toltrazurilom. Tull et al. (2021) sledovali výskyt endoparazitov v mačacom útulku v Estónsku a zistili, že nimi bolo infikovaných až 47,6 % mačiek. U zvierat boli najčastejšie nájdené škrkavky (*Toxocara cati*: 36,6 %), ktoré predstavujú jedno z najrozšírejších zoonotických črevných ochorení. Z ďalších parazitov boli zaznamenané kokcie (*Cystoisospora* spp.: 12,4 %) a pásomnice (*Taeniidae* spp.: 4,1 %). Talianska štúdia od Sauda et al. (2019) zistila prevalenciu parazitov na úrovni 22 %; až 19,7 % mačiek však bolo infikovaných parazitmi so zoonotickým potenciálom. V prípade talianskej štúdie bola zistená vyššia prevalencia protozoálnych infekcií v porovnaní s infekciami helmintmi. Medzi nájdené parazity patrili *Giardia duodenalis* (10,6 %), *Toxocara cati* (9 %), *Cystoisospora felis* (3 %), *Cystoisospora revolta* (2,3 %), *Cryptosporidium* spp. (1,6 %), *Aonchotheca putorii* (0,75 %), *Tritrichomonas foetus* (0,75 %) a *Strongyloides* spp. (0,75 %).

Z ektoparazitov bol v nami sledovaných útulkoch riešený výskyt svrabu pomocou preparátu s ivermectínom (3,06 %), výskyt blch a všeniak pomocou prípravku s fipronilom (1,26 %). Svrab spôsobený pôvodcom *Otodectes cynotis* je vysoko kontagióznym a teda rizikovým v prostredí s vysokou koncentráciou mačiek. Parazit sa môže vyskytovať i u zvierat s nezmeneným vzhľadom zvukovodu (Akucewicz et al., 2002), ster z ušného kanálu s následným prehliadaním pod mikroskopom je preto žiaduce vykonať. Genchi et al. (2021) uvádzajú prevalenciu *Otodectes cynotis* u mačiek pochádzajúcich z kolónií ferálnych mačiek, útulkov a súkromných chovov na úrovni 9,8 %. Vyššia miera výskytu (19,3 %) bola nájdená u túlavých mačiek v Oklahome v USA (Thomas et al., 2016). Vek mačiek nižší ako 12 mesiacov a prístup do vonkajšieho prostredia boli faktory zvyšujúce riziko infestácie týmto parazitom. Predpokladá sa, že mladé mačky vykazujúce hravé správanie sa pravdepodobne dostávajú do kontaktu s inými mačkami vo väčšej miere, čo ich predisponuje k nakazeniu (Genchi et al. 2021). Pri absencii liečby parazita hrozí okrem lokálneho postihnutia oblasti zvukovodu rozšírenie svrabu na celé telo (Fanelli et al., 2020). Blchy (*Ctenocephalides felis*) sú spomedzi ektoparazitov mačiek ďalším významným zástupcom (Rust, 2017). *Parazit vyvoláva alergické reakcie a v našich podmienkach môže prenášať bartonelózu alebo pásomnicu psiu (Dipylidium caninum). V populácii túlavých mačiek sa výskyt Ctenocephalides felis môže pohybovať až na úrovni 71,6 % (Thomas et al., 2016).* Karanténa novo prijatých jedincov má význam nie len v snahe o minimalizáciu prenosu bakteriálnych a vírusových agens v populácii, ale tiež pre vylúčenie alebo prípadnú elimináciu ekto a endoparazitov. Svojimi výsledkami to potvrdzuje i Tull et al. (2021) - nižšia intenzita infekcie bola detegovaná u mačiek v karanténe v porovnaní s mačkami určenými k adopcii. Vzhľadom k potrebe ochrany zvierat pred zavlečením parazitov do populácie, pristupujú útulky k podaniu antiparazitík bez vyšetrenia vzoriek, čo bol i prípad v nami sledovaných útulkoch. Rezistencia voči endoparazitózam mačiek momentálne nie je problémom, existujú však správy o nedostatočnej účinnosti ektoparazitických prípravkov. V ich prípade ide hlavne o skrátenie doby účinnosti (Rodriguez-Vivas et al., 2017).

Záver

Hoci bol v tejto štúdií zistený relatívne vysoký počet zvierat, u ktorých boli nájdené záznamy súvisiace s morbiditou (61,4 %), mortalita v monitorovaných útulkoch bola na pomerne nízkej úrovni (14,1 %). Nízky počet eutanázií a spontánnych úhynov môže čiastočne odkazovať na efektivitu liečebných postupov a na nízky príjem zvierat v život ohrozujúcich stavoch, resp. na efektivitu ich managementu. Hoci je znižovanie mortality žiaduce a je spoločným cieľom útulkov, mali by byť prítomné i snahy o zabránenie, vyliečenie alebo aspoň zmiernenie negatívnych efektov zhoršeného zdravotného stavu zvierat, keďže dobrá úroveň zdravia tvorí jeden z kľúčových aspektov welfare. Zvýšená pozornosť by mala byť venovaná hlavne najmladšej vekovej kategórii zvierat, u ktorej bol počet zistených zdravotných záznamov najvyšší. Medzi najčastejšie používané preparáty v liečbe mačiek patrili antibiotiká. Toto zistenie súvisí s charakterom zvyčajne sa vyskytujúcich zdravotných problémov v populácii útulkových mačiek (infekcie dýchacích ciest, gastrointestinálne problémy). Antibiotiká by mali byť využívané cielene a iba v nevyhnutných prípadoch, v opačnom prípade dochádza k zvyšovaniu rizika rezistencie. Po antibiotikách tvorili významnú skupinu preparátov antiparazitiká – vybrané útulky prijímali zvieratá z rôznych zdrojov a medzi prijímanými boli i túlavé zvieratá, u ktorých je zvýšená miera infestácie parazitmi bežná.

V snahe o zachovanie dobrého zdravia a welfare je prevencia pred zavlečením a šírením nákaz extrémne dôležitá a nastavenie vhodných postupov patrí medzi najnáročnejšie úlohy, ktorým musia útulky čeliť. Z pohľadu materiálneho vybavenia tvoriaceho prostredie útulku, by zariadenia mali nájsť kompromis medzi potrebou častej asanácie a behaviorálnymi potrebami zvierat. V útulkoch je dôležité znižovanie stresu zvierat, ktorý s narušením zdravia úzko súvisí.

Táto štúdia bola podporená ITA VETUNI (projekt č. 2022ITA21).

Literatúra

- Adefegha, A. 2019. Antibiotics and drug pharmacology. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences* 3: 43-49.
- Akucewich, L.H., Philman, K., Clark, A., Gillespie, J., Kunkle, G., Nicklin, C.F., Greiner, E.C. 2002. Prevalence of ectoparasites in a population of feral cats from north central Florida during the summer. *Veterinary Parasitology* 109: 129-139.
- Alberthsen, C., Rand, J.S., Bennett, P.C., Paterson, M., Lawrie, M., Morton, J. M. 2013. Cat admissions to RSPCA shelters in Queensland, Australia: description of cats and risk factors for euthanasia after entry. *Australian Veterinary Journal* 91: 35-42.
- Amat, M., Camps, T., Manteca, X. 2016. Stress in owned cats: behavioural changes and welfare implications. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 18: 577-586.
- Andersen, L.A., Levy, J.K., McManus, C.M., McGorray, S.P., Leutenegger, C.M., Piccione, J., Blackwelder, L.K., Tucker, S. J. 2018. Prevalence of enteropathogens in cats with and without diarrhea in four different management models for unowned cats in the southeast United States. *The Veterinary Journal* 236: 49-55.
- Bannasch, M.J., Foley, J.E. 2005. Epidemiological evaluation of multiple respiratory pathogens in cats in animal shelters. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 7: 109-119.
- Barrs, V.R. 2019. Feline panleucopenia: a re-emergent disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 49: 651-670.
- Berliner, E.A., Scarlett, J.M., Cowan, A.C., Mohammed, H. 2022. A prospective study of growth Rate, disease incidence, and mortality in kittens less than 9 weeks of age in shelter and foster care. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 1-16.
- Buckland, E.L., O'Neill, D., Summers, J., Mateus, A., Church, D., Redmond, L., Brodbelt, D. 2016. Characterisation of antimicrobial use in cats and dogs attending UK primary care companion animal veterinary practices. *Veterinary Record* 179: 489-489.
- Buffington, C.A. 2011. Idiopathic cystitis in domestic cats – beyond the lower urinary tract. *J Journal of Veterinary Internal Medicine* 25: 784-796.
- Burke, S., Black, V., Sánchez-Vizcaíno, F., Radford, A., Hibbert, A., Tasker, S. 2017. Use of cefovecin in a UK population of cats attending first-opinion practices as recorded in electronic health records. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 19: 687-692.
- Cohn, LA. 2011. Feline respiratory disease complex. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 41: 1273-1289.
- Day, M.J., Horzinek, M.C., Schultz, R.D., Squires, R.A. 2016. WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice* 57: E1-E45.
- De Briyne, N., Atkinson, J., Pokludová, L., Borriello, S.P. 2014. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Veterinary Record* 175: 325.
- Dean, R., Roberts, M., Stavisky, J. 2018. *BSAVA Manual of Canine and Feline Shelter Medicine. Principles of Health and Welfare in a Multi-animal Environment.* British Small Animal Veterinary Association. Gloucester.
- Diverio, S., Boccini, B., Menchetti, L., Bennett, P.C. 2016. The Italian perception of the ideal companion dog. *Journal of Veterinary Behavior* 12: 27-35.
- Fanelli, A., Doménech, G., Alonso, F., Martínez-Carrasco, F., Tizzani, P., Martínez-Carrasco, C. 2020. *Otodectes cynotis* in urban and peri-urban semi-arid areas: a widespread parasite in the cat population. *Journal of Parasitic Diseases* 44: 81-85.
- Gaskell, R., Dawson, S., Radford, A., Thiry, E. 2007. Feline herpesvirus. *Veterinary Research* 38: 337-354.
- Genchi, M., Vismarra, A., Zanet, S., Morelli, S., Galuppi, R., Cringoli, G., Lia, R., Diaferia, M., Frangipane di Regalbono, A., Venegoni, G., Solari Basano, F. 2021. Prevalence and risk factors associated with cat parasites in Italy: a multicenter study. *Parasites & Vectors* 14: 1-11.
- German, A.C., Cunliffe, N.A., Morgan, K.L. 2017. Faecal consistency and risk factors for diarrhoea and constipation in cats in UK rehoming shelters. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 19: 57-65.

- Gourkow, N., Lawson, J.H., Hamon, S.C., Phillips, C.J.C. 2013. Descriptive epidemiology of upper respiratory disease and associated risk factors in cats in an animal shelter in coastal western Canada. *Canadian Veterinary Journal* 54:132-138.
- Grant, R.A., Warrior, J.R. 2019. Clicker training increases exploratory behaviour and time spent at the front of the enclosure in shelter cats; Implications for welfare and adoption rates. *Applied Animal Behaviour Science* 211: 77-83.
- Griffin J. 1989. Stress and immunity: a unifying concept. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 20: 263–312.
- Hardefeldt, L.Y., Selinger, J., Stevenson, M.A., Gilkerson, J.R., Crabb, H., Billman-Jacobe, H., Thursky, K., Bailey, K.E., Awad, M., Browning, G.F. 2018. Population wide assessment of antimicrobial use in dogs and cats using a novel data source – a cohort study using pet insurance data. *Veterinary Microbiology* 225: 34-39.
- Hartmann, A.D., Hawley, J., Werckenthin, C., Lappin, M.R., Hartmann, K. 2010. Detection of bacterial and viral organisms from the conjunctiva of cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 12: 775-782.
- Horecka, K., Neal, S. 2022. Critical problems for research in animal sheltering, a conceptual analysis. *Frontiers in Veterinary Science* 9: 804154.
- Ichinohe, T., Pang, I.K., Kumamoto, Y. 2011. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 108: 5354–5359.
- Jas, D., Aeberle, C., Lacombe, V., Guiot, A.L., Poulet, H. 2009. Onset of immunity in kittens after vaccination with a non-adjuvanted vaccine against feline panleucopenia, feline calicivirus and feline herpesvirus. *The Veterinary Journal* 182: 86-93.
- Koblenzer, C.S. 1999. Itching and the atopic skin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 104: S109-S113.
- Kubesova, K., Voslarova, E., Vecerek, V., Vucinic, M. 2017. Investigating some of the factors that influence the selection of shelter cats by adopters in the Czech Republic. *Anthrozoös* 30: 623-633.
- Lambert, G.P. 2009. Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. *Journal of Animal Science* 87: 101–108.
- Lappin, M.R., Blondeau, J., Booth, D., Breitschwerdt, E., Guardabassi, L., Lloyd, D., Papich, M., Rankin, S., Sykes, J.E., Turnidge, J., Weese, J.S. 2017. Antimicrobial use guidelines for treatment of respiratory tract disease in dogs and cats: Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 31: 279-294.
- Levy, J.K., Gale, D.W., Gale, L.A. 2003. Evaluation of the effect of a long-term trap-neuter-return and adoption program on a free-roaming cat population. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 222: 42-46.
- Marston, L.C., Bennett, P.C. 2009. Admissions of cats to animal welfare shelters in Melbourne, Australia. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 12:189-213.
- Mateus, A., Brodbelt, D.C., Barber, N., Stärk, K.D.C. 2011. Antimicrobial use in dogs and cats in first opinion veterinary practices in the UK. *Journal of Small Animal Practice* 52: 515–521.
- Maxwell, S. 2009. Rational prescribing: the principles of drug selection. *Clinical Medicine* 9: 481.
- Miller, L., Zawistowski, S. 2012. *Shelter medicine for veterinarians and staff*. John Wiley & Sons. Hoboken.
- Murphy, C.P., Reid-Smith, R.J., Boerlin, P., Weese, J.S., Prescott, J.F., Janecko, N., McEwen, S.A. 2012. Out-patient antimicrobial drug use in dogs and cats for new disease events from community companion animal practices in Ontario. *Canadian Veterinary Journal* 53: 291-298.
- Murray, J.K., Skillings, E., Gruffydd-Jones, T.J. 2008. A study of risk factors for cat mortality in adoption centres of a UK cat charity. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 10: 338-345.
- Passantino, A. 2007. Ethical aspects for veterinary medicinal products regarding antimicrobial drug use in Italy. *International Journal of Antimicrobial Agents* 29: 240-244.

- Pedersen, N.C., Allen, C.E., Lyons, L.A. 2008. Pathogenesis of feline enteric coronavirus infection. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 10: 529-541.
- Pedersen, N.C., Sato, R., Foley, J.E., Poland, A.M. 2004. Common virus infections in cats, before and after being placed in shelters, with emphasis on feline enteric coronavirus. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 6: 83-88.
- Peng, S.J.L., Lee, L.Y.T., Fei, A.C.Y. 2012. Shelter animal management and trends in Taiwan. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 15: 346-57.
- Radford, A.D., Noble, P.J., Coyne, K.P., Gaskell, R.M., Jones, P.H., Bryan, J.G.E., Setzkorn, C., Tierney, Á., Dawson, S. 2011. Antibacterial prescribing patterns in small animal veterinary practice identified via SAVSNET: the small animal veterinary surveillance network. *Veterinary Record* 169: 310-310.
- Regula, G., Torriani, K., Gassner, B., Stucki, F., Müntener, C.R. 2009. Prescription patterns of antimicrobials in veterinary practices in Switzerland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63: 805-811.
- Rodriguez-Vivas, R.I., Ojeda-Chi, M.M., Trinidad-Martinez, I., De León, A.P. 2017. First documentation of ivermectin resistance in *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 233: 9-13.
- Rust, M.K. 2017. The biology and ecology of cat fleas and advancements in their pest management: a review. *Insects* 8: 118.
- Sarrazin, S., Vandael, F., Cleven, V., Graef, E., Rooster, H., Dewulf, J. 2017. The impact of antimicrobial use guidelines on prescription habits in fourteen Flemish small animal practices. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 86: 173-182.
- Sauda, F., Malandrucchio, L., De Liberato, C., Perrucci, S. 2019. Gastrointestinal parasites in shelter cats of central Italy. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 18: 100321.
- Scarlett, J.M., Donoghue, S., Saidla, J., Wills, J. 1994. Overweight cats: prevalence and risk factors. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 18: S22-8.
- Schmitt, K., Lehner, C., Schuller, S., Schüpbach-Regula, G., Mevissen, M., Peter, R., Müntener, C.R., Naegeli, H., Willi, B. 2019. Antimicrobial use for selected diseases in cats in Switzerland. *BMC Veterinary Research* 15: 1-11.
- Schultz, R.D., Thiel, B., Mukhtar, E., Sharp, P., Larson, L.J. 2010. Age and long-term protection immunity in dogs and cats. *Journal of Comparative Pathology* 141: S102-S108.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Walsh, T.R. 2001. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents* 17: 431-437.
- Singleton, D.A., Sánchez-Vizcaíno, F., Dawson, S., Jones, P.H., Noble, P.J.M., Pinchbeck, G.L., Williams, N.J., Radford, A.D. 2017. Patterns of antimicrobial agent prescription in a sentinel population of canine and feline veterinary practices in the United Kingdom. *The Veterinary Journal* 224: 18-24.
- Sinn, L. 2016. Factors influencing the selection of cats by adopters. *Journal of Veterinary Behavior* 14: 5-9.
- Slingerland, L.I., Fazilova, V.V., Plantinga, E.A., Kooistra, H.S., Beynen, A.C. 2009. Indoor confinement and physical inactivity rather than the proportion of dry food are risk factors in the development of feline type 2 diabetes mellitus. *The Veterinary Journal* 179: 247-253.
- Southerden, P., Gorrel, C. 2007. Treatment of a case of refractory feline chronic gingivostomatitis with feline recombinant interferon omega. *Journal of Small Animal Practice* 48: 104-6.
- Stavroulaki, E.M., Suchodolski, J.S., Pilla, R., Fosgate, G.T., Sung, C.H., Lidbury, J.A., Steiner, J.M., Xenoulis, P.G. 2021. Short- and long-term effects of amoxicillin/clavulanic acid or doxycycline on the gastrointestinal microbiome of growing cats. *PLoS One* 16: e0253031.
- Stella, J.L., Lord, L.K., Buffington, C.T. 2011. Sickness behaviors in response to unusual external events in healthy cats and cats with feline interstitial cystitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 238: 66-73.

- Tanaka, A., Wagner, D.C., Kass, P.H., Hurley, K.F. 2012. Associations among weight loss, stress, and upper respiratory tract infection in shelter cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 240: 570-576.
- Thomas, J.E., Staubus, L., Goolsby, J.L., Reichard, M.V. 2016. Ectoparasites of free-roaming domestic cats in the central United States. *Veterinary Parasitology* 228: 17-22.
- Tull, A., Moks, E., Saarma, U. 2021. Endoparasite prevalence and infection risk factors among cats in an animal shelter in Estonia. *Folia Parasitologica* 68: 010.
- Večerek, V., Kubesová, K., Voslářová, E., Bedáňová, I. 2017. Rates of death and euthanasia for cats in no-kill shelters in the Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno* 86: 109-115.
- Vennema, H., Poland, A., Foley, J., Pedersen, N.C. 1998. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology* 243: 150-157.
- Vitulova, S., Voslarova, E., Vecerek, V., Bedanova, I., Volfova, M. 2019. The health of shelter dogs and its impact on their adoption. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 132: 325-333.
- Vojtkovská, V., Voslářová, E., Večerek, V. 2019. Comparison of results data for shelter dogs and cats in the Czech Republic. *Animals* 9: 595.
- Vojtkovská, V., Voslářová, E., Večerek, V. 2021. Changes in health indicators of welfare in group-housed shelter cats. *Frontiers in Veterinary Science* 8: 701346.
- Weng, Y., Hart, L. 2012. Impact of the economic recession on companion animal relinquishment, adoption, and euthanasia: a Chicago animal shelter's experience. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 15: 80-90.

Vplyv aplikácie plynného ozónu na vybrané patogény vyskytujúce sa v útulkoch pre mačky a ďalších zariadeniach

Veronika Vojtkovská^{1*}, Dana Lobová², Eva Voslášková¹, Vladimír Večerek¹

¹ Ústav ochrany a welfare zvierat a verejného veterinárneho lékařství, FVHE VETUNI, ČR,

² Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, FVL VETUNI, ČR

Abstrakt

Problematica správne zvolených dezinfekčných postupov je v chovoch s vysokým počtom mačiek kľúčová, keďže priamo ovplyvňuje úroveň zdravia zvierat. Cieľom tejto štúdie bolo overenie virucidného efektu plynného ozónu vyvíjaného komerčne dostupnými generátormi v kontrolovaných experimentálnych podmienkach na skupinu vybraných patogénov (felinný koronavírus, caninný koronavírus, felinný kalicivírus, felinný parvovírus) bežne sa vyskytujúcich v útulkoch a ďalších zariadeniach. K vyvíjaniu ozónu boli využité dva generátory s výkonom 3,5 g/h (zariadenie A') a 20 g/h (zariadenie B'); počas aplikácie boli vzorky vírusov umiestnené na plastovom povrchu Petriho misky v experimentálnej miestnosti o objeme 70,3 m³ na stanovištiach v troch výškových úrovniach (úroveň podlahy, 77,5 cm a 152 cm). Hodnotený bol dvoj-, štvor-, a šesť- hodinový efekt aplikácie ozónu. Koncentrácia ozónu dosiahnutá generátorom A' bola na jednotlivých stanovištiach 0,2-0,7 ppm, v prípade prístroja B' 3,6-5,1 ppm. Viabilita vírusov po aplikácii ozónu bola hodnotená na základe detekcie cytopatických efektov typických pre daný patogén zistených na CRFK (Crandell-Rees Feline Kidney) bunecnej línii po inkubácii. Cytopatický efekt nebol zistený u felinného koronavírusu po 2 hodinovej aplikácii ozónu vyvíjaného generátorom A', absencia cytopatického efektu bola u caninného koronavírusu spozorovaná po 4 hodinovej aplikácii ozónu vyvíjaného rovnakým generátorom. Absencia cytopatického efektu bola u felinného kalicivírusu zistená po 6 hodinovej aplikácii ozónu vyvíjaného generátorom B'; viabilita felinného parvovírusu nebola narušená ani 6 hodinovou aplikáciou ozónu vyvíjaného obdobným prístrojom. Výsledky štúdie potvrdzujú nižšiu odolnosť voči aplikácii plynného ozónu u obalených vírusov. Na základe zistení možno konštatovať určitú mieru dezinfekčného potenciálu u koronavírusov; virucidný efekt je ale otázný v prípade reálnych podmienok chovov, ktoré neboli v tejto štúdii testované. K dosiahnutiu virucidného efektu je u odolnejších patogénov nutné vyvinúť vyššie koncentrácie ozónu, čo je v prípade použitia komerčne dostupných generátorov obtiažne; koncentrácia ozónu by sa navyše mala udržiavať v prípustných hladinách, ktoré sú bezpečné pre zvieratá a človeka.

Úvod

V útulkoch pre mačky a ďalších zariadeniach vyznačujúcich sa vysokou koncentráciou zvierat, sú správne zvolené asanačné postupy kritickým aspektom udržiavania populácie v dobrom zdravotnom stave keďže prispievajú k zabránovaniu šírenia infekčných agens. Výber vhodného dezinfekčného prostriedku je kľúčový; mal by zohľadňovať prostredie, v ktorom bude využitý, odolnosť patogénov, spôsob aplikácie, dĺžku účinku a cenu (Newbury et al., 2010). Hoci sa odporúčania týkajúce sa asanačie prostredia v útulkoch zameriavajú prevažne na tradičné spôsoby dezinfekcie pomocou dezinfekčných prostriedkov (chemikálií na báze kvartérnych amóniových zlúčenín, chlornanu sodného, chlornanu vápenatého a peroxidu vodíka) (Newbury a Miller, 2018), v poslednom období sa aj vďaka pandémie spôsobenej ochorením COVID-19, diskusia týkajúca asanačných postupov rozšírila i o ďalšie, menej konvenčné spôsoby dezinfekcie. Možno medzi ne zaradiť ošetrovanie vnútorných plôch a priestorov tzv. ozónovými generátormi, teda zariadeniami vyvíjajúcimi plynný ozón, ktorý je po fluóre druhým najsilnejším oxidačným činidlom (Guzel-Seydim et al., 2004). Ozón sa vyznačuje schopnosťou reagovať s organickými molekulami obsahujúcimi dvojité alebo trojitú väzbu a táto vlastnosť je príčinou jeho baktericídnych, virucidných a fungicídnych účinkov (Cattel et al., 2021). Popisované účinky sú využívané napr. v dezinfekcii vody (Loeb et al., 2012), v potravinárskom priemysle k dezinfekcii prevádzok, k povrchovej konzervácii potravinárskych

výrobkov a k povrchovému ošetrovaniu zeleniny a ovocia (Guzel-Seydim et al., 2004). Účinok ozónu na baktérie je komplexný, keďže pôsobí hneď na niekoľko bunecných štruktúr vrátane proteínov, enzýmov a nenasýtených mastných kyselín v bunecných membránach (Khadre et al., 2001); u gramnegatívnych baktérií sú primárnou oblasťou pôsobenia lipoproteíny a lipopolysacharidy. V dôsledku narušenia týchto štruktúr dochádza k zvýšeniu permeability buniek a k ich následnej lýze (Khadre et al., 2001). V prípade vírusov spočíva mechanizmus účinku ozónu v narušení povrchových proteínov kapsidy a membránových receptorov. Pôsobenie ozónu ovplyvňuje štruktúru vírusu a jeho infekčnú kapacitu pretože receptory, ktoré vírus využíva k väzbe na hostiteľské bunky sú oxidáciou pozmenené. Ozón navyše narúša membrány obalených vírusov peroxidáciou fosfolipidov a vytvára reaktívne formy kyslíka (Tseng a Li, 2008; Cristiano, 2020). K inaktivácii vírusu môže dôjsť i poškodením jeho genetickej informácie (deštrukciou DNA, resp. RNA) (Kim, 1999).

Výroba ozónu je možná niekoľkými metódami, z ktorých tri sú v súčasnosti dostupné komerčne – korónový výboj, UV žiarenie a elektrolýza (Prabha et al., 2015). Generátory môžu k výrobe ozónu využívať vzduch alebo čistý kyslík z plynovej nádoby (resp. kyslík získaný membránovou separáciou vzduchu). Na trhu bežne dostupné ozónové generátory pre domáce použitie zvyčajne využívajú k výrobe ozónu vzduch, na ktorý pôsobia elektrické výboje (korónový výboj). Vysoké napätie prechádza dielektrikom na uzemnené sito/dosku, čím dochádza k deleniu molekúl kyslíka na jednotlivé atómy. Voľné atómy sa následne viažu s ďalšou molekulou kyslíka za vzniku ozónu. V bežných podmienkach je ozón vysoko reaktívny plyn modrej farby (pri nízkych koncentráciách je bezfarebný) vyznačujúci sa charakteristickým zápachom (Wysok et al., 2006). Zdá sa, že aplikácia plynného ozónu má oproti tuhým a kvapalným chemickým látkam používaným k dezinfekcii radu výhod – medzi nimi napr. schopnosť plynu preniknúť do všetkých častí ošetrovaného prostredia vrátane štrbín, nábytku a textílií (Hudson et al., 2007) a nezanechávanie škodlivých rezíduí (Cristiano, 2020). Schopnosť plynu prenikať do materiálov je obzvlášť užitočná v prostredí, ktoré je tvorené množstvom objektov (v útulkoch a v chovateľských staniách napr. šplhadlá, pelechý a ďalšie objekty z tkaniny) inak pomerne náročných na očistu bežnými spôsobmi.

Informácie týkajúce sa dezinfekčnej kapacity ozónu vyvíjaného ozónovými generátormi sú k dispozícii hlavne v štúdiách zameraných na elimináciu patogénov postihujúcich človeka (Irie et al., 2022) so zvláštnym dorazom na elimináciu SARS-CoV-2 z prostredia. Testovanie dekontaminačnej schopnosti ozónu vyvíjaného ozónovými generátormi s rôznymi výkonmi realizovalo aj Národné referenčné laboratórium pre dezinfekciu a sterilizáciu Štátneho zdravotného ústavu Českej republiky. V testovaní boli použité štandardné testovacie mikroorganizmy (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, mikroskopické vlákňité huby *Aspergillus brasiliensis* a modelový vírus *E. coli* bakteriofág $\phi X 174$) (Kotlík et al., 2021). Vzhľadom k skutočnosti, že potenciál využitia ozónových generátorov v zariadeniach spadajúcich do oblasti veterinárnej medicíny a chovateľstva (útulky, chovateľské stanice, veterinárne ambulancie a kliniky) nie je podrobne popísaný predovšetkým u vírusových pôvodcov, bolo cieľom tejto štúdie experimentálne overiť vplyv aplikácie ozónu so zameraním na významné felinné patogény vírusového pôvodu rôznej odolnosti (felinný koronavírus (FCoV), felinný kalicivírus (FCV), felinný parvovírus (FPV)), ktorých výskyt je v prostrediach so zvýšeným počtom mačiek bežný. K testovaným patogénom bol zaradený aj caninný koronavírus (CaCoV), ktorým môžu byť mačky infikované v prípade zdieľania prostredia so psami (Stoddart et al., 1988).

Materiál a metodika

Vzorky vírusov

Ako pozitívne kontrolné kmene boli použité terénne izoláty felinného koronavírusu, felinného parvovírusu a felinného kalicivírusu a zbierkový kmeň caninného koronavírusu. Kmene boli izolované na bunecnej línii felinnej proveniencie (Crandell-Rees Feline Kidney; CRFK bunky) za štandardných podmienok. Ich pozitivita bola verifikovaná qPCR a následne sekvenovaná. Sekvencie boli porovnané s kmeňmi v databáze Gen Bank a bola potvrdená ich pozitivita.

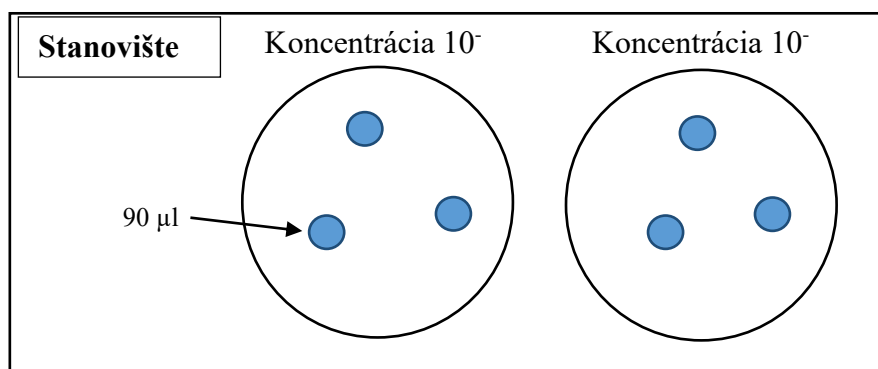
Využití kmene:

1. CaCoV: ATCC; VR-2068; canine coronavirus modified -Strain: CCV-TN-449; LOT: 70032067
2. FCoV: pozitivny terenny izolát virusu (útulek Lucky cats, Ostopovice, ČR)
3. FPV: izolát z 2. pasáže na CRFK bunkách (Bioveta, Ivanovice na Hané, ČR)
4. FCV: pozitivny terenny izolát virusu (Šumperk, ČR)

Príprava vzoriek

Zamrazené vzorky vírusov boli pred použitím ponechané k postupnému rozmrazeniu v chladničke (-4 °C) a následne riedené koeficientom 10 (100 µl vírusovej suspenzie a 900 µl DMEM). Patogény boli vždy nariedené do dvoch koncentrácií (FCoV a CaCoV - koncentrácia 10^{-3} a 10^{-4} , FCV a FPV - koncentrácia 10^{-4} a 10^{-5}). Takto pripravené vzorky boli napipetované na Petriho misky (každá Petriho miska obsahovala celkom 3 kvapky (triplikát) patogénu v danej koncentrácii v množstve 90 µl (schéma č. 1). Petriho misky so vzorkami boli premiestnené do miestnosti, kde boli vystavené účinkom plynného ozónu.

Schéma č. 1. Demonštrácia umiestnenia vzoriek na Petriho miskách (napr. FCV)



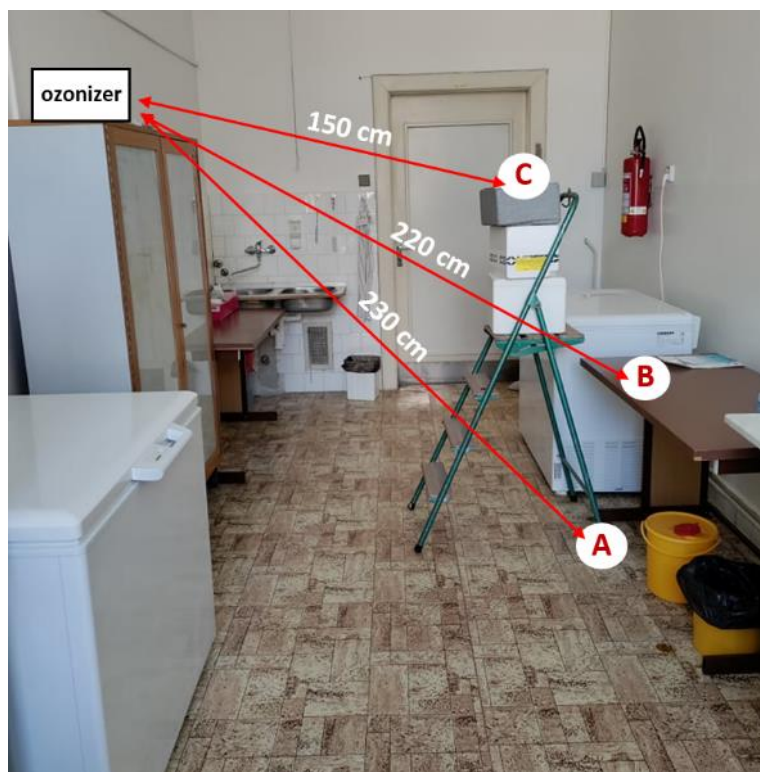
Priebeh experimentu

Vystavenie patogénov aplikácii plynného ozónu bolo realizované v miestnosti nevyužívaného laboratória, ktoré je súčasťou pracoviska Ústavu infekčných chorôb a mikrobiológie na VETUNI. V miestnosti bola priemerná teplota v rámci jednotlivých meraní na úrovni 25,5 °C, priemerná vlhkosť 55,25 %. Objem experimentálnej miestnosti je 70.3 m³ (2,86 m (šírka) x 6,70 m (dĺžka) x 3,67 m (výška)). V čase experimentu sa v miestnosti nachádzalo iba bežné pracovné vybavenie (stôl, stoličky, skriňa, vypnuté mraziace boxy, krabice). Petriho misky obsahujúce vzorky patogénov boli v laboratórnej miestnosti umiestnené na 3 vybrané stanovištia, ktoré predstavovali 3 rôzne výškové úrovne (A: podlaha; B: pracovný stôl (výška 77,5 cm); C: rebrík s krabicou (výška (152 cm)) z dôvodu overovania ich vplyvu na účinnosť aplikácie ozónu. Zariadenie vyvíjajúce plynný ozón bolo umiestnené vo výške 178 cm a v priemernej vzdialenosti 2 m od každého stanovišťa so vzorkami (schéma č. 2). K vyvíjaniu plynného ozónu boli použité dve rôzne zariadenia (ďalej označené ako A' a B') za účelom overovania vplyvu výkonu na prežiteľnosť patogénov. V priebehu experimentu bolo v prevádzke vždy iba jedno zo zariadení. Technické údaje týkajúce sa použitých prístrojoch sú uvedené v tabuľke č. 1. Obe zariadenia využívali princíp tvorby ozónu zo vzduchu za pôsobenia koronového výboja. V prípade silnejšieho prístroja (B') dochádzalo ku generovaniu ozónu i pomocou krátkovlnného ultrafialového žiarenia (súčasťou prístroja B' bola UV-lampa).

Tabuľka č. 1. Technické údaje zariadení vyvíjajúcich ozón

| Označenie prístroja | Názov prístroja | Produkcia ozónu | Napájanie | Príkion | Rozmery | Hmotnosť |
|---------------------|----------------------|-----------------|-----------|---------|---------------------|----------|
| A' | Trinizon 3500 family | 3,5 g/h | 230V | 55 W | 20 x 20 x 18 cm | 2.2 kg |
| B' | Noyes 20 000-MD | 20 g/h | 230 V | 200 W | 29,5 x 17,5 x 26 cm | 5,9 kg |

Schéma č. 2. Umiestnenie vzoriek a zariadenia vyvíjajúceho ozón v experimentálnej miestnosti



Dĺžka aplikácie ozónu bola zvolená s ohľadom na pokyny výrobcu konkrétneho zariadenia (odvíjala sa od veľkosti miestnosti) a u konkrétnych patogénov tiež prispôbená s ohľadom na získané výsledky v priebehu trvania celej štúdie. Zisťovaná bola účinnosť dvoj-, štvor- a šesť-hodinovej aplikácie ozónu. V priebehu experimentu boli dvere miestnosti utesnené látkou, aby došlo k minimalizácii únikov plynu mimo miestnosť. Koncentrácia plynného ozónu v rôznych častiach miestnosti (stanovišťa s umiestnenými vzorkami A, B, C, výstup prístroja, okno) bola počas experimentu monitorovaná zariadením Triotech HR-ZE25 s meracím rozsahom do 100 ppm. Jednorazové meranie prebehlo po úplnom nasýtení miestnosti plynmi a ustálení ich koncentrácie (1 hodinu po zapnutí prístroja vyvíjajúceho ozón a po opustení miestnosti osobou, ktorej úlohou bolo umiestniť meracie zariadenie na požadované stanovišťa). Po uplynutí doby aplikácie vstúpila do miestnosti osoba vybavená ochrannými pomôckami, ukončila chod prístroja a Petriho misky so vzorkami patogénov premiestnila do vzdialenej miestnosti, aby sa vylúčil vplyv predĺženej zostatkovvej koncentrácie ozónu vo vzduchu na vzorky. Vzorky sa v tejto miestnosti nechali voľne ležať ďalších minimálne 45 minút za účelom rozkladu prípadného zvyškového ozónu, ktorý potenciálne mohli obsahovať.

Overenie prežívateľnosti patogénov

Po 45 minútovom odležaní bola každá vzorka z Petriho misky prepipetovaná do Eppendorf skúmavky obsahujúcej 1500 μ l 2 % DMEM média. V prípade že bola vzorka po experimente v suchom stave,

bola z Petriho misky odobratá pomocou kvapky média, ktoré bolo na vzorku aplikované pipetou. Zmes vzorky a média bola prefiltrovaná cez bakteriologický filter (Sarstedt, Nemecko) do sterilných Eppendorf skúmaviek. Následne boli vzorky za aseptických podmienok inokulované do 24-jamkovej mikrotitračnej doštičky obsahujúcej monolayer CRFK buniek (Crandell-Rees Feline Kidney) (Sigma-Aldrich, USA). Kultivácia buniek infikovaných patogénmi prebiehala v termostate pri teplote 37 °C s 5 % koncentráciou oxidu uhličitého. Dĺžka kultivácie sa líšila v závislosti od konkrétneho patogénu (3 dni v prípade FCoV a CaCoV, 2 dni u FCV, 5 dní u FPV). Súčasne s kultiváciou vzoriek bola kultivovaná pozitívna a negatívna kontrola. Pozitívnu kontrolu tvorila vzorka patogénu aplikovaná na CRFK buncennú líniu bez predošlého vystavenia účinkov ozónu v rovnakej koncentrácii a množstve ako vzorka, na ktorú bol aplikovaný experimentálny zásah. Negatívnu kontrolu predstavovala CRFK línia buniek s 2 % DMEM médiom. Po uplynutí doby kultivácie boli vzorky za účelom kontroly prítomnosti cytopatického efektu (CPE) monitorované pod inverzným mikroskopom (Leico, Nemecko). Buncenné línie boli kontrolované i po uplynutí zvyčajnej doby kultivácie jednotlivých patogénov za účelom zachytenia prípadného oneskorenia nástupu cytopatického efektu. V prípade nejasného výsledku (prítomnosť viditeľných zmien na buncennej kultúre, no absencia cytopatického efektu typického pre daný patogén) boli vzorky prepasážované do novej kultivačnej nádoby a kultivované vyššie uvedeným spôsobom.

Štatistická analýza

Pre overenie vplyvu stanovišť na výskyt cytopatického efektu vírusov boli dáta získané z jednotlivých stanovišť analyzované pomocou štatistického softwaru Unistat 6.5 for Excel (Unistat Ltd., UK). Hodnotenie rozdielov v počtoch jamiek s výskytom cytopatického efektu v rámci jednotlivých stanovišť A, B a C bolo realizované χ^2 testom. Za štatisticky významnú bola považovaná hodnota $p \leq 0,05$.

Výsledky

V priebehu prevádzky generátorov bola vo vybraných častiach experimentálnej miestnosti monitorovaná koncentrácia ozónu; namerané hodnoty pre oba prístroje sú uvedené v tabuľke č. 2.

Tabuľka č. 2. Koncentrácia ozónu v miestnosti nameraná prístrojom Triotech HR-ZE25

| Miesto merania | Prístroj A' (ppm) | Prístroj B' (ppm) |
|------------------|-------------------|-------------------|
| stanovište A | 0,5-0,7 | 4,3-4,9 |
| stanovište B | 0,2 | 4,6-5,1 |
| stanovište C | 0,5 | 3,6-5 |
| výstup prístroja | 11,8-12 | 40-50 |
| okno | 0,5 | 3 |

Umiestnenie vzorky na konkrétne stanovište (A, B alebo C) nemalo vplyv na účinnosť aplikácie ozónu; rozdiel medzi počtom vzoriek, u ktorých bol spozorovaný cytopatický efekt sa naprieč stanovišťami nelíšil štatisticky významne ($p > 0,05$). Výsledky týkajúce sa viability patogénov v rámci jednotlivých experimentov sú uvedené v nasledujúcej časti kapitoly.

Overovanie viability FCoV a CaCoV

Výsledky týkajúce sa viability FCoV a CaCoV po aplikácii plynného ozónu sú uvedené v tabuľke č. 3. Vzhľadom na skutočnosť, že cytopatický efekt nebol u FCoV ani u CaCoV po 4 hodinách aplikácie ozónu prístrojom A' (prístroj so slabším výkonom) zistený, neboli experimenty s týmito patogénmi opakované po 6 hodinách. Z rovnakého dôvodu neboli experimenty opakované s prístrojom B' (prístroj s vyšším výkonom).

Tabuľka č. 3. Zhodnotenie viability FCoV a CaCoV po aplikácii plynného ozónu (CE+/-: prítomnosť/neprítomnosť cytopatického efektu)

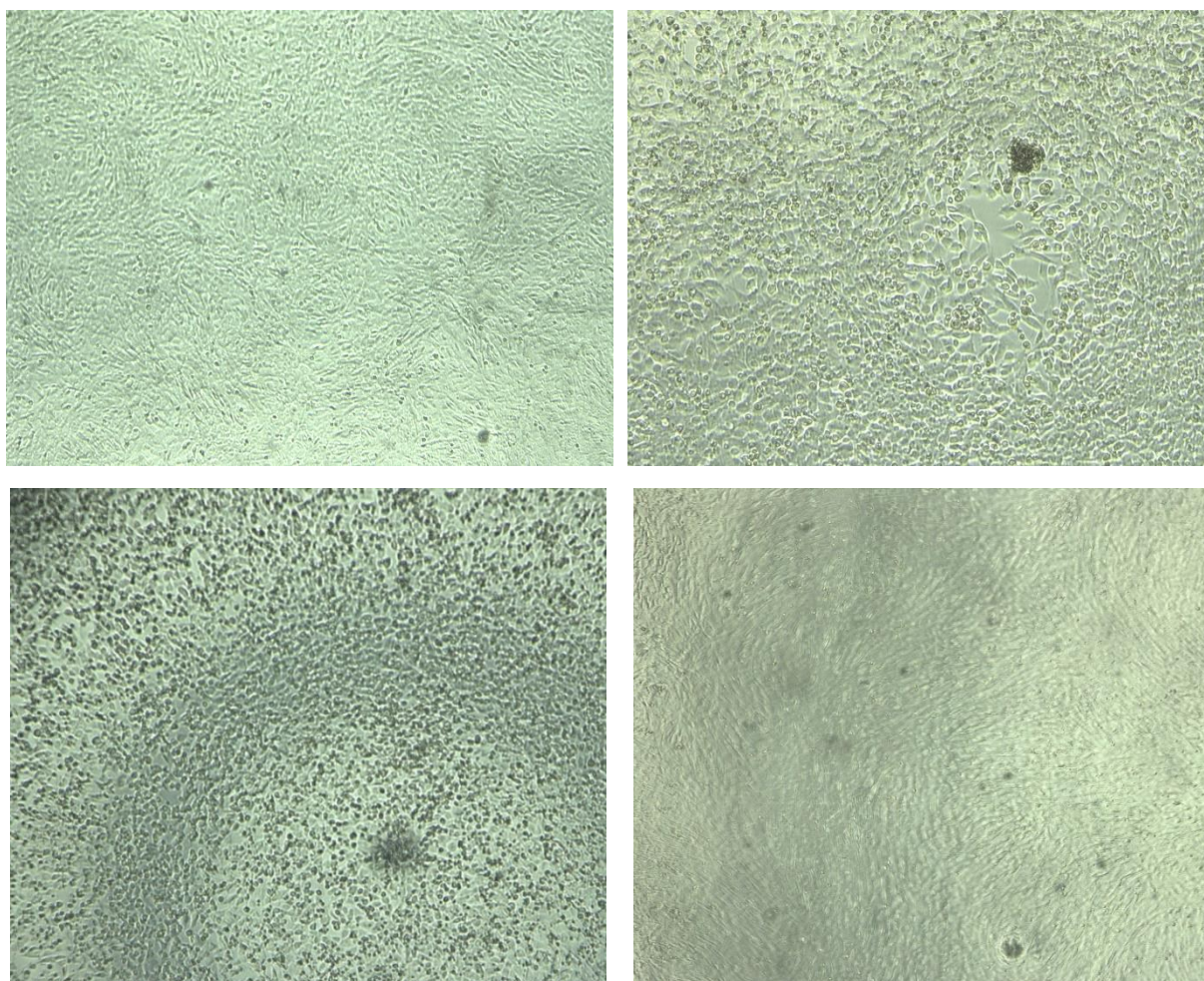
| patogén | koncentrácia | dĺžka expozície | použitý prístroj | Výsledok | | |
|---------|------------------|-----------------|------------------|---|---|---|
| | | | | Stanovište A (CE+/-; počet jamiek s CE) | Stanovište B (CE+/-; počet jamiek s CE) | Stanovište C (CE+/-; počet jamiek s CE) |
| FCoV | 10 ⁻³ | 2 hodiny | A' | - | - | - |
| FCoV | 10 ⁻⁴ | 2 hodiny | A' | - | - | - |
| FCoV | 10 ⁻³ | 4 hodiny | A' | - ^a | - ^a | - ^a |
| FCoV | 10 ⁻⁴ | 4 hodiny | A' | - ^a | - ^a | - ^a |
| CaCoV | 10 ⁻³ | 2 hodiny | A' | + (3/3) ^{*b} | + (3/3) [*] | + (3/3) [*] |
| CaCoV | 10 ⁻⁴ | 2 hodiny | A' | + (3/3) [*] | + (3/3) [*] | + (3/3) [*] |
| CaCoV | 10 ⁻³ | 4 hodiny | A' | - | - | - |
| CaCoV | 10 ⁻⁴ | 4 hodiny | A' | - | - | - |

* predĺžený nástup cytopatického efektu (po 72 hodinách bez cytopatického efektu, po 5 dňoch cytopatický efekt zistený)

^a viditeľné zmeny na bunkách, nie však cytopatický efekt – jednotlivé vzorky boli prepasávané (po prepasávaní nebol cytopatický efekt zistený)

^b viditeľné zmeny na bunkách – odchlípenie časti buniek od dna jamky

Fotografie č. 1 – 4. vľavo hore: negatívna kontrola – CRFK bunky bez prítomnosti patogénu; vpravo hore: cytopatický efekt CaCoV v koncentrácii 10⁻³ po 2 hodinovej expozícii ozónu produkovaného prístrojom A' (stanovište B); vľavo dole: pozitívna kontrola u FCoV; vpravo dole: zmena tvaru buniek – viditeľné pretiahnutie buniek u CaCoV



Overovanie viability FCV

Cytopatický efekt FCV nebol na CRFK bunkách zaznamenaný v prípade aplikácie plynného ozónu generovaného prístrojom B' po dobu 6 hodín. Všetky ostatné aplikácie ozónu viedli k potvrdeniu prežívateľnosti FCV spozorovaním cytopatického efektu (Tabuľka č. 4). 2 hodinová aplikácia plynného ozónu vyvíjaná prístrojom B' nebola testovaná vzhľadom na prežitie vírusu v podmienkach 4 hodinovej aplikácie.

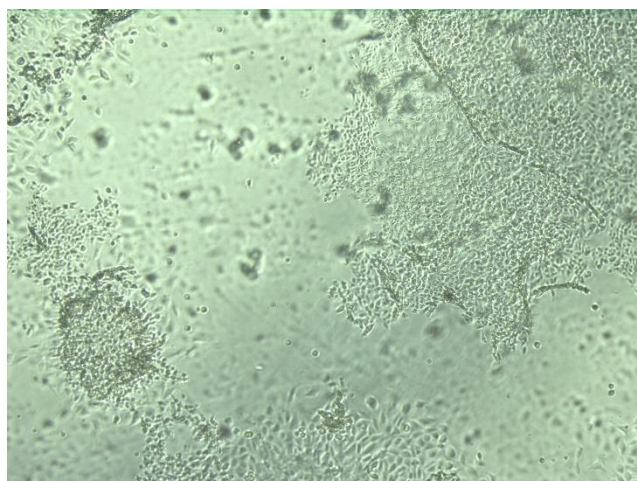
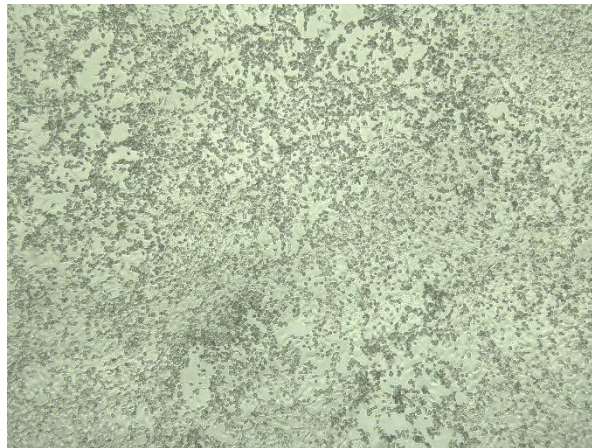
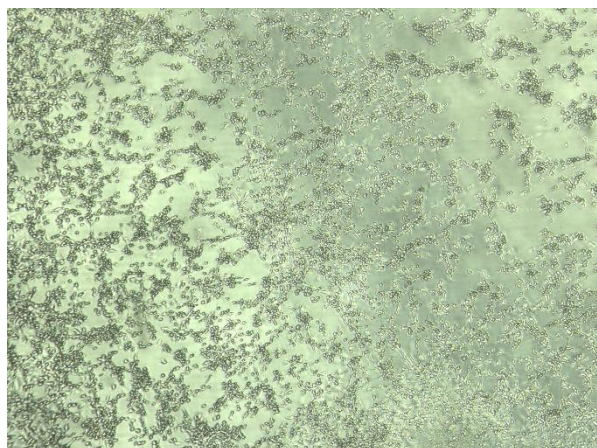
Tabuľka č. 4. Zhodnotenie viability FCV po aplikácii plynného ozónu (CE+/-: prítomnosť/neprítomnosť cytopatického efektu)

| patogén | koncentrácia | dĺžka expozície | použitý prístroj | Výsledok | | |
|---------|------------------|-----------------|------------------|---|---|---|
| | | | | Stanovište A (CE+/-; počet jamiek s CE) | Stanovište B (CE+/-; počet jamiek s CE) | Stanovište C (CE+/-; počet jamiek s CE) |
| FCV | 10 ⁻⁴ | 2 hodiny | A' | + (3/3) | + (3/3) | + (3/3) |
| FCV | 10 ⁻⁵ | 2 hodiny | A' | + (3/3) | + (3/3) | + (3/3) |
| FCV | 10 ⁻⁴ | 4 hodiny | A' | + (3/3) | + (3/3) | + (3/3) |
| FCV | 10 ⁻⁵ | 4 hodiny | A' | + (3/3) | + (3/3) | + (3/3) |
| FCV | 10 ⁻⁴ | 6 hodín | A' | + (3/3) ^b | + (3/3) | + (3/3) |
| FCV | 10 ⁻⁵ | 6 hodín | A' | + (3/3) ^b | + (3/3) | + (3/3) |
| FCV | 10 ⁻⁴ | 4 hodiny | B' | + (3/3) [*] | + (3/3) [*] | + (2/3) [*] |
| FCV | 10 ⁻⁵ | 4 hodiny | B' | + (3/3) [*] | + (1/3) [*] | + (3/3) [*] |
| FCV | 10 ⁻⁴ | 6 hodín | B' | - | - | - |
| FCV | 10 ⁻⁵ | 6 hodín | B' | - | - | - |

^b viditeľné zmeny na bunkách – odchlípenie časti buniek od dna jamky

^{*} predĺžený nástup cytopatického efektu – cytopatický efekt viditeľný po 5 dňoch kultivácie

Fotografie č. 5 – 7. vľavo hore: pozitívna kontrola – cytopatický efekt na CRFK bunkách spôsobený FCV; vpravo hore: cytopatický efekt FCV na CRFK bunkách v koncentrácii 10⁻⁵ spozorovaný po 2 hodinovej expozícii ozónu produkovaného prístrojom A' (stanovište C); dole uprostred: odchlípenie časti CRFK buniek od dna jamky



Overovanie viability FPV

Aplikácia ozónu neovplyvnila viabilitu FPV v žiadnom z experimentov (tabuľka č. 5). Cytopatický efekt bol na bunecnej línii spozorovaný i po 6 hodinovej aplikácii ozónu vyvíjaného prístrojom B'. Kratšia ako 4 a 6 hodinová expozícia nebola realizovaná vzhľadom k predpokladanej vysokej odolnosti vírusu.

Tabuľka č. 5. Zhodnotenie viability FPV po aplikácii plynného ozónu (CE+/-: prítomnosť/nepítomnosť cytopatického efektu)

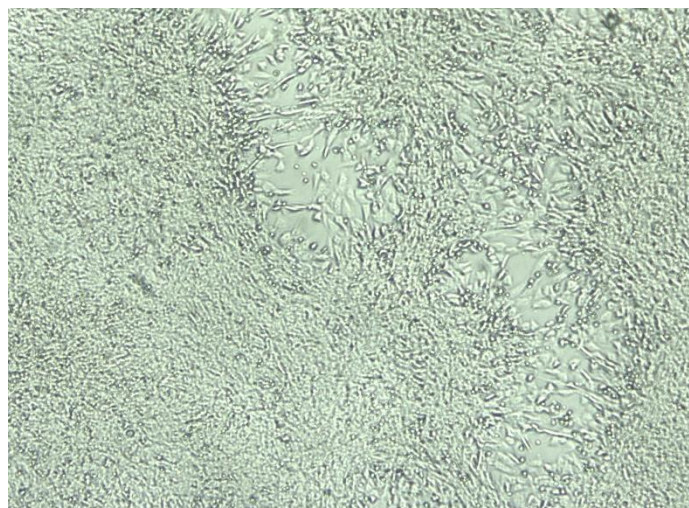
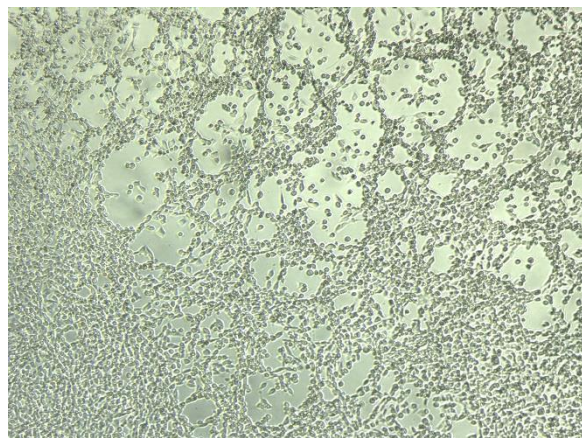
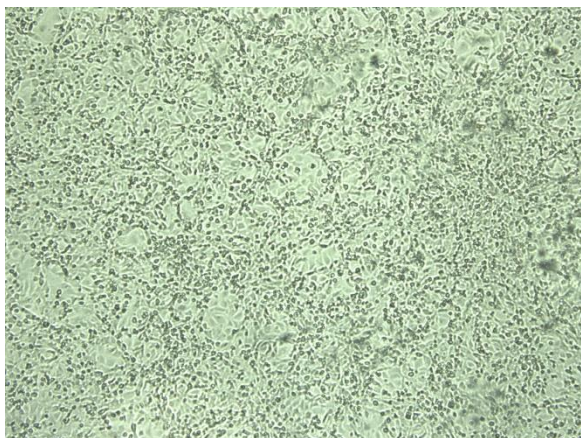
| patogén | koncentrácia | dĺžka expozície | použitý prístroj | Výsledok | | |
|---------|------------------|-----------------|------------------|---|---|---|
| | | | | Stanovište A (CE+/-; počet jamiek s CE) | Stanovište B (CE+/-; počet jamiek s CE) | Stanovište C (CE+/-; počet jamiek s CE) |
| FPV | 10 ⁻⁴ | 4 hodiny | A' | + (3/3) | + (3/3) | - (0/3) ^a |
| FPV | 10 ⁻⁵ | 4 hodiny | A' | + (3/3) | + (3/3) | + (1/3) |
| FPV | 10 ⁻⁴ | 6 hodín | A' | + (3/3) | + (3/3) | + (3/3) |
| FPV | 10 ⁻⁵ | 6 hodín | A' | + (3/3) | + (3/3) | + (3/3) |
| FPV | 10 ⁻⁴ | 6 hodín | B' | + (3/3) [*] | + (3/3) [*] | + (3/3) ^{b *} |
| FPV | 10 ⁻⁵ | 6 hodín | B' | + (3/3) [*] | + (3/3) [*] | + (3/3) [*] |

^a po prepasážovaní vzorky zistený cytopatický efekt

^b viditeľné zmeny na bunkách – odchlípenie časti buniek od dna jamky

* predĺžený nástup cytopatického efektu – cytopatický efekt nájdený po 6. dňoch kultivácie

Fotografie č. 8 – 10. vľavo hore: pozitívna kontrola FPV po kultivácii na CRFK bunecnej línii; vpravo hore: cytopatický efekt FPV nájdený po 5 dňovej kultivácii na CRFK bunkách v koncentrácii 10⁻⁴ (4 hodinová expozícia ozónu vyvíjaného generátorom A' (stanovište A)); dole uprostred: cytopatický efekt FPV nájdený na CRFK bunkách po 6 dňovej kultivácii v koncentrácii 10⁻⁴ (6 hodinová expozícia ozónu produkovaného prístrojom B' (stanovište C))



Diskusia

Používanie komerčne dostupných ozónových generátorov sa v poslednom období stalo veľmi vyhľadávaným k čomu prispela i pandémia SARS-CoV-2 a s ňou súvisiaci zvýšený záujem o rôzne, menej tradičné spôsoby dezinfekcie. Vzhľadom na to, že niektoré útulky (ale i chovateľské stanice a veterinárne pracoviská) zareagovali v snahe o maximalizáciu účinnosti dezinfekcie na ponuky výrobcov a distribútorov ozónových generátorov ich zakúpením a využívaním, bolo v našom záujme experimentálne overiť ich efektívnosť napriek tvrdeniam výrobcov, ktorí deklarujú elimináciu širokého spektra patogénov. K vyvíjaniu ozónu boli použité dva komerčne dostupné generátory s teoretickým výkonom 3,5 g/h (zariadenie A') a 20 g/h (zariadenie B'), reálna meraná koncentrácia však bola významne nižšia vzhľadom k jeho úniku, rozkladu a interakciám s materiálmi. Počas experimentu boli v prípade generátora A' v závislosti od umiestnenia meracieho prístroja detegované hodnoty ozónu na úrovni 0,2 – 0,7 ppm (pri vyústení generátora bola nameraná koncentrácia 12 ppm), u prístroja B' bola zaznamenaná koncentrácia od 3,6 do 5,1 ppm (pri vyústení generátora do 50 ppm). Hoci je ozón ťažší ako vzduch, jeho koncentrácia sa na jednotlivých stanovištiach so vzorkami umiestnenými v rôznej výške nelíšila. Nebol tiež zistený vplyv umiestnenia vzoriek na počet jamiek s buncovou kultúrou, v ktorých bol po kultivácii detegovaný cytopatický efekt.

K testovaniu boli vybrané patogény vírusového pôvodu s rôznym stupňom odolnosti, bežne sa vyskytujúce v útulkoch a ďalších zariadeniach s vyššou koncentráciou mačiek (FCoV, CaCoV, FCV a FPV). Koronavírusy patria medzi obalené RNA vírusy, ktorých eliminácia z prostredia je pomerne jednoduchá za použitia bežných dezinfekčných prostriedkov (Mullin, 2009), za odolnejší (vyznačujúci sa vysokou mierou rezistencie voči mnohým dezinfekčným prostriedkom ((Hofmann-Lehmann et al., 2022)) možno považovať felinný kalicivírus - neobalený RNA vírus, schopný prežívať v prostredí 1 mesiac (Clay et al., 2006). Extrémne dlhá doba prežívania v prostredí útulku (Horzinek et al., 2013) (i viac ako rok), odolnosť voči vysokým teplotám, nízkemu pH (Goto et al., 1974) a väčšine dezinfekčných prostriedkov na báze kvartérnych amóniových zlúčenín a alkoholu (Barrs et al., 2019) je charakteristická pre FPV - neobalený DNA vírus, ktorý je infikovanými mačkami vylučovaný do prostredia vo veľkých množstvách prostredníctvom slín, moču, trusu a zvratkov (Csiza et al., 1971).

Naše zistenia potvrdzujú trend prezentovaný vo vedeckých prácach, ktoré u obalených vírusov predpokladajú nižšiu odolnosť voči aplikácii plynného ozónu (Turkmen et al., 2015) pravdepodobne z dôvodu oxidácie lipidov obsiahnutých v obale (Dennis et al., 2020). Účinnosť ozónu ovplyvňuje okrem typu patogénu i niekoľko ďalších faktorov - koncentrácia ozónu, teplota a vlhkosť prostredia a doba expozície (Kim et al., 1999). Cytopatický efekt nebol u FCoV zistený už v prípade dvojhodinovej expozície ozónu generovaného prístrojom slabšieho výkonu, viabilita CaCoV bola narušená po 4-hodinovej expozícii. Zatiaľ čo nižšia koncentrácia ozónu a kratší expozičný čas boli k deaktivácii oboch typov koronavírusov dostačujúce, až 6-hodinová expozícia a vyššia koncentrácia ozónu vyvíjaná prístrojom B' bola potrebná k deaktivácii FCV. Aktivitu FPV sa nepodarilo potlačiť ani 6 hodinovou aplikáciou ozónu vo vyššej koncentrácii generovanej prístrojom B'. Zaznamenaný bol však predĺžený nástup cytopatického efektu, ktorý bol na buncovej línii spozorovaný po 6 dňoch od inokulácie. Obdobný fenomén bol zistený i v prípade 4 hodinovej aplikácie ozónu generovaného prístrojom B' na FCV a v prípade 2 hodinovej aplikácie ozónu generovaného prístrojom A' na CaCoV. Tieto zistenia poukazujú na vplyv pôsobenia ozónu i pri kratších expozičných časoch – je možné, že vystavenie vírusov účinkom ozónu ovplyvnilo mechanizmus napádania resp. deštrukcie buniek; iným vysvetlím by mohol byť scenár, v ktorom došlo k zníženiu celkovej koncentrácie vírusu (k deštrukcii časti vírusových partikul a teda k zníženiu virucidnej kapacity), čo sa prejavilo predĺženým nástupom cytopatického efektu.

Jeden z predajcov generátora A' uvádza v popise účinnosť proti baktériám, plesniam, vírusom a zápachom, iný predajca vyzdvihuje hlavne likvidáciu plesní a zápachu. Podľa oboch predajcov je generátor vhodný do priestorov vo veľkosti od 20 do 150 m²; v prípade veľkosti miestnosti, ktorá bola požitá pre účely tejto štúdie je odporúčaný čas aplikácie 6 hodín. Predajca zariadenia B' deklaruje

efektívne odstránenie pachov, plesní, karcinogénnych a alergénnych mikroorganizmov v podlahách, na stenách a stropoch; iný poskytovateľ, u ktorého je možné dané zariadenie za poplatok zapožičať uvádza navyše dezinfekciu vírusov a baktérií, alergénov, hmyzu, roztočov. Tento generátor je primárne určený do miestností o veľkosti do 56 m³, ale podľa výrobcu môže byť použitý i vo väčších miestnostiach ak sa čas aplikácie ozónu predĺži. Odporúčaný čas aplikácie v miestnostiach do 56 m³ je 40 minút, v našej štúdiu bol však čas aplikácie predĺžený až na 6 hodín. Na základe výsledkov možno konštatovať, že očakávaný virucídny efekt deklarovaný výrobcom v prípade dodržania časových pokynov aplikácie bol iba čiastočný – z patogénov podrobených testovaniu nebol cytopatický efekt po aplikácii spozorovaný iba u koronavírusov. Hoci sa podarilo aplikáciou ozónu vyvíjaného prístrojom B' eliminovať i FCV, časová expozícia bola v prípade tohto patogénu oproti odporúčeniu výrobcu 6-násobne navýšená – pri dodržaní času uvedeného výrobcom by aplikácia nebola účinná. Hodnotenie pôsobenia plynného ozónu na FCV bolo i predmetom štúdie od Hudson et al. (2007) – autori štúdie potvrdili inaktiváciu vírusu plynným ozónom vyrábaným ozónovým generátorom; koncentrácia ozónu však bola v tomto prípade oproti vyvíjanej koncentrácii našim prístrojom 5 násobne vyššia (20-25 ppm). Pri vyššej koncentrácii je postačujúca kratšia expozícia – v danej štúdiu to bolo iba 20 minút.

Hoci bola v našej štúdiu u neobalených vírusov aplikácia ozónu v prípade dodržania pokynov výrobcov neúčinná, môže nami pozorovaná absencia cytopatického efektu u obalených koronavírusov naznačovať zmysel využívania generátorov aspoň u tohto typu patogénov. Elimináciou FCoV z prostredia s vyššou koncentráciou mačiek sa dosiahne zníženie miery prenosu infekcie medzi zvieratami, čo nepriamo vplýva i na zníženie incidencie rozvoja felinnej infekčnej peritonitídy, ktorá môže vzniknúť ako dôsledok mutácie enterickej formy koronavírusu (Pedersen, 2014). Je však potrebné poznamenať, že účinnosť aplikácie ozónu môže byť v reálnych podmienkach útlakov a ďalších zariadení významne znížená oproti experimentálnym podmienkam. Do prostredia je FCoV zvieratami vylučovaný v truse (Addie a Jerrett, 1992); zvieratá však môžu priamym kontaktom s trusom a podstielkou preniesť vírus i do ďalších častí ustajnenia, ktoré sú zvyčajne tvorené rôznymi povrchmi. V rámci tejto štúdie prebehlo testovanie účinnosti aplikácie ozónu iba na plastovom povrchu Petriho misky; okrem toho neboli k testovaniu využité reálne vzorky trusu (použité boli vírusové izoláty obsiahnuté v tekutom médiu).

Potenciálne využitie ozónových generátorov na elimináciu koronavírusov bolo študované hlavne v súvislosti s patogénmi napádajúcimi človeka; mnohé z prác boli podnietené pandémiou COVID-19, ktorá upriamila pozornosť na potrebu dodržiavania hygienických štandardov. Vzhľadom k tomu, že manipulácia s SARS-CoV-2 vyžaduje biologickú bezpečnosť tretej úrovne boli vo výskumných prácach využívané náhradné, biologicky bezpečné patogény (napr. koronavírusy rodu Alpha - HCoV-229E (Lee et al., 2021), influenza A vírus a respiračný syncytiálny vírus a rada ďalších (Irie et al., 2022)) s podobnou formou, štruktúrou a funkciou. Výsledky štúdií priniesli odlišné závery o efektívite aplikácie ozónu na tieto patogény; koncentrácia ozónu sa v prácach pohybovala od 0,1 do 200 ppm, čas aplikácie od 13,8 sekúnd do 320 minút. Vysoké koncentrácie ozónu však boli dosiahnuté z dôvodu využitia komôr a iných malých uzatvorených systémov (Irie et al., 2022), brániacich úniku ozónu; tieto experimentálne systémy sú však vzdialené reálnym podmienkam v prípade potreby dezinfekcie väčších priestorov. Testovaniu účinkov plynného ozónu vyvíjaného generátormi na vybrané patogény v reálnych podmienkach priestorov o 3 rôznych veľkostiach (22,5, 62 a 87,5 m³) sa zaoberalo Národné referenčné laboratórium pre dezinfekciu a sterilizáciu Štátneho zdravotného ústavu Českej republiky. Koncentrácia ozónu sa v týchto priestoroch pohybovala od 6,3 do 34 ppm a doba aplikácie od 20 minút do 4 hodín a 9 minút. Baktericídny, fungicídny ani virucídny účinok nebol preukázaný v žiadnom z experimentov (Kotlík et al., 2021).

Ozón je nestabilný plyn a rýchlosť jeho rozpadu závisí najmä od teploty a vlhkosti prostredia, čo v konečnom dôsledku ovplyvňuje jeho účinnosť; pri zvýšení teploty a vlhkosti sa polčas rozpadu skraca (McClurkin et al., 2013). Údaje týkajúce sa polčasu rozpadu sa v literatúre líšia i v závislosti od typu média, v ktorom sa ozón nachádza – v prípade rozptýlenia vo vzduchu to môže byť 0,5 hod. ale i 25,4 hodiny za podmienok absencie prúdenia vzduchu, teploty 24 °C a nulovej vlhkosti

(McClurkin et al., 2013), vo vodnom prostredí uvádza literatúra polčas rozpadu ozónu 330 sekúnd pri teplote 25 °C. Na polčas rozpadu vo vodnom prostredí má vplyv i pH – čím je jeho hodnota vyššia, tým kratší je polčas rozpadu (Harding et al., 2013). V priebehu trvania štúdie sme opakovaním experimentov nastavili čas odležania vzoriek po vystavení účinkom ozónu na minimálne 45 minút vzhľadom na to, že v prípade absencie tejto doby sme v jamkách kultivačnej nádoby (mikrotitračná doštička) pozorovali zmeny na bunecnej kultúre prejavujúce sa odchlípením vrstvy buniek a deštrukciu bunecného monolayeru (fotografia č. 6). Predpokladáme, že k deštrukcii buniek došlo z dôvodu pôsobenia zvyškového ozónu resp. jeho voľných radikálov (peroxid vodíka a hydroxyl), ktoré vznikli rozložením ozónu v tekutine (v DMEM médiu, ktoré bolo použité k výžive CRFK buniek). Iným vysvetlením deštrukcie by mohla byť prítomnosť a vplyv zlúčenín dusíka na bunky v tekutom prostredí zmieneneho média. V prípade prístrojov, ktoré využívajú k výrobe ozónu vzduch, vznikajú totiž okrem tohto plynu i ďalšie medziprodukty ionizácie vzduchu – z ionizovaných molekúl kyslíka a dusíka dochádza k tvorbe dvojatómových molekúl O₂, N₂ a ich kombinácií (NO, NO₂). Prítomnosť oxidu dusičitého (NO₂) bola v experimentálnej miestnosti počas aplikácie ozónu potvrdená meracím prístrojom BW GasAlert Micro 5. Koncentrácia NO₂ sa v prostredí (na stanovištiach A, B, C, v blízkosti dverí a okna miestnosti) pohybovala na úrovni 0,5-1 ppm, pri výstupe generátora ozónu bola vyššia ako 20 ppm. Z pohľadu životnosti generátorov je ideálne ak je do prístroja vháňaný čo najsušší vzduch; vlhký vzduch produkujúci oxidy dusíka spôsobuje poškodenie generátora. Efektivita prístroja je tiež ovplyvnená vstupným plynom - v prípade, že je ním vzduch dochádza k tvorbe 1–3 % ozónu, zatiaľ čo pri použití čistého kyslíka sa tvorba ozónu zvyšuje na 16 % (Prabha et al. 2015). Každopádne, predĺženie času voľného ponechania vzoriek bez ďalšieho vplyvu ozónu (resp. zlúčenín dusíka) pravdepodobne malo efekt na výskyt poškodenia bunecného monolayeru, keďže po tomto opatrení sa poškodenie objavilo iba sporadicky.

Otázkou využívania ozónových generátorov je nie len ich účinnosť ale i bezpečnosť. K inaktivácii FPV, ktorého cytopatický efekt bol na bunecnej línii zistený i napriek 6 hodinovej aplikácii ozónu, by bolo pravdepodobne potrebné vyvinúť vyššie koncentrácie ozónu, čo je v prípade aplikácie ozónu v podmienkach väčších miestností (v ktorých navyše dochádza k únikom plynu cez okná a dvere) a za použitia komerčne dostupných generátorov obtiažne. Inaktiváciu odolnejších vírusov by bolo teoreticky možné dosiahnuť predĺžením aplikácie ozónu – už šesť hodinová expozícia je však z hľadiska použitia v útlkoch a iných zariadeniach s vyššou koncentráciou zvierat nepraktická. Navyše má ozón silné dráždivé účinky na očné spojivky a dýchacie cesty a vo vyšších koncentráciách môže spôsobiť sťažené dýchanie a zápalovú reakciu slizníc dýchacích ciest. Krátkodobé akútne účinky prejavujúce sa drážením očí sa môžu u človeka objaviť pri koncentráciách ozónu okolo 200 µg/m³ (0,1 ppm). Hodinová expozícia 0,5 ppm môže mať výrazne škodlivé účinky (Kotlík et al., 2021). Podľa WHO by koncentrácia ozónu nemala prekročiť 100 µg/m³ v rámci 8 hodinového priemeru (WHO, 2021). Podľa legislatívy ČR sú limity ozónu pre človeka stanovené Nařízením vlády č. 361/2007 Sb., ktorým sa stanoví podmienky ochrany zdravia při práci; přípustný expoziční limit je 0,1 mg/m³ (v rámci 8 hodinového priemeru), najvyššia přípustná koncentrácia 0,2 mg/m³ (koncentrácia látky meraná po dobu najviac 15 minút). Medzná hodnota ozónu bola stanovená i pre rôzne druhy zvierat - u mačiek uvádza Mittler et al. (1956) hodnotu LC₅₀ v prípade 3 hodinovej expozície ozónu 34,5 ppm. Predajcovia generátorov používaných v tejto štúdii upozorňujú na možné negatívne účinky na zdravie ľudí a zvierat – v priebehu aplikácie by sa zvieratá ani osoby nemali pohybovať v ošetrovanom priestore a po ošetrení sa tieto priestory odporúčajú nechať dôkladne vyvetrať po dobu 30 až 60 minút. Hoci môže dôjsť využívaním (a to platí najmä u generátorov s vyšším výkonom) v prípade nedodržania pokynov k narušeniu zdravia zvierat a osôb, nie je predaj ozónových generátorov v Českej republike regulovaný a zakúpiť si ho môže prakticky ktokoľvek.

Nutnosť premiestnenia zvierat z ošetrovaných priestorov je jednou z hlavných nevýhod využívania ozonových generátorov. V prípade využívania generátorov, ktorých výkon nepresahuje množstvo generovaného ozónu nad bezpečnostný limit tak, aby mohli byť zapnuté i v prítomnosti zvierat, je ich účinnosť veľmi nízka alebo prakticky absentuje. Tento fakt zdôrazňuje aj US EPA (United States Environmental Protection Agency), ktorá sa k aplikácii ozónu za účelom čistenia vzduchu vyjadrila

v stanovisku – sumarizuje v ňom, že pri použití ozónu v koncentráciách, ktoré neprekračujú normy verejného zdravia, nemá ozón baktericídne a virucídne účinky, neodstraňuje plesne ani iné znečisťujúce látky (US EPA, 2022).

Záver

Záverom možno konštatovať, že výsledky tejto štúdie nadväzujú na zistenia iných autorov, ktoré u obalených vírusov predpokladajú nižšiu odolnosť voči aplikácii plynného ozónu. Na základe našich zistení tiež možno predpokladať určitú mieru dezinfekčného potenciálu v prípade FCoV a CaCoV; virucídny efekt je ale otázný v prípade reálnych podmienok chovov (vzorky trusu rôznej konzistencie na rôznych povrchoch), ktoré neboli predmetom tejto štúdie. K dosiahnutiu virucídneho efektu je u odolnejších patogénov nutné vyvinúť vyššie koncentrácie ozónu, čo je v prípade použitia komerčne dostupných generátorov obtiažne; koncentrácia ozónu by sa navyiac mala udržiavať v prípustných hladinách, ktoré sú bezpečné pre zvieratá a človeka.

Podakovanie

Za spoluprácu, konzultácie a zapožičanie prístrojového vybavenia (ozónového generátora Noyes 20 000-MD a zariadení na monitoring NO₂) by sme radi poďakovali kolektívu Hasičského záchranného zboru Juhomoravského kraja (menovite predovšetkým kpt. Mgr. Pavlovi Kukletovi). Za spoluprácu a zapožičanie prístroja na meranie koncentrácie O₃ ďakujeme Ing. Karolovi Hrdličkovi, za zapožičanie generátora Trinizon 3500 family ďakujeme Lucii Pokorovej. Za pomoc s prípravou vzoriek, bunečných kultúr a konzultácie ďakujeme Alene Gregrovej, Mgr. Lucii Janiček Hrubej, Mgr. Kláre Klíčovej a MVDr. Dobromile Molinkovej, Ph.D.

Táto štúdia bola podporená ITA VETUNI (projekt č. 2022ITA21).

Literatúra

- Addie D.D., Jarrett O. 1992. Feline coronavirus antibodies in cats. *Veterinary Record* 131: 202-203.
- Barrs, V.R. 2019. Feline panleukopenia: a re-emergent disease. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 49: 651-670.
- Cattel, F., Giordano, S., Bertiond, C., Lupia, T., Corcione, S., Scaldaferrì, M., Angelone, L., De Rosa, F.G. 2021. Ozone therapy in COVID-19: A narrative review. *Virus Research* 291: 198207.
- Clay, S., Maherchandani, S., Malik, Y.S., Goyal, S.M. 2006. Survival on uncommon fomites of feline calicivirus, a surrogate of noroviruses. *American Journal of Infection Control* 34: 41-43.
- Cristiano, L. 2020. Could ozone be an effective disinfection measure against the novel coronavirus (SARS-CoV-2)? *Journal of Preventive Medicine and Hygiene* 61: E301.
- Csiza, C.K., Scott, F.W., De Lahunta, A., Gillespie, J.H. 1971. Pathogenesis of feline panleukopenia virus in susceptible newborn kittens I. Clinical signs, hematology, serology, and virology. *Infection and Immunity* 3: 833-837.
- Dennis, R., Cashion, A., Emanuel, S., Hubbard, D. 2020. Ozone gas: scientific justification and practical guidelines for improvised disinfection using consumer-grade ozone generators and plastic storage boxes. *Journal of Science and Medicine* 2: SAND-2020-3866J.
- Goto, H., Yachida, S., Shirahata, T., Shimizu, K. 1974. Feline panleukopenia in Japan. I. Isolation and characterization of the virus. *Nihon Juigaku Zasshi* 36: 203-211.
- Guzel-Seydim, Z.B., Greene, A.K., Seydim, A.C. 2004. Use of ozone in the food industry. *LWT-Food Science and Technology* 37: 453-460.
- Harding, K.G., Ntimbani, R., Mashwama, P., Mokale, R., Mothapo, M., Gina, N., Gina, D. 2013. Decomposition of ozone in water. *Chemical Technology* 6-10.
- Hofmann-Lehmann, R., Hosie, M.J., Hartmann, K., Egberink, H., Truyen, U., Tasker, S., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Frymus, T., Lloret, A., Marsilio, F. 2022. Calicivirus Infection in Cats. *Viruses* 14: 937.

- Horzinek, M.C., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., Lutz, H. 2013. ABCD: Update of the 2009 guidelines on prevention and management of feline infectious diseases. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 15: 530-539.
- Hudson, J.B., Sharma, M., Petric, M. 2007. Inactivation of Norovirus by ozone gas in conditions relevant to healthcare. *Journal of Hospital Infection* 66: 40-45.
- Hudson, J.B., Sharma, M., Petric, M. 2007. Inactivation of Norovirus by ozone gas in conditions relevant to healthcare. *Journal of Hospital Infection* 66: 40-45.
- Irie, M.S., Dietrich, L., Souza, G.L.D., Soares, P.B.F., Moura, C.C.G., Silva, G.R.D., Paranhos, L.R. 2022. Ozone disinfection for viruses with applications in healthcare environments: A scoping review. *Brazilian Oral Research* 36: 006.
- Khadre, M.A., Yousef, A.E., Kim, J.G. 2001. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *Journal of Food Science* 66: 1242-1252.
- Kim, J.G., Yousef, A.E., Dave, S. 1999. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *Journal of Food Protection* 62: 1071-1087.
- Kotlík, B., Melicherčíková, V., Urban, J., Matějka, J. 2021. Testování nově vyvíjených technologií sanitace povrchů a vzduchu ve vnitřních prostorech budov. *Hygiena* 66: 16-23.
- Lee, J., Bong, C., Lim, W., Bae, P.K., Abafogi, A.T., Baek, S.H., Shin, Y.B., Bak, M.S., Park, S. 2021. Fast and easy disinfection of coronavirus-contaminated face masks using ozone gas produced by a dielectric barrier discharge plasma generator. *Environmental Science & Technology Letters* 8: 339-344.
- Loeb, B.L., Thompson, C.M., Drago, J., Takahara, H., Baig, S. 2012. Worldwide ozone capacity for treatment of drinking water and wastewater: A review. *Ozone: Science & Engineering* 34: 64-77.
- McClurkin, J.D., Maier, D.E., Ileleji, K.E. 2013. Half-life time of ozone as a function of air movement and conditions in a sealed container. *Journal of Stored Products Research* 55: 41-47.
- Mittler, S., Hedrick, D., King, M., Gaynor, A. 1956. Toxicity of ozone. I. Acute toxicity. *Industrial Medicine and Surgery* 25: 301-6.
- Mullin, C.H., 2009. Feline infectious peritonitis. In: Miller, L., Hurley K.F. (Eds.): *Infectious disease management in animal shelters*, Wiley-Blackwell, Iowa, pp. 319-30.
- Murray, B.K., Ohmine, S., Tomer, D.P., Jensen, K.J., Johnson, F.B., Kirsi, J.J., Robison, R.A., O'Neill, K.L. 2008. Virion disruption by ozone-mediated reactive oxygen species. *Journal of Virological Methods* 153: 74-77.
- Nařízení vlády č. 361/2007 Sb., kterým se stanoví podmínky ochrany zdraví při práci. In: ASPI [právní informační systém]. Wolters Kluwer ČR [vid. 27. 11. 2022].
- Newbury, S., Blinn, M.K., Bushby, P.A., Cox, C.B., Dinnage, J.D., Griffin, B., Hurley, K.F., Isaza, N., Jones, W., Miller, L., O'Quin, J. 2010. Guidelines for standards of care in animal shelters [online]. [vid. 27. 11. 2022]. Dostupné z: <https://www.shelternet.org/assets/docs/shelter-standards-oct2011-wforward.pdf>
- Newbury, E., Miller, L. 2018. Biosecurity in shelters. In: Dean, R., Roberts, M., Stavisky, J. (Eds.): *BSAVA manual of canine and feline shelter medicine. Principles of health and welfare in a multi-animal environment*. British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, pp. 112-125.
- Pedersen, N.C. 2014. An update on feline infectious peritonitis: virology and immunopathogenesis. *The Veterinary Journal* 201: 123-132.
- Prabha, V.I.T.H.U., Barma, R.D., Singh, R.A.N.J.I.T., Madan, A. 2015. Ozone Technology in Food Processing: A Review. *Trends in Biosciences* 8: 4031-4047.
- Stoddart, C.A., Barlough, J.E., Baldwin, C.A., Scott, F.W. 1988. Attempted immunisation of cats against feline infectious peritonitis using canine coronavirus. *Research in Veterinary Science* 45: 383-388.
- Tseng, C., Li, C. 2008. Inactivation of surface viruses by gaseous ozone. *Journal of Environmental Health* 70: 56-63.

- Turkmen, A., Kesici, S., Elmali, N., Cangir, C.C., Cakirguz, M. 2015. Chronic hepatitis B and ozone therapy. *Journal of Medical Case Reports* 3: 38-39.
- US EPA, 2022. Ozone generators that are sold as air cleaners [online]. [vid. 27. 11. 2022]. Dostupné z: <https://www.epa.gov/indoor-air-quality-iaq/ozone-generators-are-sold-air-cleaners>
- Victorin, K. 1992. Review of the genotoxicity of ozone. *Mutation Research* 277: 221-238.
- WHO, 2021. Ambient (outdoor) air pollution [online]. [vid. 27. 11. 2022]. Dostupné z: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health)
- Wysok, B., Uradziński, J., Gomółka-Pawlicka, M. 2006. Ozone as an alternative disinfectant-A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 15: 3.

Stanovení poměru proteinu ke kreatininu v moči štěňat různého věku

Simona Kovaříková, Jana Blahová, Petr Maršálek

Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI

Abstrakt

Některé hematologické a biochemické parametry jsou u psů ovlivněny věkem. Poměrně málo ale víme o vlivu věku na parametry moči, zejména ukazatele proteinurie. Cílem této práce tak bylo posouzení poměru proteinu ke kreatininu v moči štěňat různého věku a jejich porovnání s kontrolní skupinou psů starších jednoho roku a také s obecnými referenčními hodnotami a následně zjištění, zda má věk vliv na tento parametr. Vzorky moč byly získávány spontánní mikcí od štěňat různého věku a dospělých psů starších jednoho roku. Bylo provedeno základní klinické vyšetření moči a následně spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinu a kreatininu pomocí komerčních kitů. Koncentrace proteinu byla stanovována dvěma metodami (s benzethonium chloridem a pyrogalolovou červení), koncentrace kreatininu byla stanovována pomocí Jaffého metody. Následně byl vypočítán poměr proteinu ke kreatininu v moči. Bylo zjištěno, že věk má signifikantní vliv na poměr proteinu ke kreatininu v moči psů, kdy u štěňat byly zjištěny nejvyšší hodnoty, které se postupně snižovaly. Ukázalo se také, že u štěňat není možné použít obecná referenční rozmezí, neboť to vede k nesprávnému vyhodnocení přítomnosti proteinurie. Druhým cílem bylo vytvoření referenčního rozmezí pro ty věkové kategorie, kde to počet získaných vzorků dovozoval. Pro šestitýdenní štěňata byl pro UPC vytvořen referenční interval 0,2-1,7.

Úvod

Proteinurie představuje u psů senzitivní ukazatel onemocnění ledvin (Baumgartner et al., 2022). U psů s proteinurií je zvýšené riziko mortality z renálních příčin ve srovnání s neproteinurickými psy (Remuzzi and Bertain, 1998; Benali et al., 2014; Miyakawa et al., 2021). Detekce proteinurie u pacientů s onemocněním ledvin je tak předmětem zájmu veterinárních lékařů. Přítomnost bílkoviny v moči může být u psů zjišťována několika způsoby. Mezi semikvantitativní metody řadíme zhodnocení pomocí diagnostického proužku a test s kyselinou sulfosalicylovou. Ke kvantifikaci se ve veterinární medicíně používá stanovení poměru proteinu ke kreatininu (UPC, *urine protein to creatinine ratio*), který představuje alternativu 24hodinového sběru moči, který se používá u lidí (Roura et al., 2017).

V případě stanovení UPC byla původně stanovená hranice pro detekci proteinurie hodnota 1,0, nicméně ta byla později snížena na v současnosti používanou hodnotu 0,5. Vzorky s UPC nižším než 0,2 jsou považovány za neproteinurické, hodnoty UPC v rozmezí 0,2-0,5 znamenají hraniční proteinurii (Lees et al., 2005).

Onemocnění ledvin typicky postihuje starší psy, nicméně může se objevit v jakémkoliv věku, včetně štěňat (Bartges, 2012). Včasná diagnostika je v tomto případně esenciální. Jestliže hodnotíme laboratorní výsledky pacientů, měli bychom je ideálně srovnávat s referenčními rozmezími vytvořenými pro stejnou věkovou kategorii, neboť v minulosti již byl popsán vliv věku na některé hematologické a biochemické parametry (Misbach et al., 2014; Rosset et al., 2012; Rørtveit et al., 2015; Wolford et al., 2016). O vlivu věku na hodnoty UPC máme ale jen kusé informace (Lane et al., 2000; Schäfer-Somi et al., 2005; Marynissen et al., 2017). Cílem této práce je tak zhodnocení UPC u štěňat různého věku a porovnání výsledků s kontrolní skupinou tvořenou psy staršími jednoho roku a obecným referenčním rozmezím definovaným dle International Renal Interest Society (IRIS) a tak posouzení vlivu věku na tento parametr. Druhým cílem je vytvoření referenčního rozmezí pro ty věkové kategorie, kde to bude počet získaných vzorků moči dovozoval.

Materiál a metodika

Vzorky moči byly získány od klinicky zdravých štěňat různého věku a dospělých psů pomocí spontánní mikce. Štěňata byla rozdělena do skupin podle věku (6 týdnů, 2–3 měsíce, 3–4 měsíce, 4–6 měsíců a mladí psi 6–12 měsíců). Bylo vyšetřeno celkem 371 vzorků moči. Do studie bylo zařazeno 140 šestitýdenních štěňat (70 psů a 70 fen), 42 štěňat ve věku 2–3 měsíce (19 psů a 23 fen), 32 štěňat ve věku 3–4 měsíce (19 psů a 13 fen), 52 štěňat ve věku 4–6 měsíců (20 psů a 31 fen) a 50 mladých psů (28 psů a 22 fen) ve věku 6–12 měsíců. Kontrolní skupina byla tvořena 55 psy staršími jednoho roku (průměrný věk 6,4 roku). Ve skupině bylo 24 psů (z toho 3 kastrování) a 31 fen (z toho 15 kastrování).

U všech vzorků bylo provedeno zjištění základních fyzikálních a chemických vlastností (posouzení barvy a přítomnosti zákalu, zjištění hustoty pomocí ručního refraktometru a semikvantitativní vyšetření diagnostickým proužkem) a vyšetření močového sedimentu. Do studie nebyly zařazeny vzorky, u kterých byla pomocí diagnostického proužku zjištěna přítomnost krve a ani vzorky, kde byla vyšetřením močového sedimentu zjištěna pyurie (přítomnost leukocytů vyšší než 5 v zorném poli při velkém zvětšení). Následně byly vzorky odstředěny (3 000 otáček po dobu 3 minut) a pro další analýzu byl použit pouze supernatant. Koncentrace proteinu i kreatininu byly zjišťovány fotometricky s využitím biochemického analyzátoru Konelab 20i (Thermo Fisher Scientific).

Koncentrace proteinu byla měřena dvěma metodami: pomocí komerčního kitu Abbott s benzethonium chloridem a kitu Biovendor s pyrogalolovou červení. Koncentrace kreatininu byla zjišťována Jaffého metodou. Následně byl vypočítán poměr proteinu ke kreatininu.

Pro statistické zhodnocení získaných dat byl použit program Unistat for Excel 6.5. Vzhledem k tomu, že data nevykazovala normální rozdělení (Shapiro-Wilkův test), byl pro další testování rozdílů mezi skupinami použit neparametrický test (vícevýběrový mediánový test). Pokud se koncentrace proteinu nacházela pod mezí stanovitelnosti (68 mg/l), byla pro statistické zpracování použita polovina této hodnoty (34 mg/l). Referenční rozmezí bylo stanoveno pro skupinu šestitýdenních štěňat pomocí programu Reference Value Advisor.

Hodnoty UPC byly porovnány s obecným referenčním rozmezím, vzorky s UPC nad 0,5 byly považovány za proteinurické, hodnoty 0,2–0,5 představovaly hraniční proteinurii, hodnoty UPC nižší než 0,2 byly vyhodnoceny jako neproteinurické.

Výsledky

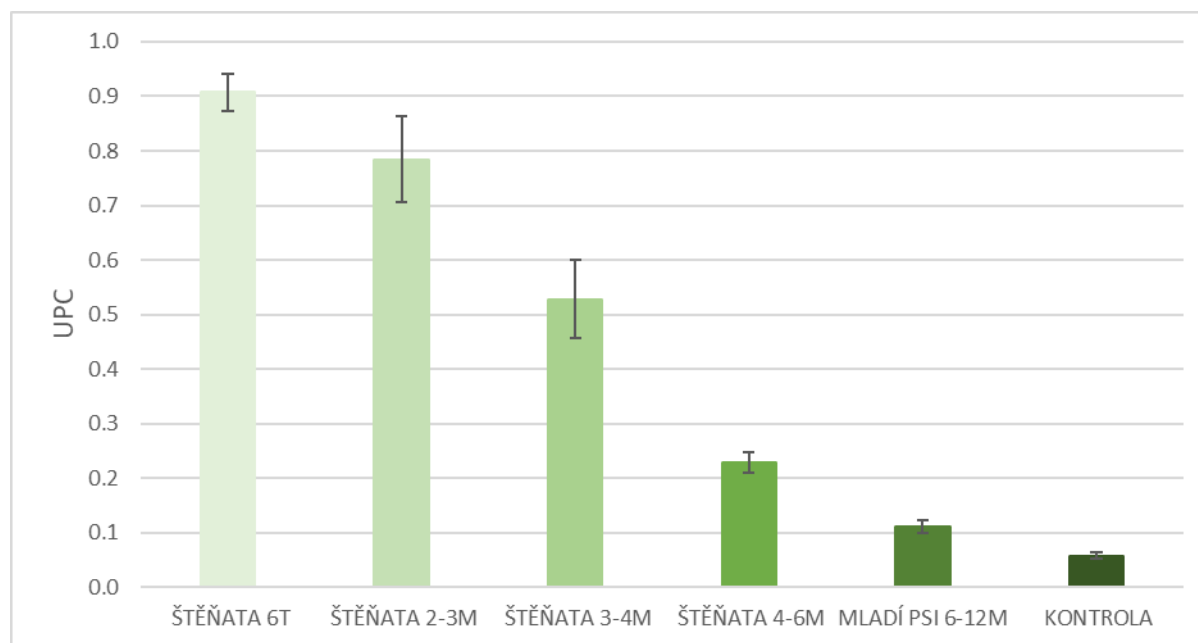
Při srovnání výsledků základního vyšetření moči nebyly mezi skupinami zjištěny statisticky významné rozdíly. Obě metody stanovení koncentrace proteinu vykazovaly shodu. Výsledky stanovení koncentrace proteinu a kreatininu v moči a hodnoty UPC jsou uvedeny v tabulce 1. U šestitýdenních štěňat, štěňat ve věku 3–4 a 4–6 měsíců byla zjištěna statisticky vysoce významně vyšší koncentrace proteinu v moči ve srovnání s kontrolní skupinou ($p < 0,01$), při porovnání štěňat ve věku 2–3 měsíce byla zjištěna statistická významnost ($p < 0,05$). U šestitýdenních štěňat, štěňat ve věku 2–3 měsíce a 3–4 měsíce byla zjištěna statisticky vysoce významně vyšší hodnota UPC ve srovnání s kontrolou (graf 1). Při srovnání výsledků jednotlivých skupin s obecným referenčním rozmezím bylo zjištěno se zvyšujícím se věkem postupně se snižující počet proteinurických vzorků ve prospěch neproteinurických (graf 2).

Referenční rozmezí UPC bylo vytvořeno pro skupinu šestitýdenních štěňat a bylo stanoveno s hodnotami 0,2–1,7.

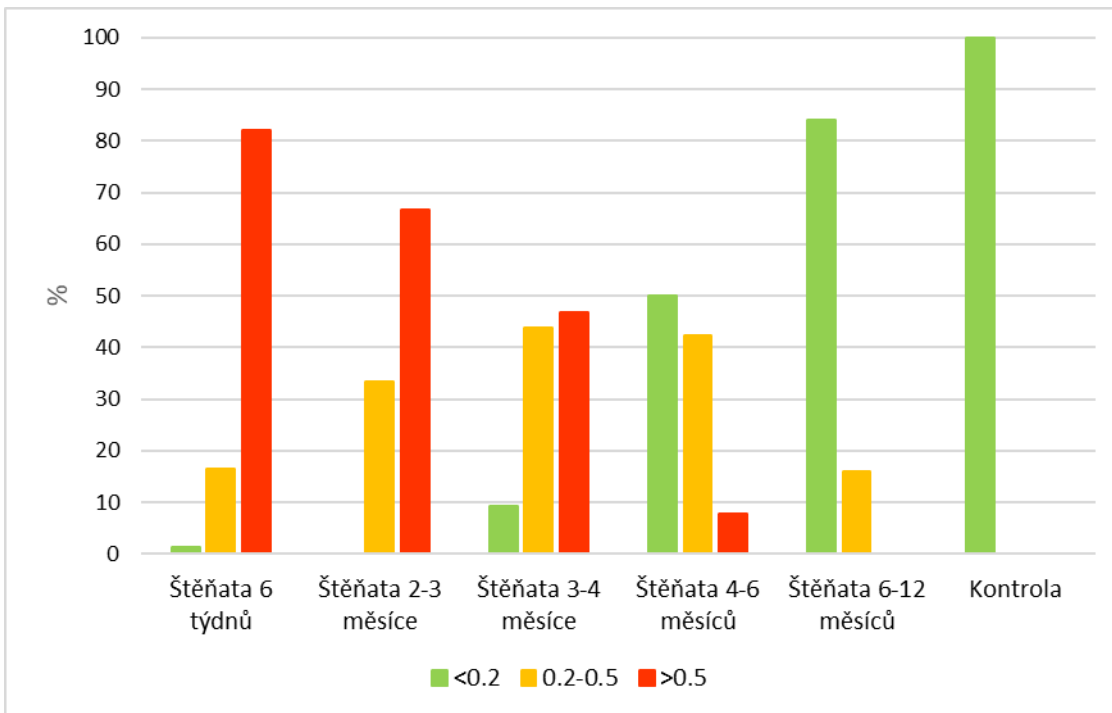
Tabulka č. 1. Koncentrace proteinu a kreatininu v moči a hodnoty UPC u skupin štěňat různého věku a dospělých psů

| Parametr | Štěňata 6 týdnů | Štěňata 2-3 měsíce | Štěňata 3-4 měsíce | Štěňata 4-6 měsíců | Mladí psi 6-12 měsíců | Dospělí psi |
|---------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------|
| Počet | 140 | 42 | 32 | 52 | 50 | 55 |
| Protein (mg/l) | | | | | | |
| Průměr | 593,7 | 475,5 | 626,6 | 364,7 | 270,0 | 103,0 |
| SD | 419,7 | 363,5 | 346,6 | 265,1 | 213,5 | 111,9 |
| Rozmezí | 34–2339 | 34–1427 | 103–1224 | 24–1242 | 34–951 | 34–563 |
| Kreatinin (mmol/l) | | | | | | |
| Průměr | 5,9 | 6,2 | 11,6 | 14,7 | 27,3 | 16,7 |
| SD | 3,6 | 5,1 | 4,9 | 7,1 | 35,8 | 9,6 |
| Rozmezí | 0,7–16,6 | 0,4–19,0 | 3,4–20,7 | 3,0–36,4 | 3,8–26,2 | 1,4–40,8 |
| UPC | | | | | | |
| Průměr | 0,91 | 0,78 | 0,53 | 0,23 | 0,11 | 0,06 |
| SD | 0,41 | 0,51 | 0,41 | 0,14 | 0,08 | 0,05 |
| Rozmezí | 0,19–2,2 | 0,23–2,52 | 0,18–2,32 | 0,03–0,57 | 0,01–0,38 | 0,01–0,23 |

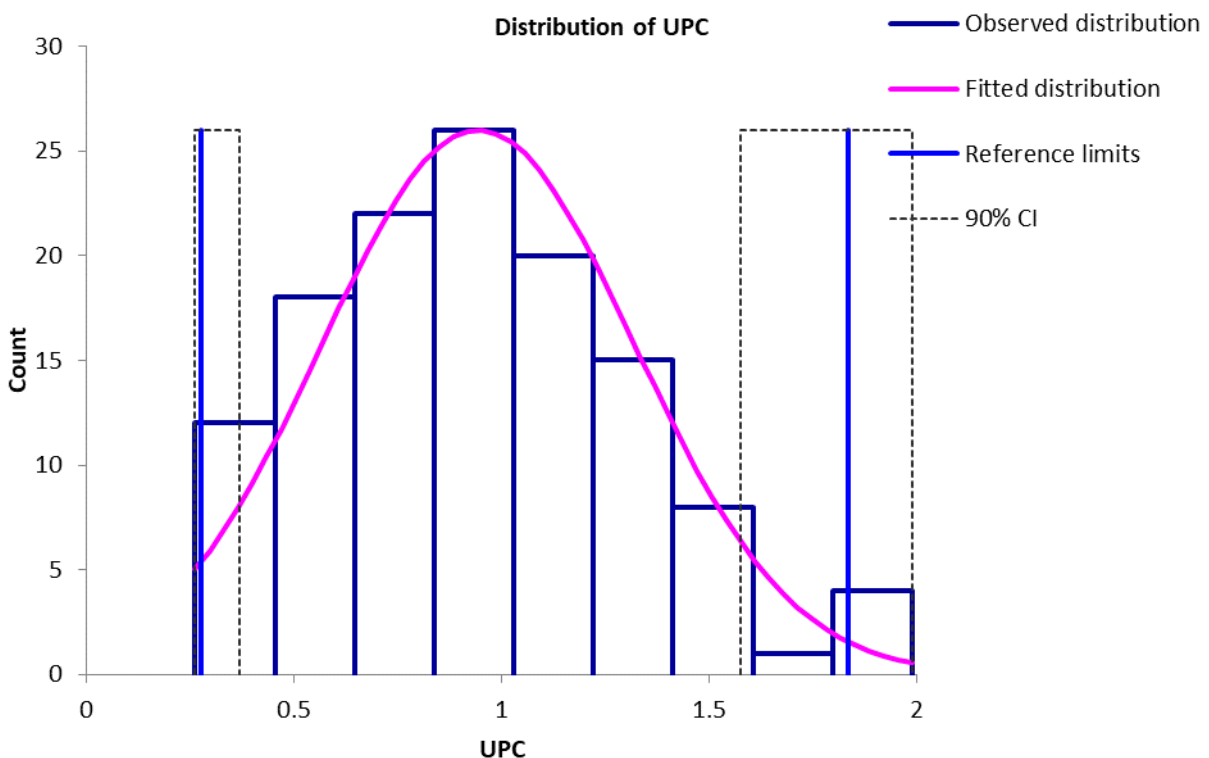
SD – směrodatná odchylka

Graf č. 1. Průměrné hodnoty UPC u jednotlivých skupin štěňat

Graf č. 2. Podíl proteinurických (UPC > 0,5), hraničně proteinurických (UPC v rozmezí 0,2-0,5) a neproteinurických (UPC < 0,2) vzorků v jednotlivých skupinách



Graf č. 3. Distribuce hodnot UPC a stanovení referenčního rozmezí u šestitýdenních štěňat



Diskuze

Onemocnění ledvin se příležitostně objevuje i u mladých zvířat. Věk šesti týdnů je obvykle ten nejčasnější věk, kdy štěňata odchází od chovatelů k novým majitelům a je to také věk, kdy se dostávají na prohlídku zdravotního stavu.

Při podezření na onemocnění ledvin je vhodné doplnit vyšetření krve i o vyšetření moči včetně kvantifikace proteinurie. Výsledná hodnota UPC je ovlivněna koncentracemi proteinu a kreatininu v moči. Kreatinin je produkt svalového metabolismu a jeho koncentrace v krvi je úměrná množství svalové hmoty. Kreatinin je volně filtrován glomerulem a následně je vylučován do moči, jeho vylučování je v čase konstantní (Braun et al., 2003). U štěňat již byla popsána nižší koncentrace kreatininu v krvi (Wolford et al., 1998; Rosset et al., 2012), dá se tedy předpokládat i nižší koncentrace kreatininu v moči.

Přítomnost proteinu v moči z renálních příčin je důsledkem poškození glomerulů, tubulů nebo intersticia (Harley and Langston, 2012). Intersticiální poškození ledvin je obvykle doprovázeno aktivním sedimentem, takové vzorky nebyly do studie zařazeny. Dá se tedy předpokládat glomerulární nebo tubulární problém. Štěňata se nerodí s kompletně vyvinutými ledvinami, nefrogeneze pokračuje ještě po narození. Ve věku 3 týdnů dosahují ledviny dospělého počtu nefronů (Horster et al., 1971). Míra glomerulární filtrace se během prvních dvou týdnů života rapidně zvyšuje (Heller and Capek, 1965). Po třetím týdnu života se růst ledvin omezuje na vývoj tubulů (Horster and Valtin, 1971).

Signifikantní proteinurie (UPC 10,3) byla prokázána u novorozenech štěňat, která se postupně snižovala až na hodnotu 1,44 ve dvou týdnech věku. U těchto štěňat došlo k signifikantnímu poklesu koncentrace proteinu v moči, přičemž koncentrace kreatininu byla stabilní (Schäfer-Somí et al., 2005). Postupný pokles koncentrace proteinu v moči byla zaznamenána i u štěňat do 30 dnů věku (Cowan et al., 1980).

Závěr

Naše studie ukázala, že koncentrace proteinu a kreatininu v moči a hodnoty UPC jsou ovlivňovány věkem. Do věku 6 měsíců není možné používat obecná referenční rozmezí, neboť to může vést k nesprávné diagnóze.

Tato práce byla financována ITA VETUNI (projekt č. 2022ITA21VETUNI).

Literatura

- Baumgartner, F., Boretti, F., Gerber, B. 2022. Prognostic factors in dogs with common causes of proteinuria. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 164: 525-533.
- Bartges, J.W. 2012. Chronic kidney disease in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 42: 669-692.
- Benali, S.L., Lees, G.E., Castagnaro, M. et al. 2014. Epithelial mesenchymal transition in progression of renal disease in dogs. *Histology and Histopathology* 29: 1409-1414.
- Braun, J.P., Lefebvre, H.P., Watson, A.D.J. 2003. Creatinine in the dog: A review. *Veterinary Clinical Pathology* 32: 162-179.
- Cowan, R.H., Jukkola, A.F., Arant, B.S. Jr. 1980. Pathophysiologic evidence of gentamicin nephrotoxicity in neonatal puppies. *Pediatric Research* 14: 1204-1211.
- Harley, L., Langston, C. 2012. Proteinuria in dogs and cats. *Canadian Veterinary Journal* 53: 631-638.
- Heller, J., Capek, K. 1965. Changes in body water compartments and inulin and PAH clearance in the dog during postnatal development. *Physiology Biochemistry* 14: 433-438.
- Horster, M., Kemler, B.J., Valtin, H. 1971. Intracortical distribution of number and volume of glomeruli during postnatal maturation in the dog. *Journal of Clinical Investigation* 50: 796-800.
- Horster, M., Valtin, H. 1971. Postnatal development of renal function: Micropuncture and clearance studies in the dog. *Journal of Clinical Investigation* 50: 779-795.
- Lane, I.F., Shaw, D.H., Burton, S.A., Donald, A.W. 2000. Quantitative urinalysis in healthy Beagle puppies from 9 to 27 weeks of age. *American Journal of Veterinary Research* 61: 577-581.
- Lees, G.E., Brown, S.A., Elliott, J., et al. 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.

- Marynissen, S.J.J., Willems, A.L., Paepe, D., et al. 2017. Proteinuria in apparently healthy elderly dogs: persistency and comparison between free catch and cystocentesis urine. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 31: 93-101.
- Misbach, C., Chetboul, V., Concordet, D., et al. 2014. Basal plasma concentrations of routine variables and packed cell volume in clinically healthy adult small-sized dogs: effect of breed, body weight, age and gender, and establishment of reference intervals. *Veterinary Clinical Pathology* 43: 371-380.
- Miyakawa, H., Ogawa, M., Sakatani, A., Akabene, R., Miyagawa, Y., Takemura, N. 2021. Evaluation of the progression of non-azotemic proteinuric chronic kidney disease in dogs. *Research in Veterinary Science* 138: 11-18.
- Remuzzi, G., Bertani, T. 1998. Pathophysiology of progressive nephropathies. *New England Journal of Medicine* 339: 1448-1456.
- Rørtveit, R., Saevik, B.K., Eggertsdóttir, A.V., et al. 2015. Age-related changes in hematologic and serum biochemical variables aged 16-60 days. *Veterinary Clinical Pathology* 44: 47-57.
- Rosset, E., Rahnon, B., Casseleux, G., Chalvet-Monfray, K., Buff, S. 2012. Age-related changes in biochemical and hematologic variables in borzoi and beagle puppies from birth to 8 weeks. *Veterinary Clinical Pathology* 41: 272-282.
- Roura, X., Elliott, J., Grauer, G.F. Proteinuria. In: *BSAVA Manual of Canine and Feline Nephrology and Urology*, Elliott J, Grauer GF, Westropp JL (eds.). BSAVA, Gloucester, 2017, pp. 50-59.
- Schäfer-Somi, S., Bär-Schadler, A., Aurich, J.E. 2005. Proteinuria and immunoglobulinuria in neonatal dogs. *Veterinary Record* 157: 378-382.
- Wolford, S.T., Schroer, R.A., Gohs, F.X., Gallo, P.P., Falk, H.B., Dente, A.R. 1988. Effect of age on serum chemistry profile, electrophoresis and thyroid hormones in beagle dogs two weeks to one year of age. *Veterinary Clinical Pathology* 17:35-42.

Vliv perorálního podávání nesteroidních antiflogistik na zdravotní ukazatele kapra obecného (*Cyprinus carpio*)

Jana Blahová, Veronika Doubková, Petr Maršálek, Tereza Novotná, Zdeňka Svobodová

Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI

Abstrakt

Cílem předkládané studie bylo komplexní posouzení potenciálně negativních účinků nesteroidních antiflogistik ibuprofenu a diklofenaku na vybrané ukazatele kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Ryby byly vystaveny účinkům testovaných látek v krmivu, které jim bylo podáváno po dobu 6 týdnů. Testovány byly environmentálně relevantní koncentrace a násobek těchto koncentrací pro posouzení vztahu dávky a odpovědi organismu. Po ukončení expozice byl proveden odběr krve a vybraných tkání pro analýzu základních biochemických a hematologických parametrů a stanovení indikátorů oxidativního stresu (vysokomolekulární antioxidanty, aktivity antioxidantních a detoxikačních enzymů a poškození biomolekul). Nejvýznamnější změny byly prokázány v experimentální skupině vystavené působení diklofenaku, a to především v nejvyšší testované koncentraci v krmivu (tzn. 2 000 µg/kg). V této skupině došlo v porovnání s kontrolní skupinou ke statisticky významnému ($p < 0,05$) poklesu počtu leukocytů a lymfocytů, dále ke zvýšení koncentrace amoniaku, celkového proteinu, redukčního potenciálu plazmy a aktivit jaterních enzymů (ALT, AST, ALP) a antioxidantních enzymů (superoxiddismutáza, glutathion-S-transferáza) v jaterní tkáni. Signifikantní pokles lymfocytů byl zaznamenán i v experimentální skupině vystavené ibuprofenu v koncentraci 2 000 µg/kg. V této skupině došlo také k významnému zvýšení celkového proteinu, amoniaku, redukčního potenciálu plazmy a aktivit jaterních enzymů (ALT, AST, ALP). Byly také zaznamenány změny v experimentální skupině vystavené environmentálně relevantní koncentraci diklofenaku (20 µg/kg), kdy došlo ke zvýšení hemoglobinu erytrocytů a elevaci amoniaku, celkového proteinu, ALT, ALP a glutathion-S-transferázy v jaterní tkáni. Ze zjištěných výsledků je zřejmé, že dlouhodobá expozice rezidui těchto hojně se vyskytujících léčiv představuje významné riziko pro vodní organismy.

Úvod

Do vodního prostředí se v důsledku antropogenní činnosti kontinuálně dostává široké spektrum různorodých polutantů, které mohou negativním způsobem ovlivnit fyziologické funkce vodních organismů. V posledních letech jsou stále častěji diskutovanou skupinou kontaminantů farmaka. Díky jejich častému používání dochází k jejich následnému vstupu do vodního ekosystému, kde mohou negativně ovlivnit fyziologické funkce necílových vodních organismů. Je to především v důsledku neefektivních čistírenských procesů, kdy čistírny odpadních vod nejsou schopny účinně odstranit uvedené chemické sloučeniny z komunálních odpadních vod. Efektivita čistírenských procesů je různorodá a závisí nejen na technologii dané čistírny, ale i dalších faktorech jako je přítomnost ostatních kontaminantů nebo teplota (Smook et al., 2008; Patel et al., 2019). Vzhledem k tomu, že farmaka jsou v humánní i veterinární medicíně užívána v relativně velkém množství a to neustále, dochází k jejich kontinuálnímu vstupu do životního prostředí. I když detekované koncentrace nejsou vysoké v porovnání s ostatními znečišťujícími látkami (např. pesticidy, těžkými kovy, organickými perzistentními polutanty), i tyto nízké koncentrace mají prokazatelně toxické účinky na vodní organismy, a to především při chronické expozici (Velíšek, 2018; Patel et al., 2019).

Mezi významnou skupinu léčiv často detekovanou ve vodním prostředí patří nesteroidní antiflogistika. Jedná se o hojně využívanou skupinu farmak vykazující analgetické, antipyretické a antiflogistické účinky. V humánní medicíně jsou díky jejich dostupnosti bez lékařského předpisu široce využívanou skupinou léčiv. Své uplatnění ovšem nacházejí i ve veterinární medicíně, a to především při léčbě koní. Mezi významné zástupce řadíme diklofenak, ibuprofen, naproxen či ketoprofen (Láníková et al., 2021; Maláčova et al., 2021). Nesteroidní antiflogistika lze detekovat v různých biotických i abiotických složkách vodního prostředí (Láníková et al., 2021; Skocovska et

al., 2021). Toxikologické studie prokázaly řadu negativních účinků těchto polutantů u různých vodních organismů, jedná se například o embryotoxicitu, teratogenitu, nefrotoxitu, schopnost indukovat oxidativní stres, negativně ovlivňovat reprodukci či vyvolávat patomorfologické změny vybraných orgánů (Mathias et al., 2018; Das et al., 2019; Láníková et al., 2021; Hodkovicova et al., 2022).

Cílem studie bylo zhodnocení potenciálně negativních účinků diklofenaku a ibuprofenu na vybrané ukazatele kapra obecného po subchronické expozici. Testovaná léčiva byla podávána ve speciálně připraveném krmivu po dobu 6 týdnů.

Materiál a metodika

Pro sledování účinků diklofenaku a ibuprofenu po perorální aplikaci byl jako modelový organismus zvolen kapr obecný (*Cyprinus carpio*). 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 Brno) v akreditovaném zařízení pro pokusná zvířata (projekt pokusu č. MSMT-23130/2022-4). Vlastní experiment probíhal v průtočném systému (obrázek č. 1) s výměnou vody v 12-hodinových intervalech. Do experimentu bylo zařazeno celkem 120 ks juvenilních jedinců, kteří byli umístěni do 10 nádrží po 12 kusech. Před vlastní expozicí proběhla dvoutýdenní fáze aklimatizace. Doba experimentu byla šest týdnů. Celkem bylo v pokusu pět duplicitních skupin – kontrolní skupina, skupiny exponované ibuprofenu v dávce 20 µg/kg (IBP 20) a 2 000 µg/kg (IBP 2000) a skupiny exponované diklofenaku v dávce 20 µg/kg (DCF 20) a 2 000 µg/kg (DCF 2000). Koncentrace testovaných farmak v krmivu byly ověřeny pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. V průběhu experimentu byla každý den sledována mortalita, změny v příjmu krmiva a byla prováděna analýza základních fyzikálně-chemických parametrů vody (pH, teplota, kyslík, dusitany, dusičnany, amoniak).

Po ukončení expozice byly všechny ryby usmrceny tupým úderem do hlavy a byl proveden odběr krve z kaudálních cév a vybraných tkáních pro následné analýzy (obrázek č. 2). Dále bylo také 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 (erythrocyty, leukocyty, hemoglobin, hematokrit). Byly také zhotoveny nátěry pro zhodnocení diferenciálního rozpočtu leukocytů. Z parametrů červeného krevního obrazu byly vypočítány erythrocytární indexy – střední objem erythrocytů (MCV), hemoglobin erythrocytů (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 – CK, laktát, cholesterol, triacylglyceroly, vápník, fosfor, hořčík, kreatinin) a ukazatelů oxidativního stresu (redukční potenciál plazmy – FRAP a ceruloplasmin). Vzorčky byly skladovány do doby analýzy v hlubokomrazicím boxu (-80 °C). Základní biochemické vyšetření bylo provedeno s využitím biochemického analyzátoru Konelab 20i a komerčních kitů od firmy Biovendor. Analýza FRAP a ceruloplasminu byla provedena spektrofotometricky, bližší popis metodiky je uveden v práci autorského kolektivu Haluzová et al. (2010).

Obrázek č. 1. Průtočný systém pro provádění testů toxicity na kapru obecném (foto: Blahová)

Při pitvě byl proveden odběr jater, žaber a kaudální ledviny pro analýzu antioxidačních a detoxikačních enzymů (superoxiddismutáza – SOD, kataláza – CAT, glutathionperoxidáza – GPx, glutathionreduktáza – GR a glutathion-S-transferáza – GST) a lipoperoxidace. 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.

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.

Obrázek č. 2. Odběry vzorků tkání kapra obecného pro analýzu ukazatelů oxidativního stresu (foto: Blahová, Doubková)



Výsledky

V průběhu experimentu nebyla zaznamenána mortalita v žádné skupině a zároveň nebyly pozorovány změny v příjmu krmiva. Výsledky morfologických ukazatelů jsou uvedeny v tabulce č. 1. U žádného ze sledovaných parametrů nebyly po ukončení experimentu zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi skupinami ($p > 0,05$).

Tabulka č. 1. Morfologické ukazatele (průměr \pm střední chyba průměru) kapra obecného po 6-týdenní expozici nesteroidními antiflogistiky – ibuprofenem a diklofenakem podávanými v krmivu. Mezi skupinami nebyly zjištěny signifikantní rozdíly ($p > 0,05$).

| | kontrola (n=24) | ibuprofen 20 μg/kg (n=24) | ibuprofen 2 000 μg/kg (n=24) | diklofenak 20 μg/kg (n=24) | diklofenak 2 000 μg/kg (n=24) |
|---------------------|---------------------------|--|---|---|--|
| celková délka (mm) | 222,8 \pm 3,6 | 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 (mg) | 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 |
| HSI | 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 |
| FCF | 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 |

Poznámka: HSI – hepatosomatický index, FCF – Fultonův kondiční faktor

V tabulkách č. 2 a 3 jsou uvedeny výsledky hematologického vyšetření. Signifikantní změny byly zaznamenány ve vybraných parametrech červené (hemoglobin, MCH, MCHC) i bílé (leukocyty a lymfocyty) krevní řady. V porovnání s kontrolní skupinou byly nejčastěji změny zjištěny v experimentálních skupinách vystavených účinkům diklofenaku. Zde došlo ke statisticky významnému poklesu ($p < 0,05$) počtu leukocytů a lymfocytů v experimentální skupině vystavené diklofenaku v koncentraci 2 000 μ g/kg v porovnání s kontrolní skupinou. Signifikantní pokles ($p < 0,05$) lymfocytů v porovnání s kontrolou byl zaznamenán i v experimentální skupině vystavené

nejvyšší koncentraci ibuprofenu, tzn. 2 000 µg/kg. V případě ukazatelů červené krevní řady byly statisticky významné změny ($p < 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou zjištěny pouze v případě MCH, a to v experimentální skupině vystavené účinkům diklofenaku v environmentálně relevantní koncentraci, tzn. 20 µg/kg.

Tabulka č. 2. Hematologické ukazatele červené krevní řady (průměr ± střední chyba průměru) kapra obecného po 6-týdenní expozici nesteroidními antiflogistiky – ibuprofenem a diklofenakem podávanými v krmivu. Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou označeny rozdílnými písmeny ($p < 0,05$).

| | kontrola (n=10) | ibuprofen 20 µg/kg (n=10) | ibuprofen 2 000 µg/kg (n=10) | diklofenak 20 µg/kg (n=10) | diklofenak 2 000 µg/kg (n=10) |
|-----------------------------|----------------------------------|---|--|--|---|
| erythrocyty ($10^{12}/l$) | 1,75 ± 0,09 ^a | 1,56 ± 0,06 ^a | 1,75 ± 0,14 ^a | 1,41 ± 0,07 ^a | 1,55 ± 0,07 ^a |
| hemoglobin (g/l) | 91,88 ± 4,21^{ab} | 87,71 ± 2,57^{ab} | 86,26 ± 2,80^{ab} | 98,64 ± 4,49^a | 84,61 ± 2,70^b |
| hematokrit (l/l) | 0,030 ± 0,01 ^a | 0,031 ± 0,01 ^a | 0,31 ± 0,01 ^a | 0,29 ± 0,01 ^a | 0,30 ± 0,01 ^a |
| MCV (fl) | 175,18 ± 8,47 ^a | 198,63 ± 7,77 ^a | 187,89 ± 10,44 ^a | 209,54 ± 10,88 ^a | 199,54 ± 10,41 ^a |
| MCH (pg) | 54,23 ± 4,61^b | 56,77 ± 1,72^b | 51,77 ± 3,98^b | 72,18 ± 3,90^a | 55,98 ± 3,31^b |
| MCHC (l/l) | 0,31 ± 0,02^{ab} | 0,29 ± 0,01^b | 0,27 ± 0,01^b | 0,35 ± 0,02^a | 0,28 ± 0,01^b |

Poznámka: MCV – střední objem erytrocytů, MCH – hemoglobin erytrocytů, MCHC – střední barevná koncentrace

Tabulka č. 3. Hematologické ukazatele bílé krevní řady (průměr ± střední chyba průměru) kapra obecného po 6-týdenní expozici nesteroidními antiflogistiky – ibuprofenem a diklofenakem podávanými v krmivu. Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou označeny rozdílnými písmeny ($p < 0,05$).

| | kontrola (n=10) | ibuprofen 20 µg/kg (n=10) | ibuprofen 2 000 µg/kg (n=10) | diklofenak 20 µg/kg (n=10) | diklofenak 2 000 µg/kg (n=10) |
|----------------------------|---------------------------------|---|--|--|---|
| Leukocyty ($10^9/l$) | 64,89 ± 3,71^a | 70,44 ± 6,81^a | 52,20 ± 5,97^{ab} | 52,80 ± 3,43^{ab} | 44,80 ± 4,05^b |
| Lymfocyty ($10^9/l$) | 62,06 ± 3,79^a | 64,07 ± 6,81^a | 41,21 ± 3,27^b | 49,07 ± 3,46^{ab} | 40,51 ± 3,63^b |
| Myelocyty ($10^9/l$) | 1,07 ± 0,33 ^a | 2,20 ± 0,30 ^a | 1,54 ± 0,31 ^a | 1,32 ± 0,26 ^a | 1,29 ± 0,34 ^a |
| Metamyelocyty ($10^9/l$) | 1,90 ± 0,43 ^a | 1,82 ± 0,22 ^a | 1,44 ± 0,31 ^a | 1,37 ± 0,27 ^a | 1,41 ± 0,26 ^a |
| Tyčky ($10^9/l$) | 0,86 ± 0,31 ^a | 0,27 ± 0,10 ^a | 0,52 ± 0,10 ^a | 0,30 ± 0,08 ^a | 0,31 ± 0,11 ^a |
| Segmenty ($10^9/l$) | 0,97 ± 0,47 ^a | 0,35 ± 0,08 ^a | 0,32 ± 0,09 ^a | 0,28 ± 0,10 ^a | 0,85 ± 0,23 ^a |
| Monocyty ($10^9/l$) | 0,71 ± 0,21 ^a | 0,89 ± 0,28 ^a | 0,15 ± 0,09 ^a | 0,46 ± 0,15 ^a | 0,43 ± 0,11 ^a |
| N/L | 0,07 ± 0,02 ^a | 0,07 ± 0,01 ^a | 0,08 ± 0,01 ^a | 0,07 ± 0,01 ^a | 0,09 ± 0,01 ^a |

Poznámka: N/L – poměr neutrofilních granulocytů (součet myelocytů, metamyelocytů, tyček a segmentů) a lymfocytů

Výsledky biochemického vyšetření krevní plazmy jsou uvedeny v tabulce č. 4. Statisticky významné změny v porovnání s kontrolní skupinou byly zaznamenány při analýze ukazatelů metabolismu bílkovin (celkový protein, amoniak) a jaterních enzymů (ALT, AST, ALP), a to především v experimentálních skupinách vystavených působení diklofenaku. V experimentální skupině vystavené působení diklofenaku, a to v obou testovaných koncentracích, došlo ke statisticky významnému ($p < 0,05$) zvýšení koncentrace amoniaku i celkového proteinu. V experimentální skupině vystavené působení ibuprofenu došlo také k signifikantní ($p < 0,05$) elevaci amoniaku a celkového proteinu, ale pouze v nejvyšší testované koncentraci. Při analýze jaterních enzymů došlo ve většině experimentálních skupin ke statisticky významnému ($p < 0,05$) zvýšení aktivity sledovaných enzymů, výjimkou byla pouze experimentální skupina vystavená působení environmentálně relevantní koncentrace ibuprofenu, a v případě AST experimentální skupina vystavena působení environmentálně relevantní koncentraci diklofenaku. Statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) byly také zaznamenány v případě ostatních biochemických ukazatelů krevní plazmy jako je laktát, vápník a fosfor, ale nejednalo se o rozdíly v porovnání s kontrolní skupinou.

Tabulka č. 4. Biochemické ukazatele krevní plazmy (průměr ± střední chyba průměru) kapra obecného po 6-týdenní expozici nesteroidními antiflogistiky – ibuprofenem a diklofenakem podávanými v krmivu. Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou označeny rozdílnými písmeny ($p < 0,05$).

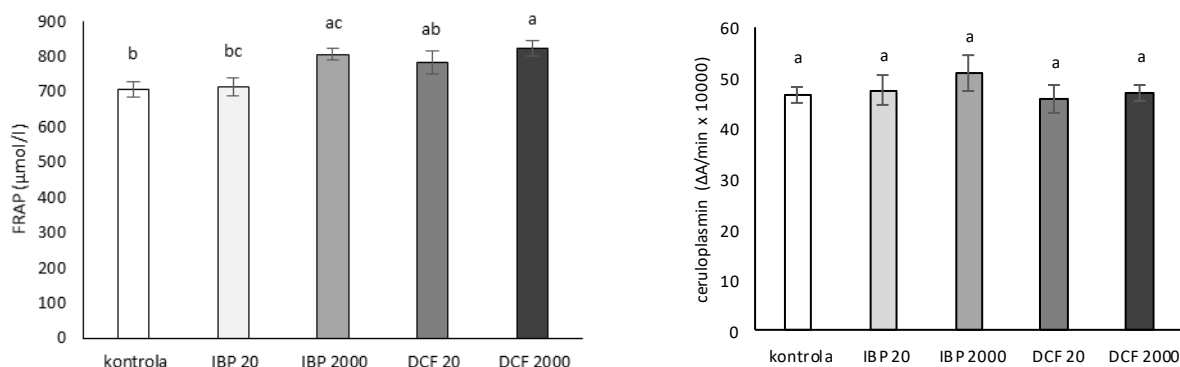
| | kontrola (n=10) | ibuprofen 20 µg/kg (n=10) | ibuprofen 2 000 µg/kg (n=10) | diklofenak 20 µg/kg (n=10) | diklofenak 2 000 µg/kg (n=10) |
|--------------------|-----------------------------------|---|--|--|---|
| Albumin (g/l) | 10,58 ± 0,47 ^a | 11,48 ± 0,40 ^a | 11,19 ± 0,75 ^a | 12,03 ± 0,74 ^a | 10,30 ± 0,70 ^a |
| TP (g/l) | 31,62 ± 0,65^c | 34,42 ± 0,60^{bc} | 36,68 ± 0,78^{ab} | 34,85 ± 1,06^b | 39,09 ± 0,86^a |
| Amoniak (µmol/l) | 269,37 ± 12,01^b | 280,65 ± 12,12^b | 394,31 ± 29,18^a | 395,21 ± 24,79^a | 384,44 ± 25,35^a |
| CHOL (mmol/l) | 4,77 ± 0,17 ^a | 4,73 ± 0,15 ^a | 4,80 ± 0,23 ^a | 5,05 ± 0,30 ^a | 4,62 ± 0,22 ^a |
| Glukóza (mmol/l) | 4,42 ± 0,37 ^a | 5,53 ± 0,33 ^a | 5,54 ± 0,46 ^a | 5,74 ± 0,40 ^a | 5,25 ± 0,33 ^a |
| Laktát (mmol/l) | 2,20 ± 0,03^{ab} | 1,85 ± 0,23^b | 2,85 ± 0,48^{ab} | 3,02 ± 0,69^{ab} | 3,65 ± 0,38^a |
| Kreatinin (µmol/l) | 31,99 ± 2,26 ^a | 33,41 ± 1,74 ^a | 30,19 ± 2,27 ^a | 32,83 ± 1,87 ^a | 31,33 ± 2,13 ^a |
| TAG (mmol/l) | 4,41 ± 0,27 ^a | 4,22 ± 0,20 ^a | 4,14 ± 0,33 ^a | 4,40 ± 0,38 ^a | 3,91 ± 0,21 ^a |
| Hořčík (mmol/l) | 0,93 ± 0,02 ^a | 0,93 ± 0,01 ^a | 0,99 ± 0,03 ^a | 1,01 ± 0,05 ^a | 1,00 ± 0,04 ^a |
| Vápník (mmol/l) | 2,58 ± 0,03^{ab} | 2,54 ± 0,02^b | 2,71 ± 0,04^a | 2,66 ± 0,04^{ab} | 2,63 ± 0,05^{ab} |
| Fosfor (mmol/l) | 2,07 ± 0,13^{ab} | 1,84 ± 0,10^b | 2,26 ± 0,34^{ab} | 2,47 ± 0,19^a | 1,99 ± 0,09^{ab} |
| Chloridy (mmol/l) | 112,75 ± 0,60 ^a | 114,71 ± 0,83 ^a | 114,78 ± 0,73 ^a | 112,89 ± 0,78 ^a | 113,80 ± 0,10 ^a |
| ALT (µkat/l) | 0,57 ± 0,05^b | 0,86 ± 0,16^{ab} | 1,32 ± 0,22^a | 1,07 ± 0,11^a | 1,30 ± 0,16^a |
| AST (µkat/l) | 2,96 ± 0,20^b | 4,65 ± 0,71^{ab} | 5,81 ± 0,80^a | 4,29 ± 0,50^{ab} | 5,06 ± 0,41^a |
| ALP (µkat/l) | 0,26 ± 0,01^b | 0,38 ± 0,03^{ab} | 0,40 ± 0,02^a | 0,51 ± 0,07^a | 0,53 ± 0,06^a |
| LDH (µkat/l) | 10,46 ± 1,17 ^a | 16,83 ± 2,09 ^a | 16,56 ± 2,12 ^a | 14,94 ± 2,00 ^a | 15,01 ± 1,70 ^a |
| CK (µkat/l) | 121,88 ± 14,86 ^a | 102,41 ± 11,31 ^a | 128,59 ± 18,00 ^a | 137,09 ± 16,91 ^a | 119,61 ± 15,90 ^a |

Poznámka: ALT – alaninaminotransferáza, ALP – alkalická fosfatáza, AST – aspartátaminotransferáza, CK – kreatinkináza, LDH – laktátdehydrogenáza, TAG – triacylglyceridy, TP – celkový protein

V grafu č. 1 jsou uvedeny výsledky analýzy FRAP a ceruloplasminu jako ukazatelů oxidativního stresu v plazmě. Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly ($p > 0,05$) mezi skupinami při analýze ceruloplasminu. Naopak byly zaznamenány statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) při analýze FRAP. V experimentálních skupinách vystavených nejvyšším testovaným koncentracím ibuprofenu i diklofenaku došlo ke statisticky významnému ($p < 0,05$) zvýšení sledovaného ukazatele.

V tabulkách č. 5 až 7 jsou uvedeny výsledky analýzy aktivit antioxidantních a detoxikačních enzymů včetně posouzení lipoperoxidace v jednotlivých tkáních. Nejvíce signifikantních rozdílů bylo zaznamenáno v jaterní tkáni. V porovnání s kontrolní skupinou došlo ke statisticky významnému ($p < 0,05$) zvýšení aktivity SOD a GST v experimentální skupině exponované diklofenaku v koncentraci 2 000 µg/kg. V případě SOD bylo zvýšení v porovnání s kontrolní skupinou více jak dvojnásobné. Dále bylo také zaznamenáno statisticky významné ($p < 0,05$) zvýšení aktivity GST v experimentální skupině vystavené diklofenaku v environmentální skupině. Při analýze kaudální ledviny a žaber nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly ($p > 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou v žádném ze sledovaných ukazatelů.

Graf č. 1. Výsledky analýzy redukčního potenciálu plazmy (FRAP) a ceruloplasminu v plazmě kapra obecného po 6-týdenní expozici nesteroidními antiflogistiky – ibuprofenem a diklofenakem podávanými v krmivu. Data jsou prezentována jako průměr ± střední chyba průměru. Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou označeny rozdílnými písmeny ($p < 0,05$).



Tabulka č. 5. Analýza ukazatelů oxidativního stresu v jaterní tkáni kapra obecného po 6-týdenní expozici nesteroidními antiflogistiky – ibuprofenem a diklofenakem podávanými v krmivu. Data jsou prezentována jako průměr ± střední chyba průměru. Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou označeny rozdílnými písmeny ($p < 0,05$).

| | kontrola (n=10) | ibuprofen 20 µg/kg (n=10) | ibuprofen 2 000 µg/kg (n=10) | diklofenak 20 µg/kg (n=10) | diklofenak 2 000 µg/kg (n=10) |
|-------|---------------------------|---------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| SOD | 16,1 ± 2,2 ^b | 23,0 ± 2,1 ^b | 19,2 ± 2,2 ^b | 21,6 ± 2,8 ^b | 35,2 ± 2,7 ^a |
| CAT | 532,9 ± 37,7 ^a | 521,4 ± 45,5 ^a | 463,9 ± 34,0 ^a | 592,6 ± 32,7 ^a | 600,2 ± 34,3 ^a |
| GPx | 253,7 ± 9,0 ^a | 304,1 ± 17,0 ^a | 284,0 ± 15,3 ^a | 272,8 ± 17,2 ^a | 302,3 ± 15,3 ^a |
| GR | 5,2 ± 0,6 ^a | 6,2 ± 0,7 ^a | 4,9 ± 0,6 ^a | 6,2 ± 0,7 ^a | 4,5 ± 0,9 ^a |
| GST | 217,9 ± 12,2 ^b | 188,4 ± 10,7 ^b | 215,9 ± 9,0 ^{ab} | 254,3 ± 12,3 ^a | 265,3 ± 14,5 ^a |
| TBARS | 16,0 ± 1,9 ^a | 19,6 ± 1,6 ^a | 21,1 ± 2,5 ^a | 18,5 ± 3,2 ^a | 21,6 ± 4,0 ^a |

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), SOD – superoxididismutáza (U/mg protein), TBARS – lipoperoxidace stanovená metodou využívající kyselinu thiobarbiturovou (nmol/g tkáně)

Tabulka č. 6. Analýza ukazatelů oxidativního stresu v kaudální ledvině kapra obecného po 6-týdenní expozici nesteroidními antiflogistiky – ibuprofenem a diklofenakem podávanými v krmivu. Data jsou prezentována jako průměr ± střední chyba průměru. Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou označeny rozdílnými písmeny ($p < 0,05$).

| | kontrola (n=10) | ibuprofen 20 µg/kg (n=10) | ibuprofen 2 000 µg/kg (n=10) | diklofenak 20 µg/kg (n=10) | diklofenak 2 000 µg/kg (n=10) |
|-------|----------------------------|---------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| SOD | 9,2 ± 1,1 ^a | 10,9 ± 1,0 ^a | 14,2 ± 2,6 ^a | 10,6 ± 1,1 ^a | 8,2 ± 1,2 ^a |
| CAT | 74,1 ± 4,8 ^a | 69,1 ± 4,1 ^a | 78,9 ± 6,6 ^a | 65,5 ± 3,8 ^a | 67,4 ± 3,9 ^a |
| GPx | 429,2 ± 19,0 ^{ab} | 406,2 ± 18,0 ^b | 490,9 ± 23,8 ^a | 461,0 ± 19,9 ^{ab} | 408,5 ± 19,0 ^b |
| GST | 641,1 ± 32,6 ^a | 582,8 ± 49,6 ^a | 669,5 ± 44,1 ^a | 699,5 ± 24,6 ^a | 721,8 ± 48,4 ^a |
| TBARS | 9,8 ± 0,2 ^a | 9,7 ± 0,2 ^a | 9,7 ± 0,3 ^a | 10,2 ± 0,5 ^a | 11,3 ± 1,2 ^a |

Poznámka: CAT – kataláza (µmol/min/mg protein), GPx – glutathionperoxidáza (nmol/min/mg protein), GST – glutathion-S-transferáza (nmol/min/mg protein), SOD – superoxididismutáza (U/mg protein), TBARS – lipoperoxidace stanovená metodou využívající kyselinu thiobarbiturovou (nmol/g tkáně)

Tabulka č. 7. Analýza ukazatelů oxidativního stresu v žaberní tkáni kapra obecného po 6-týdenní expozici nesteroidními antiflogistiky – ibuprofenem a diklofenakem podávanými v krmivu. Data jsou prezentována jako průměr ± střední chyba průměru. Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou označeny rozdílnými písmeny ($p < 0,05$).

| | kontrola (n=10) | ibuprofen 20 µg/kg (n=10) | ibuprofen 2 000 µg/kg (n=10) | diklofenak 20 µg/kg (n=10) | diklofenak 2 000 µg/kg (n=10) |
|-------|--------------------------|---------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| SOD | 6,4 ± 1,0 ^a | 5,3 ± 0,7 ^a | 5,1 ± 0,6 ^a | 5,5 ± 0,6 ^a | 6,4 ± 0,6 ^a |
| CAT | 11,4 ± 0,6 ^a | 9,1 ± 0,5 ^a | 9,8 ± 0,9 ^a | 10,7 ± 0,6 ^a | 10,6 ± 0,6 ^a |
| GPx | 145,9 ± 4,1 ^a | 165,7 ± 6,6 ^a | 153,7 ± 8,8 ^a | 168,5 ± 6,5 ^a | 151,7 ± 8,1 ^a |
| GR | 4,4 ± 0,5 ^a | 6,2 ± 0,6 ^a | 5,6 ± 0,3 ^a | 5,9 ± 0,4 ^a | 5,7 ± 0,5 ^a |
| GST | 229,7 ± 8,1 ^a | 230,2 ± 6,5 ^a | 249,3 ± 7,3 ^a | 252,1 ± 9,2 ^a | 248,3 ± 10,5 ^a |
| TBARS | 13,1 ± 9,2 ^a | 12,2 ± 1,3 ^a | 11,6 ± 9,2 ^a | 11,9 ± 8,7 ^a | 13,2 ± 8,9 ^a |

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), SOD – superoxididismutáza (U/mg protein), TBARS – lipoperoxidace stanovená metodou využívající kyselinu thiobarbiturovou (nmol/g tkáně)

Diskuze

V posledních letech patří farmaka mezi významné a hojně diskutované polutanty vodního ekosystému. Nesteroidní antiflogistika jako jsou diklofenak či ibuprofen řadíme mezi nejčastěji a nejběžněji používaná léčiva v humánní medicíně při tlumení bolesti, zánětu a snižování horečky (Láníková et al., 2021). V důsledku hojného využívání a nedostatečného odstranění reziduí těchto kontaminantů při čištění odpadních vod dochází následně k jejich vstupu do vodního ekosystému a ovlivnění necílových organismů. Skocovska et al. (2021) prováděli monitoring těchto polutantů na 65 vybraných lokalitách povodí Labe a zjistili, že nejčastěji jsou rezidua těchto farmak detekována ve vodě malých toků nacházejících se pod městskými aglomeracemi, kde dochází k nedostatečnému naředění. Hojný je také výskyt v lokalitách, které jsou situované v blízkosti nemocničních zařízení. Při sledování výskytu ibuprofenu bylo 66 % analyzovaných vzorků pozitivních, nejvyšší koncentraci autoři detekovali ve vzorcích vody z řeky Cidliny (1 600 ng/l). V případě diklofenaku bylo pozitivních více jak 78 % analyzovaných vzorků, nejvyšší koncentrace byla detekována v potoku Výmola v lokalitě Císařská Kuchyně (310 ng/l). Zahraniční studie také potvrzují častý výskyt těchto farmak, a to jak ve vodě, sedimentu či ve vzorcích vodních organismů. Zjištěné koncentrace jsou ovšem velmi variabilní a závisí na lokalitě, průtoku, typu čistíren odpadních vod nacházejících se na daném toku atd. (Sibeko et al., 2019; Láníková et al., 2021; Ríos and Peñuela, 2021).

Většina toxikologických studií se zaměřuje na sledování negativních účinků po expozici těmito látkami ve vodě. Vzhledem k tomu, že ibuprofen i diklofenak lze detekovat ve svalovině, játrech a krvi ryb či v těle bezobratlých, mohou být vodní organismy poměrně snadno exponovány i cestou potravního řetězce (Láníková et al., 2021). Pouze omezené množství toxikologických studií se ovšem zaměřuje na výše zmíněnou cestu expozice. Z uvedeného důvodu bylo naším cílem komplexní zhodnocení účinků nesteroidních antiflogistik diklofenaku a ibuprofenu na vybrané ukazatele kapra obecného (*Cyprinus carpio*) po subchronické perorální expozici. Testovaná léčiva byla podávána ve speciálně připraveném krmivu po dobu 6 týdnů. Sledováno bylo široké spektrum různých biomarkerů zahrnující morfologické ukazatele, biochemické a hematologické ukazatele krve a vybrané ukazatele oxidativního stresu analyzované v krevní plazmě, jaterní tkáni, kaudální ledvině a žábrech.

V rámci naší studie bylo nejvíce statisticky významných změn v porovnání s kontrolní skupinou zaznamenáno v experimentální skupině exponované diklofenakem. Po expozici 2 000 µg/kg došlo k signifikantnímu snížení počtu leukocytů a lymfocytů. Snížení počtu lymfocytů bylo zjištěno i v experimentální skupině vystavené nejvyšší testované koncentraci ibuprofenu. Imunosupresivní účinky byly potvrzeny také ve studii realizované kolektivem autorů Mathias et al. (2018), kteří u anténovky nejpodivnější (*Rhamdia quelen*) potvrdili snížení počtu leukocytů po čtrnáctidenní expozici ibuprofenem v koncentracích 0,1 a 10 µg/l. Hodkovicova et al. (2022) nezjistili žádné změny

v bílém krevním obraze pstruha duhového po expozici diklofenakem (2 a 20 µg/kg) a ibuprofenem (2 a 20 µg/kg), a to jak při testování jednotlivých farmak, tak i směsí. V porovnání s naší studií ovšem zjistili zvýšení počtu erytrocytů u experimentální skupiny pstruha duhového exponovaného směsí diklofenaku a ibuprofenu v dávce 2 µg/kg. Ogueji et al. (2018) zjistili signifikantní zvýšení erytrocytů, leukocytů, hemoglobinu a hematokritu u keříčkovce červenolehého (*Clarias gariepinus*) po akutní expozici ibuprofenem ve vodě. Hematotoxicity byla také posuzována ve studii realizované kolektivem autorů Ogunwole et al. (2021), kteří hodnotili toxicitu ibuprofenu u keříčkovce červenolehého (*C. gariepinus*). Autoři testované jedince exponovali dvěma různými koncentracím ibuprofenu (0,038 a 0,0038 mg/l) a prováděli průběžné odběry po 15 a 30 dnech expozice. Po patnáctidenní expozici bylo potvrzeno signifikantní zvýšení hematokritu, hemoglobinu, erytrocytů a leukocytů. Ovšem po 30 dnech nebyl ani u jednoho výše zmíněného hematologického parametru zaznamenán statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou.

Při biochemickém vyšetření krevní plazmy byly zjištěny změny především v ukazatelích bílkovinného metabolismu a v rámci aktivit jaterních enzymů. Nejvyšší testované koncentrace diklofenaku i ibuprofenu vedly k signifikantnímu zvýšení koncentrace celkového proteinu a amoniaku a dále ke zvýšení aktivity ALT, AST a ALP. Zvýšení celkového proteinu, amoniaku a ALT bylo překvapivě zaznamenáno i ve skupině, která byla vystavena environmentálně relevantní koncentraci diklofenaku. Žádné statisticky významné změny v porovnání s kontrolní skupinou nebyly zjištěny v experimentální skupině vystavené environmentální koncentraci ibuprofenu. Uvedené výsledky naznačují možné poškození jaterní tkáně, což bylo potvrzeno například ve studii realizované kolektivem autorů Hodkovicova et al. (2022), kteří zaznamenali patologické nálezy v játrech pstruha duhového po expozici ibuprofenem i diklofenakem. Hepatotoxicity testovaných nesteroidních antiflogistik pro ryby byla prokázána také ve studiích ostatních autorů (Cuklev et al. 2011; Mathias et al. 2018; Ajima et al. 2021; Ogunwole et al. 2021).

Řada toxikologických studií prokázala, že farmaka vyskytující se ve vodě mohou v těle vodních organismů indukovat oxidativní stres. Oxidativní stres představuje stav v organismu, kdy dochází k nerovnováze mezi tvorbou reaktivních forem kyslíku a dusíku a mechanismy v organismu, které se podílí na jejich zneškodnění (Vaclavik et al., 2020; Láníková et al., 2021; Hodkovicova et al., 2022). V naší studii byl největší počet statisticky významných změn v porovnání s kontrolní skupinou zaznamenán v experimentální skupině vystavené diklofenaku v koncentraci 2 000 µg/kg, kdy došlo ke zvýšení aktivity GST a SOD v jaterní tkáni a zvýšení redukčního potenciálu plazmy. Zvýšení aktivity GST v jaterní tkáni bylo zjištěno i v experimentální skupině exponované environmentálně relevantní koncentraci diklofenaku. V případě ibuprofenu byla při hodnocení oxidativního stresu zjištěna změna pouze u redukčního potenciálu plazmy, který se statisticky významně zvýšil v experimentální skupině exponované nejvyšší testované koncentraci. Změny aktivit detoxikačních a antioxidačních enzymů v jaterních tkáních pravděpodobně souvisí s možným poškozením této tkáně, tak jak vychází z výsledků analýz biochemického vyšetření. Zjištěné nálezy také poukazují na rostoucí potřebu obranných mechanismů v organismu, která je nezbytná, aby se minimalizovalo poškození významných biomolekul (Chowdhury and Saikia, 2020). Indukce oxidativního stresu po expozici nesteroidními antiflogistiky u ryb byla také potvrzena v řadě předchozích ekotoxikologických studií (Láníková et al., 2021; Hodkovicova et al., 2022).

Závěr

Výsledky naší studie potvrdily četnější změny po expozici diklofenakem. Tak jak bylo předpokládáno, statisticky významnější rozdíly v porovnání s kontrolní skupinou byly zjištěny v experimentální skupině vystavené nejvyšší testované koncentraci, tzn. 2 000 µg/kg krmiva. Zde došlo k významnému ovlivnění metabolismu bílkovin a elevaci jaterních enzymů. Signifikantní změny byly také zaznamenány při hodnocení ukazatelů oxidativního stresu, což potvrzuje hypotézu o schopnosti uvedeného farmaka indukovat oxidativní stres. Překvapující jsou také četné změny u jedinců vystavených environmentálně relevantní koncentraci diklofenaku (tzn. 20 µg/kg). V případě ibuprofenu byly zjištěny rozdíly pouze u nejvyšší testované koncentrace. Z uvedených výsledků je

zřejmě potenciální riziko reziduí testovaných farmak pro necílové vodní organismy. Vzhledem k tomu, že ryby jsou farmaky exponovány od začátku svého života, bylo by zajímavé provést dlouhodobé testování, které bude zahrnovat embryonální, larvální, juvenilní i adultní stádia. Mimo jiné by bylo také vhodné provést i kombinované expozice, aby byly co nejvíce simulovány reálné podmínky.

Tato práce byla finančně podpořena ITA VETUNI (projekt č. 2022ITA21).

Literatura

- Ajima, M.N.O., Kumar, K., Poojary, N., Pandey, P.K. 2021. Oxidative stress biomarkers, biochemical responses and Na⁺-K⁺-ATPase activities in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed to diclofenac. *Comparative Biochemistry and Physiology: Toxicology and Pharmacology* 240: 108934.
- 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.
- Cowdhury, S., Saikia, S.K. 2020. Oxidative stress in fish: A review. *Journal of Scientific Research* 121: 145-160.
- Cuklev, F., Kristiansson, E., Fick, J., Asker, N., Forlin, L., Larsson, D.G.J. 2011. Diclofenac in fish: Blood plasma levels similar to human therapeutic levels affect global hepatic gene expression. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30: 2126-2134.
- Das, S.A., Suman, K., Bhagchand, Ch., Rout, S.K. 2019. Ibuprofen: its toxic effect on aquatic organisms. *Journal of Experimental Zoology* 22: 11252-11131.
- Haluzová, I., Modrá, H., Blahová, J., Maršálek, P., Široká, Z., Groch, L., Svobodová, Z. 2010. Effects of subchronic exposure to Spartakus (prochloraz) on common carp *Cyprinus carpio*. *Neuroendocrinology Letters* 31: 105-113.
- Hodkovicova, N., Hollerova, A., Blahova, J., Mikula, P., Crhanova, M., Karasova, D., Franc, A., Pavlokova, S., Mares, J., Postulkova, E., Tichy, F., Marsalek, P., Lanikova, J., Faldyna, M., Svobodova, Z. 2022. Non-steroidal anti-inflammatory drugs caused an outbreak of inflammation and oxidative stress with changes in the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Science of the Total Environment* 849: 157921.
- Lániková, J., Blahová, J., Svobodová, Z. 2021. Occurrence of non-steroidal anti-inflammatory drugs in aquatic environment and their effects on aquatic organisms. *Chemicke Listy* 115: 463-471.
- Maláčova, K., Sehonová, P., Svobodová, Z. 2021. Water contamination by pharmaceuticals and personal care products and their impact on aquatic organism. *Chemicke Listy* 115: 305-311.
- Mathias, F.T., Fockink, D.H., Disner, G.R., Prodocrimo, V., Ribas, J.L.C., Ramos, L.P., Cestari, M.M., de Assis, H.C.S. 2018. Effects of low concentrations of ibuprofen on freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 59: 105-113.
- Ogueji, E.O., Nwani, C.D., Iheanacho, S.C., Mbah, C.E., Okeke, C.O., Yaji, A. 2018. Acute toxicity effects of ibuprofen on behaviour and haematological parameters of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *African Journal of Aquatic Science* 43: 293-303.
- Ogunwale, G.A., Saliu, J.K., Osuala, F.I., Odunjo, F.O. 2021. Chronic levels of ibuprofen induces haematotoxic and histopathology damage in the gills, liver, and kidney of the African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*). *Environmental Science and Pollution Research* 28: 25603-25613.
- Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman, Ch. U., Mohan, D. 2019. Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: chemistry, occurrence, effects, and removal methods. *Chemical Reviews* 119: 3510-3673.
- Ríos, S.E.G., Peñuela, G.A. 2021 Evaluation of ibuprofen and diclofenac in the main rivers of Colombia and striped catfish *Pseudoplatystoma magdaleniatum*. *Environmental Monitoring and Assessment* 193: 210.

- Sibeko, P.A., Naicker, D., Mdluli, P.S., Madikizela, M. 2019. Naproxen, ibuprofen, and diclofenac residues in river water, sediments and *Eichhornia crassipes* of Mbokodweni river in South Africa: An initial screening. *Environmental Forensics*, 20: 129-138.
- Skocovska, M., Ferencik, M., Svoboda, M., Svobodova, Z. 2021. Residues of selected sulfonamides, non-steroidal anti-inflammatory drugs and analgesics-antipyretics in surface water of the Elbe river basin (Czech Republic). *Veterinarni Medicina* 66: 208-218.
- Smook, T.M., Zho, H., Zytner, R.G. 2008. Removal of ibuprofen from wastewater: comparing biodegradation in conventional, membrane bioreactor, and biological nutrient removal treatment systems. *Water Science and Technology* 57: 1-8.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Modrá, H. 2012. Metody hematologického vyšetřování ryb. Jihočeská univerzita, Fakulta rybářství a ochrany vod. 40 s.
- Vaclavik, J., Sehonova, P., Hodkovicova, N., Vecerkova, L., Blahova, J., Franc, A., Marsalek, P., Mares, J., Tichy, F., Svobodova, Z., Faggio, C. 2020. The effect of foodborne sertraline on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Science of the Total Environment* 708: 135082.
- Velíšek J. (ed.) 2018. Vodní toxikologie pro rybáře. Jihočeská univerzita, Fakulta rybářství a ochrany vod. 600 s.

Obsah celkové rtuti ve vybraných tkáních netopýra velkého (*Myotis myotis*) v závislosti na věku a pohlaví

Kamila Novotná Kružíková¹, Petr Linhart¹, Jiří Pikula², Zdeňka Svobodová¹

¹ Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI,

² Ústav ekologie a chorob zoovzvířat, zvěře, ryb a včel, FVHE VETUNI

Abstrakt

Cílem příspěvku bylo zhodnotit obsah celkové rtuti (THg) ve třech tkáních (srst, létací blána a svalovina) u celkem 71 (23 samců a 48 samic) netopýrů velkých (*Myotis myotis*) uhynulých v lokalitě Zastávka u Brna. U osmi jedinců byly analyzovány také játra a ledviny. Obsah celkové rtuti byl měřen atomovým absorpčním spektrometrem AMA 254 ve vybraných tkáních. Nebyl zjištěn významný rozdíl v obsahu celkové rtuti mezi samci a samicemi. Ve sledovaných tkáních bylo signifikantně nejvíce celkové rtuti v srsti ($6,2 \pm 4,03$ mg/kg) netopýrů, naopak nejméně v létací bláně ($0,08 \pm 0,03$ mg/kg). Byl potvrzen vliv věku na obsah celkové rtuti v srsti, kdy vysoce významně vyšší obsah byl ve skupině nejstarších zvířat oproti zvířatům mladým a zvířatům ve věku středním. Byla zjištěna pozitivní korelace obsahu THg mezi srstí a svalovinou ($p < 0,01$; $r_s = 0.5501$), mezi svalovinou a létací blánou ($p < 0,01$; $r_s = 0.7855$) a mezi létací blánou a srstí ($p < 0,01$; $r_s = 0.6385$).

Úvod

Rtuť jako těžký kov se vyskytuje v životním prostředí přirozeně a díky lidské činnosti se ve velkém množství dlouhodobě dostává do ovzduší, půdy a vodního prostředí. Rtuť je mimo jiné obsažena v uhlí a v důsledku těžby dochází ke kontaminaci v okolí místa těžby (Driscoll et al., 2013; Boeing, 2000, Selin, 2009). Rtuť je známá svými škodlivými účinky na volně žijící zvířata (Wolfe et al., 1998). Mnoho studií prezentuje zvyšující se obsah rtuti ve tkáních netopýrů žijících poblíž zdroje rtuti, ale i u netopýrů žijících v prostředí bez známého zdroje rtuti (Korstian, et al., 2018; Ferrante et al., 2018; Little et al., 2015). Např. Korstian et al. (2018) uvádí rozmezí koncentrace rtuti v srsti netopýrů u různých druhů mezi 1,08-10,52 $\mu\text{g/g}$. Hmyzožraví netopýři figurují na vyšším stupni trofického řetězce. Představují tedy vhodný model pro monitoring zátěže prostředí těžkými kovy včetně rtuti (Zukal et al., 2015).

Cílem příspěvku bylo (1) zhodnotit obsah celkové rtuti v třech tkáních netopýra velkého pocházejících z lokality Zastávka u Brna a (2) zjistit vliv věku a pohlaví na obsah celkové rtuti ve sledovaných tkáních.

Materiál a metodika

Zastávka u Brna (Česká republika) se nachází asi 15 km západně od Brna. Jedná se o lokalitu, kde bylo ve druhé polovině 18. století nalezeno uhlí. Těžba uhlí začala v roce 1788 a byla ukončena v roce 1967.

Celkem byly odebrány vzorky od 71 dospělých netopýrů velkých (*Myotis myotis*), kteří byli nalezeni uhynulí na lokalitě Zastávka u Brna. Odběr vzorků proběhl ve spolupráci s Ústavem biologie obratlovců AV ČR (Povolení 181108/2016/KUSK, JMK 13759/2016, KUJCK 161737/2016/OZZL, 3640/ZPZ/2016/ZD-893, KUZL 68700/2016 dle vyhlášky č. 395/1992 Sb., příloha III). U netopýrů bylo určeno pohlaví (23 samců a 48 samic) a při pitvě byly odebrány vzorky tkání (srst, svalovina, létací blána) a vyfoceny zuby pro zařazení do věkové kategorie. U osmi jedinců byly odebrány i játra a ledviny. Vzorky srsti byly uloženy v papírových sáčkích, vzorky ostatních orgánů v zipovacích polyethylenových sáčkích.

Věk jedinců byl určen podle míry obroušení zubů. Jedinci pak byly zařazení do tří skupin: mladá zvířata (Y; $n=23$; neobroušené zuby, obr. 1), jedinci středního věku (M; $n=22$; středně obroušené zuby; obr. 2), starší zvířata (O; $n=24$; výrazně obroušené zuby; obr. 3).



Obrázek č. 1. Jedinec s neobroušenými zuby (skupina Y – mladší jedinci)



Obrázek č. 2. Jedinec se středně obroušenými zuby (skupina M – jedinci středního věku)



Obrázek č. 3. Jedinec s výrazně obroušenými zuby (skupina O – starší jedinci)

V odebraných vzorcích tkání byl měřen obsah celkové rtuti (THg) s využitím AMA 254 (Altec Ltd., Praha, Česká republika) bez předchozí přípravy vzorků, a to v případě svaloviny a létací blány. Srst byla před samotným měřením promyta, aby byla odstraněna povrchová kontaminace (1x v acetonu, 3x ve vodě a 1x v acetonu). Obsah celkové rtuti (THg) byl stanoven v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ čerstvé tkáně (ww). Mez detekce byla stanovena $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$. Přesnost hodnot pro THg byla ověřena pomocí standardního referenčního materiálu, SRM 2976 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg). Výtěžnost byl stanovena měřením SRM 10x a to 94,8 %.

Pro statistické hodnocení byl použit program StatSoft, Inc. (2014), STATISTICA, version 12. Data byla nejprve podrobena testu normality (Shapiro-Wilk test) a to jak zvlášť pro soubor vzorků samic ($n = 48$) a samců ($n = 23$) i jako soubor samic a samců dohromady ($n = 71$) a i ve skupinách rozdělených dle věku. Pro porovnání rozdílu obsahu rtuti mezi samicemi a samci byl použit Mann Whitney U Test a pro analýzy obsahu celkové rtuti mezi jednotlivými tkáněmi i mezi různými věkovými skupinami byla použita Kruskal-Wallisova jednofaktorová analýza rozptylu. Pro hodnocení korelace mezi jednotlivými tkáněmi byl použit Spearmanův koeficient pořadové korelace.

Výsledky a diskuse

Předkládaná práce hodnotí vliv věku a pohlaví na obsah celkové rtuti v 71 netopýrech velkých pocházejících z lokality Zastávka u Brna. Základní statistické charakteristiky obsahu celkové rtuti

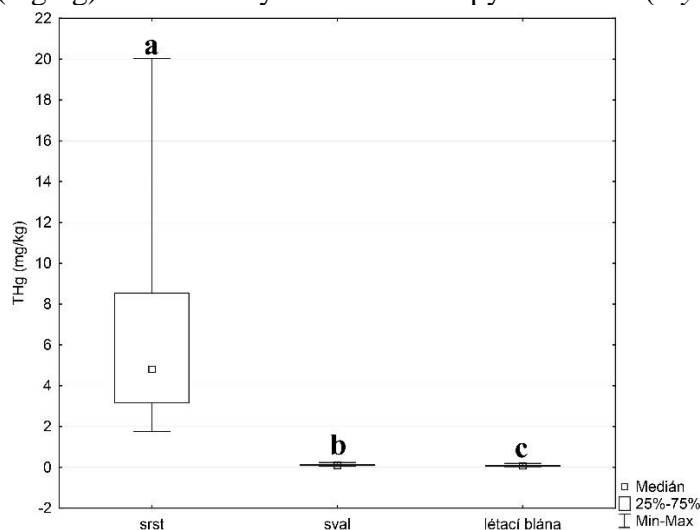
v jednotlivých tkáních jsou uvedeny v tabulce č. 1. Ve sledovaném souboru netopýrů nebyl zjištěn významný rozdíl mezi obsahem rtuti v jednotlivých tkáních (srst $p=0,0799$; svalovina $p=0,1387$; létací blána $p=0,0778$) samic a samců, tedy další analýzy probíhaly pro celou skupinu dohromady bez rozlišení pohlaví.

Tabulka č. 1. Základní popisné charakteristiky obsahu THg (mg/kg) ve sledovaných tkáních netopýra velkého (*Myotis myotis*)

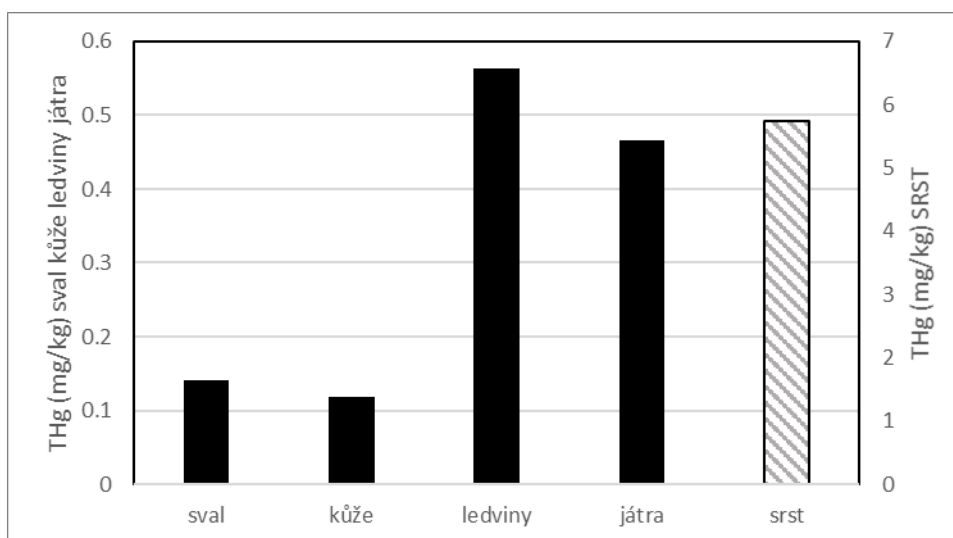
| | srst | sval | létací blána | ledviny | játra |
|---------------------|--------|-------|--------------|---------|-------|
| počet | 71 | 71 | 71 | 8 | 8 |
| průměr | 6,20 | 0,12 | 0,08 | 0,56 | 0,47 |
| medián | 4,81 | 0,11 | 0,08 | 0,47 | 0,43 |
| rozptyl | 16,250 | 0,002 | 0,001 | 0,08 | 0,03 |
| směrodatná odchylka | 4,03 | 0,04 | 0,030 | 0,28 | 0,17 |
| směrodatná chyba | 0,47 | 0,005 | 0,004 | 0,26 | 0,16 |
| minimum | 1,75 | 0,05 | 0,04 | 0,29 | 0,29 |
| maximum | 20,03 | 0,25 | 0,19 | 0,99 | 0,69 |

Obsah THg ve tkáních se pohyboval od 1,7 do 20,0 mg/kg v srsti, mezi 0,05 a 0,25 mg/kg u svaloviny a 0,04 a 0,19 mg/kg v létací bláně (tab. č. 1). Mezi jednotlivými tkáněmi se rtuť vysoce významně lišila, přičemž rtuť klesala ve sledovaných tkáních následovně: srst > sval > létací blána (pro všechny případy $p<0,01$). Porovnání obsahu THg v srsti, svalovině a létací bláně je uveden v grafu č. 1. Mezi některými sledovanými tkáněmi byl zjištěna i významná pozitivní korelace (tab. č. 2). Jako nejvíce těsná se jeví korelace mezi obsahem THg ve svalovině a létací bláně.

Graf č. 1. Obsah THg (mg/kg) ve sledovaných tkáních netopýra velkého (*Myotis myotis*)



Obsah celkové rtuti u osmi jedinců v jednotlivých tkáních je zobrazen na grafu č. 2. Obsah rtuti klesal následovně: srst > ledviny > játra > sval > kůže.

Graf č. 2. Obsah THg (mg/kg) ve sledovaných tkáních osmi jedinců netopýra velkého (*Myotis myotis*)**Tabulka č. 2.** Korelační koeficienty (neparametrický Spearmanův koeficient pořadové korelace)

| | Spearmanův koeficient | p |
|-------------------|-----------------------|--------|
| srst/sval | 0,5501 | 0,0000 |
| srst/létací blána | 0,6583 | 0,0000 |
| sval/létací blána | 0,7857 | 0,0000 |

p=hladina pravděpodobnosti

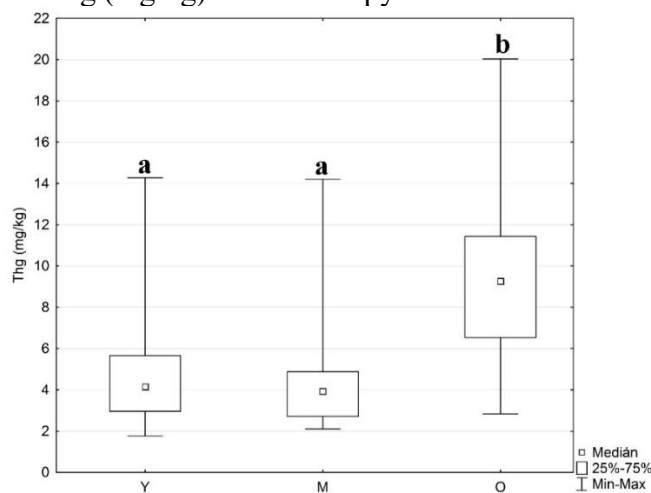
Námi zjištěné výsledky rtuti v srsti netopýrů jsou vyšší než ve studii Ferrante et al. (2018), kdy byl u 101 netopýrů stejného druhu zjištěn medián obsah rtuti 2,4 mg/kg v lokalitě Palombara a 1,8 mg/kg v oblasti Pipistrelli (obě lokality jsou na Sicílii). Na rozdíl od námi zkoumané lokality se ale jednalo o místa, kde k těžbě uhlí nedocházelo a nedochází. Korstian et al. (2018) uvádějí, že průměrná koncentrace rtuti v srsti se pohybuje mezi 1,8 až 10,5 mg/kg a je velmi variabilní uvnitř i mezi různými druhy netopýrů.

Námi sledovaný soubor netopýrů byl rozdělen dle stupně opotřebení chrupu do tří věkových kategorií. Základní statistické charakteristiky pro tři věkové kategorie netopýrů jsou uvedeny v tab. č. 3. Analýza obsahu THg v závislosti na věkové kategorii ukázala, že obsah THg v srsti a létací bláně se významně lišil mezi sledovanými věkovými skupinami. V srsti i létací bláně bylo signifikantně více rtuti u nejstaších jedinců. Zatímco v případě srsti se mezi sebou skupina mladých zvířat a zvířat středního věku nelišila, tak v případě létací blány byl zjištěn navíc rozdíl mezi skupinou mladých zvířat a zvířat středního věku. Obsah THg ve svalovině se mezi třemi věkovými skupinami nelišil. Porovnání obsahu THg (mg/kg) ve svalovině netopýra velkého dle věkových kategorií pro jednotlivé sledované orgány je uvedeno v grafech č. 3–5.

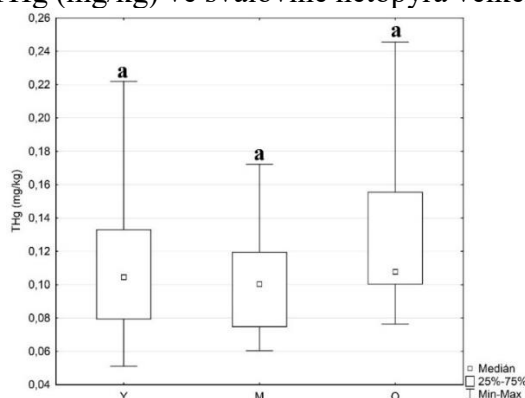
Tabulka č. 3. Základní popisné charakteristiky obsahu THg (mg/kg) pro tři sledované věkové kategorie

| | | Y (n=23) | M (n=22) | O (n=24) |
|--------------|--------|----------------|---------------|---------------|
| srst | průměr | 4,8 | 4,35 | 9,4 |
| | medián | 4,1 a | 3,92 a | 9,3 b |
| | min | 1,75 | 2,10 | 2,8 |
| | max | 20,03 | 14,2 | 20,0 |
| svalovina | průměr | 0,11 | 0,10 | 0,13 |
| | medián | 0,10 a | 0,10 a | 0,11 a |
| | min | 0,05 | 0,06 | 0,07 |
| | max | 0,22 | 0,17 | 0,25 |
| létací blána | průměr | 0,08 | 0,07 | 0,09 |
| | medián | 0,07 ab | 0,07 a | 0,09 b |
| | min | 0,04 | 0,04 | 0,06 |
| | max | 0,19 | 0,12 | 0,16 |

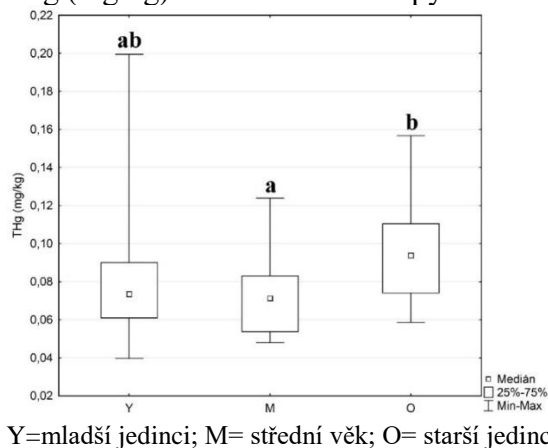
Y= mladší jedinci; M= jedinci středního věku; O= starší jedinci

a, b rozdílné indexy značí signifikantní rozdíl v obsahu THg v tkáních mezi věkovými skupinami**Graf č. 3.** Porovnání obsah THg (mg/kg) v srsti netopýra velkého dle věkových kategorií

Y= mladší jedinci; M= jedinci středního věku; O= starší jedinci

Graf č. 4. Porovnání obsahu THg (mg/kg) ve svalovině netopýra velkého dle věkových kategorií

Y= mladší jedinci; M= jedinci středního věku; O= starší jedinci

Graf č. 5. Porovnání obsahu THg (mg/kg) v létací bláně netopýra velkého dle věkových kategorií

Ze zjištěných výsledků obsahu THg vyplývá, že s přibývajícím věkem se zvyšuje obsah celkové rtuti v srsti a létací bláně netopýra. To je ve shodě s výsledky zjištěnými ve střední Americe (Korstian et al., 2018), kde autoři uvádějí, že věk je důležitým ovlivňujícím faktorem obsahu rtuti v srsti, kdy juvenilní jedinci měli ve srovnání se staršími zvířaty nižší obsah rtuti v srsti, a to u všech jimi sledovaných druhů netopýrů. Obsah rtuti může být ovlivněn životním prostředím netopýrů. Wada et al. (2010) uvádějí průměrný obsah rtuti v srsti netopýrů pocházejících ze znečištěné oblasti $28,0 \pm 4,1$ $\mu\text{g}/\text{kg}$, což je naopak vyšší ve srovnání s námi sledovanou lokalitou, kde byla prováděna v minulosti těžba černého uhlí.

Závěr

Výsledky demonstrují rozdílnost obsahu rtuti ve tkáních netopýra velkého (*Myotis myotis*), přičemž rtuť klesá následovně: srst > ledviny > játra > svalovina > létací blána. Nebyl zjištěn rozdíl mezi obsahem rtuti mezi pohlavím zvířat v žádném ze sledovaných orgánů, na druhou stranu bylo prokázáno, že obsah rtuti v srsti se s věkem významně zvyšuje. Jako přínosné do budoucna by bylo vhodné porovnání obsahu celkové rtuti v netopýrech velkých pocházejících z lokality nezatížené.

Tato práce byla podpořena projektem ITA VETUNI 2022 (Projekt č. 2022ITA21).

Literatura

- Boening, D.W. 2000. Ecological effects, transport, and fate of mercury: A general review. *Chemosphere* 40: 1335-1351.
- Driscoll, C.T., Mason, R.P., Chan, H.M., Jacob, D.J., Pirrone, N. 2013. Mercury as a global pollutant: sources, pathways, and effects. *Environmental Science & Technology* 10:4967-83.
- Ferrante, M., Spina, M.T., Hernout, B.V., Grasso, A., Messina, A., Grasso, R., Agnelli, P., Brundo, M.V., Copat Ch. 2018. Trace elements bioaccumulation in liver and fur of *Myotis myotis* from two caves of the eastern side of Sicily (Italy): A comparison between a control and a polluted area. *Environmental Pollution* 240: 273–285.
- Korstian, J.M., Chumchal, M.M., Bennett, V.J., Hale, A.M. 2018. Mercury contamination in bats from the central United States. *Environmental Toxicology and Chemistry* 37: 160-165.
- Little, m.E., Burges, N.M., Broders, H.G., Cambell, L.M. 2015. Distribution of mercury in archived fur from little brown across Atlantic Canada. *Environmental Pollution* 207: 52-58.
- Selin, N.E. 2009. Global biogeochemical cycling of mercury: A review. *Annual Review of Environment and Resources* 34: 43-63.
- Wada, H., Yates, D.E., Evers, D.C., Taylor, R.J., Hopkins, W.A. 2010. Tissue mercury concentration and adrenocortical responses of female big brown bats (*Eptesicus fuscus*) near a contaminated river. *Ecotoxicology* 19: 1277-1284.

- Wolfe, M.F., Schwarzbach, S., Sulaiman, R.A. 1998. Effects of mercury on wildlife: A comprehensive review. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 146-160.
- Zukal, J., Pikula, J., Bandouchova, H. 2015. Bats as bioindicators of heavy metal pollution: History and prospect. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*. 80: 220-227.

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2022
(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu: 2022ITA22

2. Název projektu:

Vnitropopulační genetická struktura hostitelů a vektorů z pohledu šíření původců nálezů.

3. Řešitel projektu:

Prof. MVDr. Pavel Široký, Ph.D.

Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat

FVHE

E-mail: sirokyp@vfu.cz

Telefon: +420 541 562 637

4. 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 a jejich kompetence

Populační struktura klíšťat

Prof. MVDr. Pavel Široký, Ph.D. (úvazek VFU Brno, 2150, AP 1.0)

Mgr. Branka Bilbija, Ph.D. (úvazek VFU Brno, 2150, AP 1.0)

Mgr. Ivo Papoušek, Ph.D. (úvazek VFU Brno, 2150, AP 1.0)

Populační struktura hostitelských druhů

Prof. MVDr. Ivan Literák, CSc. (úvazek VFU Brno, 2150, AP 1.0)

Význam dalších ptačích ektoparazitů

Prof. RNDr. Oldřich Sychra, Ph.D. (úvazek VETUNI, 2150, AP 1.0)

Zoonózy u zoo zvířat

Doc. MVDr. Eva Bártová, Ph.D. (úvazek VETUNI, 2150, AP 0.5)

Studenti DSP

Ing. Pavla Bondarenko (2. ročník DSP, FVHE, 2150)

MVDr. Marie Špachmanová (1. ročník DSP, FVHE, 2150) – po 1. ročníku ukončila studium

MVDr. Nikola Tománková (2. ročník DSP, FVHE, 2150)

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

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Studium biologie a migrace obratlovců - z veterinárního pohledu hostitelů a rezervoárů nálezů, a studium biologie ektoparazitů a jejich šíření, včetně klíšťat, stejně jako zhodnocení jejich přenašečských kompetencí spadá do tradičního portfolia výzkumu na VETUNI. Studie konzistentně navázala na výzkumy pracoviště v předešlých letech, zejména svojí komplexností a širí záběru. Integrativní přístup, kombinující nejmodernější diagnostické a analytické postupy s klasickými metodami, umožnil dosáhnout vysokých vědeckých standardů a zároveň navázal na dřívější výzkumy. Kombinace klasických zavedených a nových moderních přístupů umožnila propojit běžící výzkum s předešlými výstupy.

Cíle projektu:

- Analýza populační struktury pijáka lužního (*Dermacentor reticulatus*), klíštěcího vektora s výraznou recentní dynamikou areálu a zároveň významného vektora zoonotických patogenů.
- Analýza populační struktury luňáků rodu *Milvus* na území Evropy i šířeji v celém Palearktu.
- Monitoring dalších přítomných ektoparazitů u volně žijících ptáků (ptakotrudek, všenek, roztočů).
- Diagnostika infekčních agens u volně žijících zvířat – želv, hlodavců a letounů, a zhodnocení jejich významu coby rezervoárů.

Popis a metodika řešení projektu:

Ke studiu populačních struktur klíšťat (DNA z celých jedinců) a dravců (DNA z juvenilního peří) byla použita analýza sekvencí (fylogenetické analýzy ML a BI metodami) a analýza variabilních a amplifikovatelných mikrosatelitových lokusů. Vlastní analýza délky mikrosatelitových fragmentů (za přístrojové spolupráce s MUNI; ABI 3130 Genetic Analyzer) proběhla s využitím fluorescenčně značených primerů v multiplexech. Získané fragmenty byly zhodnoceny pomocí programu PEAK SCANNER v.1 (Applied Biosystems), jejich kvalita byla zkontrolována pomocí programu MICRO-CHECKER 2.2.3 a převedena do vhodného formátu (.arp, .str, a .gen) pomocí softwaru CONVERT 1.31. Genetická rozmanitost, počet alel na lokus, počet privátních alel, Hardy-Weinbergova rovnováha, heterozygosita a další charakteristiky uvnitř a mezi klastry byly testovány pomocí programů ARLEQUIN 3.5.2.2. a STRUCTURE 2.3.4. Pomocí programu STRUCTURE HARVESTER v0.6.94 v kombinaci s MAVERICK 1.0 byl zjištěn nejpravděpodobnější počet klastrů, do kterých šlo rozdělit analyzované jedince. Jedinci (analyzované vzorky) byli přiděleni do jednotlivých klastrů, případně byli označeni jako jejich hybridy. Ke zjištění, zda existuje korelace mezi genetickou vzdáleností a geografickou vzdáleností, bylo využito Mantelova testu v rámci analýzy Isolation-by-Distance pomocí programu GenALEX 6.5. Geografická distribuce jednotlivých klastrů a jejich admixtury byla znázorněna pomocí programu QGIS 2.18.14. Získaná data byla dále využita k modelování evoluční historie pomocí Approximate Bayesian computation (ABC) v programu DIYABC v.2.1.0. Tyto analýzy umožnily získat představu o možném vzniku a šíření jednotlivých klastrů, trvání těchto procesů a další informace.

Podrobnou prohlídkou těla ptáků byli sbíráni ektoparaziti (všenky, klíšťata) během jarní a podzimní migrace. Získaný materiál je uložen k dalšímu zpracování – populační genetika a studium endosymbiotických bakterií (všenky), detekce původců vybraných nálezů (klíšťata). Dále byl zpracován také materiál ektoparazitů získaný v předchozích letech. Byly hodnoceny parazitologické parametry (prevalence, intenzita) a také význam pohlaví a migračního chování hostitele pro výskyt těchto ektoparazitů na volně žijících pěvcích. Pro potvrzení morfologické determinace vybraných druhů byla také provedena analýza sekvencí (gen *COI*).

Vybraná infekční agens byla v tkáních detekována běžnými metodami založenými na PCR a analýze sekvencí. Detailní rozpis PCR metod (použité sekvence, primery, cykly, zpracování sekvencí) je součástí publikací. K detekci protilátek proti leptospirám bylo využito otisků srdce z odchycených hlodavců na mikroskopický aglutinační test s použitím 8 sérovarů *Leptospira interrogans* sensu lato (séroskopiny Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Australis, Sejroe, Javanica, Pomona a Pyrogenes).

Dosažené výsledky projektu:

Byla odhalena populační struktura pijáka lužního v rámci celého jeho areálu. Sekvenční data ukazují malou variability a slabý fylogenetický signál formující východně-západní klinu. Analýza mikrosatelitů odhalila existenci tří klastrů, kde zmiňovaný východně-západní gradient doplňuje třetí, severní klastr. Interpretace

těchto výsledků je nesnadná a umožňuje formulovat více alternativních scénářů vývoje. Jednou možností je nezávislé formování třech klastřů v izolovaných refugiích, omezený tok genů ve spojení s geografickou vzdáleností (isolation by distance) mohl umožnit vznik východně západního gradientu (jakýsi bipolární vzor), či vznik některého z klastřů smícháním zbývajících dvou. Jako nejvíc podpořený demografický scénář ukazuje na vznik severního klastru (v Beneluxu a na jihu Británie) smícháním východního a západního klastru před zhruba 200 až 400 generacemi klíšťat a následnou delší izolaci. Tento údaj časově odpovídá vrcholu či konci malé doby ledové v Evropě.

Na základě 699 bp fragmentu *CytB* jsme stanovili haplotypy u 90 mláďat luňáků hnědých. Do haploskupiny A bylo zařazeno 88 vyšetřovaných jedinců, převážně z České republiky, Španělska a Německa. Haploskupina A je charakteristická pro Evropskou populaci luňáků hnědých příslušných k poddruhu *Milvus migrans migrans*. Dva luňáci hnědí z Česka byli zařazeni do haploskupiny B1, odpovídající asijské populaci poddruhu *Milvus migrans lineatus*. Jedná se o prioritní průkaz hnízdění luňáků hnědých s asijským genotypem *lineatus* v celé Evropě. Objevení mláďat luňáků hnědých s haplotypem *CytB* příslušným k poddruhu *M. m. lineatus* v Česku potvrzuje šíření hybridní zóny *M. m. migrans* a *M. m. lineatus* od Uralu směrem na západ.

Nově bylo odchyceno celkem 238 ptáků, z toho 48 špačků obecných, u kterých bylo s prevalencí 83 % nasbíráno 341 všenek čtyř druhů: *Myrsidea cucullaris* (dominance 51 %), *Menacanthus eurysternus* (29 %), *Brueelia nebulosa* (15 %) a *Sturnidoecus sturni* (5 %). Klíšťata byla nalezena u 8 ptáků. Byl zhodnocen výskyt všenek u 1185 volně žijících pěvců odchycených v rákosiných porostech na jižním Slovensku. Cílovými ptáky byly dva stálé druhy (sýkořice vousatá a rákosník tamaryškový) a tři druhy tažné (rákosník obecný, rákosník proužkovaný a cvrčilka slavíková). Celkově byl zaznamenán u stálých ptáků statisticky významně větší prevalence i průměrná abundance napadení všenkami (prevalence 83 %, intenzita 8, n = 114) než u ptáků tažných (prevalence 12 %, abundance 0,8, n = 906). Průměrná intenzita napadení však nebyla u obou skupin ptáků rozdílná (9,8 vs. 7,1). Zajímavým výsledkem bylo, že u stálých ptáků se výrazně více vyskytovali péřovky než luptouši, zatímco u tažných ptáků to bylo přesně naopak. U dvou nedostatečně známých druhů všenek sýkořice vousaté *Penenirmus visendus* a *Menacanthus brelihi*, byla připravena jejich redeskripcie. Platnost těchto druhů byla potvrzena také analýzou genu *COI*.

Ze vzorků tkání 100 netopýrů (52 *Myotis myotis*, 43 *Nyctalus noctula* a 5 *Vespertilio murinus*) byly pomocí PCR detekovány - *Encephalitozoon* spp. u 25% (25/100) netopýrů všech 3 druhů. Sekvenčně odpovídaly genotypům *E. cuniculi* II a *E. hellem* 2C. *T. gondii* byla detekována pouze u jednoho netopýra (*M. myotis*), zatímco *N. caninum* nebyla odhalena. U volně žijících hlodavců v Zoo Brno (n=117) došlo k průkazu *T. gondii* u 16 % (16/97) a *Encephalitozoon* spp. u 20 % (22/108). Protilátky proti *Leptospira* sp. byly detekovány u 6,1 % (52/855) volně žijících drobných savců s prevalencí 6,4 % (51/801) u hlodavců a 1,9 % (1/54) u hmyzožravců. Statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,05$) byl v prevalenci mezi jednotlivými druhy (0 % – 33 %), zatímco pohlaví (6,7 % u samic a 5,1 % u samců), lokalita (1,8 % – 8 %) ani rok odchytu (0 % – 8,4 %) neměly vliv na prevalenci. Byly zjištěny dva sérovary *L. interrogans* Pomona (5,5 %) a *L. interrogans* sérovar *Grippotyphosa* (0,5 %). V krvi želv jihovýchodní Asie byly nalezeny nové druhy krevních parazitů a objevena specifita hojně užívaných primerů, korelující s fylogenezí parazitů.

Byly finalizovány pilotní studie želvích hostitelů, kde se jako velmi perspektivní a hodnou pokračování jeví studie odhalující velkou rezistenci a reprodukční profit populací želv *Mauremys leprosa* žijících v Alžírsku na velmi znečištěných lokalitách v porovnání s intaktními biotopy.

Přínos projektu:

- Byla odhalena populační struktura pijáka lužního a byly nastíněny interpretace jeho možného šíření od posledního glaciálního maxima.
- Byl získán unikátní výsledek studia genetické struktury populace luňáků hnědých v Evropě.
- Výsledky projektu rozšiřují znalosti o vzájemných ekologických vztazích mezi hostiteli a jejich ektoparazity (všenkami).
- Byly významně navýšeny znalosti o diverzitě, prevalenci, hostitelské specifitě a distribuci studovaných infekčních agens.

Využití výsledků:

- Získali jsme data o populační struktuře pijáka lužního, což umožňuje rekonstrukci historického procesu jeho šíření a modelování budoucího vývoje.
- Máme nová data o jednom z významných vektorů patogenních

bakterií v přírodě Evropy. •Výsledky projektu umožňují další rozvoj studia parazito-hostitelckých vazeb ektoparazitů, včetně případného hodnocení jejich vlivu na volně žijící ptáky. Materiál získaný při terénních odchycích bude dále zpracován a analyzován. •Výsledky byly zveřejněny vědecké obci i laické veřejnosti.

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

Publikované:

Bilbija, B., Spitzweg, C., **Papoušek, I.**, Fritz, U., Földvári, G., Mullett, M., Ihlow, F., Sprong, H., Civiňová Křížová, K., Anisimov, N., Belova, O.A., Bonnet, S.I., Bychkova, E., Czułowska, A., Duscher, G.G., Fonville, M., Kahl, O., Karbowski, G., Kholodilov, I.S., Kiewra, D., Krčmar, S., Kumisbek, G., Livanova, N., Majláth, I., Manfredi, M.T., Mihalca, A.D., Miró, G., Moutailler, S., Nebogatkin, I.V., Tomanović, S., Vatabsever, Z., Yakovich, M., Zanzani, S., **Široký, P.** *Dermacentor reticulatus* – a tick on its way from glacial refugia to a panmictic Eurasian population. *International Journal for Parasitology*, <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2022.11.002> (VETUNI 2022ITA22; GINOP-2.3.2-15-2016-00057; RRF- 2.3.1-21-2022-00006; COST Action CA21170) IF 4.33 (Q1)

Gahmous, S.A., Tiar, G., Tiar-Saadi, M., Bouslama, Z., **Široký, P.** 2022. Reproductive traits demonstrate how well the Mediterranean stripe-necked turtle *Mauremys leprosa* can flourish under highly degraded–polluted conditions. *Biology-Basel* 11: 1562. (VETUNI 2022ITA22) IF 5.168 (Q1)

Sychra, O., Ošlejšková, L., Skoupá, Ž, Najer, T., **Literák, I.**, **Papoušek, I.**, Trnka, A., Čapek, M. Chewing lice of passerine birds in reed beds in Slovakia, with a special focus on *Panurus biarmicus*. *Medical and Veterinary Entomology*, accepted for publication (VETUNI 2022ITA22) IF 2.479 (Q2)

Tiar-Saadi, M., Tiar, G., Bouslama, Z., **Široký, P.** 2022. Mechanisms determining body size and shape difference in Algerian spur-thighed tortoises (*Testudo graeca*). *Animals* 12: 1330. (VETUNI 2022ITA22) IF 3.231 (Q1)

Zechmeisterová, K., Přibyl, M., Nguyen, H.M., Nosková, E., **Široký, P.** 2022. Haemogregarines of the genera *Haemogregarina*, *Hemolivia*, and *Hepatozoon* infecting Vietnamese freshwater turtles, with additional notes on primer specificity and primer-template mismatches affecting diagnostic success. *Protist*, 2022, no. 125884. (VETUNI 2022ITA22) IF 2.565 (Q4)

Žákovská, A., Tremml, F., Nejezchlebová, H., Nepeřený, J., Budíková, M., **Bártová, E.** *Leptospira interrogans* sensu lato in wild small mammals in three Moravian localities of the Czech Republic. *Pathogens* 2022, 11: 888 (VETUNI 2022ITA22, MUNI/A/1340/2021). IF 4.531 (Q2)

V procesu:

Bártová, E., Marková, J., Sedláčková, J., Bandouchová, H., Račka, K. Molecular detection of selected endoparasites in vespertilionid bats from Central Europe. (VETUNI 2022ITA22) Zasláno do redakce.

Tománková, N., **Bártová, E.**, Marková, J., Žákovská, A., Budíková, M. Wild small mammals in area of zoo – reservoir of *T. gondii* and *Encephalitozoon* spp.? (VETUNI 2022ITA22) Připravený rukopis.

CytB haplotyping in black kites breeding in Europe: mother line associated with *lineatus* genotype. *Journal of Ornithology*, Q2. V přípravě.

Konferenční příspěvky:

BÁRTOVÁ, E., ŽÁKOVSKÁ, A. Ticks and wild small mammals in Zoological gardens – reservoir of agents with zoonotic potential? 4th European congress on Infectious Diseases, Paris, France, 10.-11.11.2022, p. 17 (VETUNI 2022ITA22, MUNI/A/1340/2021). Přednáška.

ŽÁKOVSKÁ, A., **BÁRTOVÁ, E.**, VÁŇA, P., PITTERMANNOVÁ, P., TREML, F. Ticks and wild small mammals in Zoological gardens Brno, Czech Republic – reservoir of agents with zoonotic potential? 10th Tick and Tick-Borne Pathogen Conference, Murighiol, Danube Delta, Romania, 29.8.-2.9.2022 (VETUNI 2022ITA22). Poster.

SYCHRA, O., OŠLEJŠKOVÁ, L., MALENOVSKÝ, I. Collection of chewing lice (Phthiraptera) of dr. František Balát deposited at the Moravian Museum Brno. In *Book of Abstracts of International Zoological Congress of „Grigore Antipa“ Museum*. Bucharest, Romania: 2022, p. 22.

SYCHRA, O., OŠLEJŠKOVÁ, L. Collection of chewing lice (Phthiraptera) of dr. Karel Pflieger (Czech Republic). In *Book of Abstracts of International Zoological Congress of „Grigore Antipa“ Museum*. Bucharest, Romania: 2022, p. 30.

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

| Položka | Finanční prostředky | |
|---------------------------------------|---------------------|------------------|
| | Přidělené (v Kč) | Čerpané (v Kč) |
| Osobní náklady celkem (včetně odvodů) | 410.000 | 410.000 |
| Služby | 327.174 | 330.209 |
| Cestovné | 143.000 | 118.316 |
| Další provozní náklady | 913.522 | 935.171 |
| Doplňkové náklady | 269.054 | 269.054 |
| Celkem | 2.062.750 | 2.062.750 |

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

(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 (410 tis.)

Prof. MVDr. Pavel Široký, Ph.D. – odměna AP – 60 000 Kč
 Prof. MVDr. Ivan Literák, CSc. – odměna AP – 60 000 Kč
 Prof. RNDr. Oldřich Sychra, Ph.D. – odměna AP – 60 000 Kč
 Doc. MVDr. Eva Bártová, Ph.D. – odměna AP – 40 000 Kč
 MVDr. Branka Bilbija, Ph.D. – odměna AP – 50 000 Kč
 Mgr. Ivo Papoušek, Ph.D. – odměna AP – 50 000 Kč

MVDr. Marie Špachmanová – stipendium DSP – 15 000 Kč

Ing. Pavla Bondarenko – stipendium DSP – 45 000 Kč

MVDr. Nikola Tománková – stipendium DSP – 30 000 Kč

vyplaceno u všech členů týmu nadvakrát v červnu a listopadu, s výjimkou MVDr. Marie Špachmanové, která ukončila doktorské studium po prvním ročníku a její úkoly v druhé polovině projektu převzala Ing. Pavla Bondarenko

Služby (330 tis.)

Náklady na služby byly čerpány na potřebu servisního sekvenování molekulárně genetických markerů, včetně diagnostikovaných patogenů, které nelze provádět vlastními prostředky. Část služeb se týkala také nákladů na provoz telemetrických zařízení. Další část byla použita na poplatky spojené s korekturami rukopisů a publikační náklady ve vědeckých časopisech. Byly pořízeny roční licence programu Geneious k fylogenetickým analýzám. Prostředky také posloužily k pokrytí nutných oprav a servisu laboratorních přístrojů a zařízení.

Cestovné (118 tis.)

Cestovné bylo čerpáno méně, než byl původní plán. Cestovné po ČR se týkalo primárně odběru vzorků (Sychra, Široký, Literák)

ZSC – odběr vzorků (prof. Literák – Slovensko, Řecko), studijní pobyt v entomologických sbírkách v Natural History muzeu v Londýně (prof. Sychra – vyhledání a zhodnocení srovnávacího materiálu) a účast na konferencích - prof. Široký (Německo), Doc. Bártová (Francie)

Další provozní náklady (935 tis.)

Široké spektrum použitých laboratorních metod a metod terénního výzkumu se odrazilo jak množstvím spotřebního materiálu, tak speciální laboratorní chemie. Šlo zejména o izolační kity na izolaci nukleových kyselin, chemikálie na PCR (voda, etanol, mastermixy, qPCR Probe Mastermix, primery), destičky s fóliemi, materiál na elektroforézu (agaróza, špičky na vyřezávání z gelu, hmotnostní standardy, barviva), přečišťování produktů a fluorescenčně značené primery. Práce s mikrosatelity vyžaduje chemii na fragmentační analýzu (kapilárová array, formamid, velikostní standard, separační polymer aj.). Vše bylo provázeno spotřebou laboratorního plastu, jako jsou špičky, sekvenční destičky, stripy, mikro zkumavky, skladovací boxy, a také ochranných pomůcek (rukavice, dezinfekce, papírové utěrky apod). Další oblastí byly náklady na provoz vysílaček, materiálu pro mikroskopické analýzy (imersní olej, mikroskopická skla, zalévací média a chemie na barvení) a entomologické potřeby. Byl pořízen grafický tablet pro entomologické analýzy, digitální fotoaparát na stereomikroskop, odborné knihy, tonery a další kancelářské potřeby. Byly zaplacený PHM.

Doplňkové náklady (269 tis.)

Doplňkové náklady, tedy v podstatě plánovaná režie (15%), byly odvedeny univerzitě dle plánu.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

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

9. 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: 6. ledna 2023, Prof. Pavel Široký

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:** 6. ledna 2022, Prof. Pavel Široký

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. ledna 2022, Prof. Ivan Literák

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu: Ing. Šárka Kelnarová

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: Doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2022

1. Identifikační číslo projektu: 2022ITA23

2. Název projektu:

Vliv bioaktivních látek na funkční vlastnosti potravin (jedlých obalů) a imunoreaktivitu alergenních proteinů

Dílčí projekt 1: Vývoj biodegradabilních matric s inteligentními a funkčními vlastnostmi pro aplikaci v potravinářství

Dílčí projekt 2: Ověření imunoreaktivity ELISA testů na průkaz potravinových alergenů

3. Řešitel projektu:

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

Fakulta/celoškolské pracoviště: **FVHE / Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu**

E-mail: tremlovab@vfu.cz

Telefon: 541562700, 602116956

4. Řešitelský kolektiv:

Řešitelský kolektiv 1 a 2 tvoří akademičtí pracovníci, výzkumní pracovníci a studenti DSP Ústavu hygieny a technologie potravin rostlinného původu.

Akademičtí pracovníci

doc. 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.

doc. MVDr. Matej Pospiech, Ph.D., akademický pracovník, úvazek 0,96 – koordinace dílčích aktivit, ověřování koncentračních řad a navržených metodik (kontrola analýz ELISA, výběr vzorků a výrobků) a statistické zpracování výsledků a interpretace výsledků, příprava a kontrola publikací, vypracování podkladů pro zprávu o řešení projektu.

doc. MSc. Dani Dordevic, Ph.D., akademický pracovník, úvazek 1,0 – koordinace dílčích aktivit, výroby biodegradabilních matric, stanovení celkových polyfenolů spektrofotometricky a pomocí HPLC, textura, analýza FTIR, XRD, antimikrobiální analýza, stanovení zeta-potenciálu, 3D tisk matric, hodnocení vzorků a interpretace výsledků, příprava a kontrola publikací, vypracování podkladů pro zprávu o řešení projektu

Mgr. Zdeňka Javůrková, Ph.D., akademický pracovník, úvazek 1,0 – provedení analýz ELISA (lepek (Tri a) – Kity Neogen, Biocheck)

Mgr. Marie Bartlová, Ph.D., akademický pracovník, úvazek 1,0- příprava koncentračních řad bioaktivních látek

Ing. Alexandra Tauferová, Ph. D., akademický pracovník, úvazek 0,6 – obrazová analýza připravených vzorků, hodnocení výsledků, vypracování podkladů pro závěrečnou zprávu a publikace

Ing. Lenka Havlová, Ph.D. akademický pracovník, úvazek 1,0 provedení analýz ELISA (crustaceae – Kity Neogen, Biocheck),

Studenti DSP

Ing. Karolína Těšíková (2. rok studia) – stanovení antioxidační aktivity, celkových polyfenolů, texturálních parametru, zpracování a interpretace výsledků 3D tisknuté matric

Mgr. Johana Zemancová (1. rok studia) – výroba biodegradabilních matric stanovení antioxidační aktivity a celkových polyfenolů

Mgr. Martina Pečová (2. rok studia) – úvazek 0,5 příprava koncentračních řad bioaktivních látek, ověřování koncentračních řad a navržených metodik.

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

Všechny dílčí úkoly projektu včetně interpretace výsledků byly řešeny na Ústavu hygieny a technologie potravin rostlinného původu na Fakultě veterinární hygieny a ekologie VFU Brno.

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Téma projektu je v souladu s podporovanými směry výzkumu na VETUNI i na fakultě, konkrétně se jedná o oblast bezpečnosti, hygieny a technologie potravin.

Projekt byl zaměřen:

- a) na ekologické řešení potravinářských senzorů. Použitím těchto biodegradabilních matric je možné pozitivně ovlivnit trvanlivost potravin a díky inteligentním vlastnostem pak detekovat kažení potravin, které se zrychluje při nedodržení skladovacích podmínek.
- b) na problematiku potravinových alergenů, které představují dlouhodobý problém ve výživě lidí, a jejich chybný průkaz může způsobit závažné formy alergických reakcí. S ohledem na vzrůstající používání bioaktivních látek k udržení trvanlivosti potravin jako náhrad potravinových přídatných látek, je nezbytné také ověřit jejich vliv na doposud používané testy k průkazu alergenů.

Řešení projektu podpořilo výzkumnou činnost, která dosud nebyla řešena v rámci jiného výzkumného úkolu.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Dílčí projekt 1:

Cílem dílčího projektu byl vývoj biodegradabilních matric s použitím prášku a výluhu z čocky, hodnocení chemicko-fyzikálních vlastností, stability a migračních vlastností obalů z nich vytvořených, testování změn barvy obalu v prostředích s různou hodnotou pH a vyhodnocení technologie 3D tisku biodegradabilních matric.

Dílčí projekt 2:

Cílem dílčího projektu bylo ověření změny imunoreaktivity ELISA testů na průkaz potravinových alergenů v závislosti na přídavcích bioaktivních látek do potravin a ověření změny imunoreaktivity na hotových výrobcích.

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany):

Dílčí projekt 1:

Výroba biodegradabilních matric

Obaly byly vyrobeny ze základní matrice – chitosanu nebo karagenanu, kdy do této matrice byl přidáván prášek z černé čočky a také výluh – voda získaná po uvaření čočky v následujícím složení:

chitosanové obaly: kontrola, čočkový prášek: 1; 1,5 a 2 %; výluh: 5, 10 a 20 %

karagenanové obaly: kontrola, čočkový prášek: 1; 1,5 a 2 %; výluh: 5, 10 a 20 %

Celkem bylo vyráběno 14 druhů vzorků obalů, a to jednak postupem ověřeným a popsáním v předchozích projektech ITA a dále 5 vzorků biodegradabilní matrice pomocí 3D tiskárny (čočka byla součástí matric, která se vyráběla pomocí 3D tiskárny).

Každý vzorek byl podroben celkem analýzám minimálně 3x, aby se mohla provést správně statistická analýza.

Provedené analýzy:

Vyrobené biodegradabilní matrice byly hodnoceny následujícími metodami:

- a) stanovení texturálních parametrů pro průkaz interakcí mezi použitými složkami a jejich vlivu na pružnost a pevnost matric,
- b) barva obalů byla stanovena jako optické snímky a spektrofotometricky,
- c) ATR FTIR, XRD – analýza chemicko-strukturálních vlastností, tj. chemické vazby mezi použitými komponenty a potvrzení, zda došlo k dokonalému zakomponování do matrice obalu,
- d) SEM – pro informace o vzhledu povrchu a řezu obalu a o přilnutí obalu na balenou potravinu,
- e) antioxidační aktivita – stanovením obsahu celkových polyfenolů metodou dle Folin-Ciocalteu a HPLC byly kvalitativně i kvantitativně stanoveny 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 maximálně objektivního zhodnocení antioxidačních vlastností,
- f) antimikrobiální aktivita – byla stanovena modifikovanou diskovou difúzní metodou dle EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) za použití bakterií *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* a kvasinky *Candida albicans*,
- g) *in vitro* gastrointestinální (pepsin-pankreatin) simulované trávení experimentálně vyrobené biodegradabilní matrice,
- h) simulace kažení mouk (celozrnná a bílá) při skladování, k moukám byly přidány vyrobené biodegradabilní indikátory a následně byla sledována změna barvy indikátoru,
- i) testování možnosti výroby biodegradabilních matric pomocí 3D tiskárny.

Dosažené výsledky byly zhodnoceny statistickými metodami: t-test, ANOVA, Principal component analysis, Pearson correlation a cross correlation.

Dílčí projekt 2:

Ověření inhibičního účinku bioaktivních látek probíhalo ve dvou fázích. Nejprve byl ověřen inhibiční účinek bioaktivních látek na čistý antigen lepku (Tri a) a koryši bílkovinu (přes tropomyosín) v koncentracích 200ng/ml. Čistý protein byl testován v koncentracích přídatku bioaktivních látek 0, 0,5, 1,5 a 3 %. Testované bioaktivní látky byly ((Merck, USA; Thermo scientific, USA):

PKU Kyselina p-kumarová

KGA Kyselina gallová

RUT Rutin

BCA Beta-karoten

KKA Kyselina kávová

KCH Kyselina chlorogenová

KVE Kvercetin

LYK Lykopen
ZEA Zeaxanthin

EPI Epikatechin

Ke stanovení byly použity kity podle konkrétního alergenu. Jednalo se o Gluten-Check™ ELISA kit a Crustace Allergen-Check ELISA od firmy Bio-Check a dále Gliadin R5 a Veratox for Crustacea od firmy Neogen.

Roztoky antioxidantů byly naředěny destilovanou vodou na požadovanou koncentraci. Následně byla provedena inkubace 100 µl roztoků antioxidantů se 100 µl roztoků gliadinu (Merck, USA) a tropomyosinu (VWR, CZE) 1 hodinu. Roztok gliadinu a Natural Shrimp Tropomyosinu byly použity v koncentraci 400 ng. 4 mg gliadinu bylo rozpuštěno v 1 ml DMSO a následně naředěno destilovanou vodou. Tropomyosin byl připraven v 1 ml PBS pufru v množství 3,3 ul. Před testováním ještě naředěn PBS puftrem v poměru 1:4, pro výrobky v poměru 1:8.

V druhé fázi byl ověřován vliv potravinové matrice na výrobcích zakoupených z tržní sítě. Pro stanovení lepku byla zvolena Strouhanka (Matrice 1) (Penam, Česká republika) a Tarhoňa (Matrice 2) (Ideal, Česká republika). Pro stanovení korýšů byly zvoleny Krevety v nálevu (Matrice 1) (předvařené krevety 60 % vztaženo na hmotnost bez glazury) a Surimi tyčinky (Matrice 2) (Surimi 41 % rybí maso, stabilizátory, cukr). Výrobky byly testovány s přidavkem bioaktivních látek Lykopen, Epikatechin a kyselina kávová v koncentracích 0,0; 0,5; 1,5; 5,0 a 15 %. Všechny vzorky byly připraveny v duplikátu, každé měření bylo provedeno třikrát.

Dosažené výsledky projektu (max. 1/2 strany):

Dílčí projekt 1

Výsledkem řešení projektu jsou biodegradabilní výrobky, které splňují požadavky na následující vlastnosti:

- zdravotní nezávadnost s ohledem na spotřebitele,
- rozložitelnost a konzumovatelnost,
- částečné inteligentní vlastnosti – změna barvy v závislosti na pH
- možnost výroby biodegradabilní matrice pomocí 3D tisku

Výsledky řešení projektu ukázaly reálnou možnost výroby biodegradabilních matric s přidavkem čočkového prášku a výluhu. Vyrobené obaly budou součástí dalšího výzkumu, který bude zahrnovat aplikování na jedlé a nejedlé komodity.

Dílčí projekt 2:

V rámci **dílčího cíle 2** bylo ověřeno, že bioaktivní látky mají vliv na imunoreaktivitu používaných kontrolních testů. Se vzrůstající koncentrací bioaktivní látky dochází ke snížení odpovědi testu v průměru o 36 %. Rovněž byly potvrzeny rozdíly mezi jednotlivými testy (Veratox Lepek R=0,6, Biocheck Lepek R=0,59, Veratox Crustacea R=0,45, Biocheck Crustacea R=0,75) se vzrůstající koncentrací přídatku bio aktivní látky. Při analýzách alergenních proteinů ELIS kity je proto vhodné zohlednit jejich přidavek do potraviny.

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Přínosem **dílčího projektu 1** je především úspěšná experimentální výroba biodegradabilních obalů s příznivými vlastnostmi, které se mohou aplikovat na různé jedlé a nejedlé výrobky. Přidavek čočkového prášku a výluhu se ukázal jako jedna z možností fortifikace biodegradabilních obalů a také jako možnost jeho přídatku do výrobků 3D tisku.

V rámci **dílčího cíle 2** byla zavedena metodika ověřování imunoreaktivity imunochemických metod v závislosti na obsah bioaktivních látek v potravinách. Kromě zavedení metodiky je

přínosem zvýšení bezpečnosti spotřebitelů s ohledem na přesnější interpretaci výsledku imunochemických metod s ohledem na změnu imunologické odezvy použitých detekčních kitů na průkaz alergenů v potravinách.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Dílčí cíl 1

Výsledky budou použity na publikování článků s impakt faktorem a vzhledem k dosaženým příznivým vlastnostem produktů také na pokračování výzkumu týkajícího se fortifikace biodegradabilních matic s přidavkem čočkového prášku a výluhu. Získané výsledky pomohly k dalšímu rozvoji výroby biodegradabilních matic na Ústavu hygieny a technologie potravin rostlinného původu.

Dílčí cíl 2

Dosažené výsledky budou použity k publikování do impaktovaného článku. Dosažené výsledky lze použít také pro korekci výsledků ELISA testů pro průkaz alergenů v potravinářském průmyslu, tak aby prezentované výsledky za použití těchto kitů, více odpovídali imunitní odezvě potraviny.

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

Dílčí cíl 1

Plánováno submitovat v březnu 2023:

Lentil flour as Fortification element in Biodegradable Packaging. *Foods*. (Q1)

Characterization of In Vitro, Antioxidant and Textural Properties of 3D Printed Chocolate Objects with the Addition of Lentil Flour. *International Journal of Bioprinting* (Q1)

Dílčí cíl 2

Submitováno a v oponentském řízení:

Influence of the addition of grape flour and selected nanoparticles on the immunoreactivity of model hydrocolloid matrix by ELISA method. *Food and Agricultural Immunology* (Q2)

Plánováno submitovat začátkem příštího roku (březen 2023):

Effect of benzoic core antioxidants on immunoreactivity of immunoassays. *Food and Agricultural Immunology* (Q2) nebo *Food Control* (Q1).

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

| Položka | Finanční prostředky | |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------|
| | Přidělené (v Kč) | Čerpané (v Kč) |
| Osobní náklady celkem (včetně odvodů) | 769 000 | 768 990,00 |
| Služby | 199 000 | 229 186,97 |
| Cestovné | 58 000 | 24 481,99 |
| Další provozní náklady | 854 566 | 857 907,04 |
| Doplňkové náklady | 282 084 | 282 084,00 |
| Celkem | 2 162 650 | 2 162 650,00 |

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

Osobní náklady:

Podíl osobních nákladů činí byl skutečnost činí 40,89 % z přímých nákladů projektu (včetně odvodů fakulty), 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 (akademičtí pracovníci) 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:

Náklady na služby činí 12,18 % z přímých nákladů. Položka byla navýšena, avšak méně než 20 % oproti plánované hodnotě. K navýšení byly využity prostředky nevyčerpané v položce Služby. Prostředky byly čerpány na servis přístrojů, pronájem tlakových lahví, překlady, licence a zahraniční vložné.

Cestovné:

Čerpáno na zahraniční a tuzemské služební cesty – konference. Položka nebyla využita v plánované výši.

Další provozní náklady:

Podíl dalších provozních nákladů tvoří 45,61 % přímých nákladů projektu.

Finanční prostředky byly vyčerpany v souladu s plánem projektu na:

DHM – 3D tiskárna, sondy a nástavce k přístrojům, vodní lázeň, homogonizátor, inkubátor, mikropipeta

spotřební materiál – běžné a speciální chemikálie, vzorky, laboratorní sklo speciální, ochranné rukavice, speciální kity a testy, Petriho misky, histologická skla, laboratorní sklo, terčíky pro SEM analýzu, laboratorní pomůcky

Doplňkové náklady:

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

Celkové plánované náklady byly vyčerpany.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS. Je doložen jako příloha.

9. 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.

9.1.2023 prof. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.

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 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.

9.1.2023 prof. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.

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.

9.1.2023 prof. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.

Datum, jméno a podpis

přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

9.1.2023 Ing. Šárka Kelnarová

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.

9.1.2023 doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Razítko

Přílohy

1. Výpis z IFIS 29-TA222051-ITA (Tremlová) z 9.1.2023

2. Popis řešení

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2022
(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu: 2022ITA24

2. Název projektu:

Vybrané aspekty zdravotní nezávadnosti a kvality alternativ masa na bázi rostlinných bílkovin

3. Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.
Fakulta/celoškolské pracoviště: Fakulta veterinární hygieny a ekologie
E-mail: bursovas@vfu.cz
Telefon: 541 562 710

4. Řešitelský kolektiv:

složení řešitelského týmu: (akademickí 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

doc. MVDr. Josef Kameník, CSc., MBA, akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitel – koncepce a koordinace Aktivita 1, odpovědnost za čerpání finančních prostředků, odběr vzorků, komunikace s dodavateli vzorků, 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 – zajištění vzorků, kulinární příprava vzorků, senzorické vyšetření, analýza a statistické hodnocení získaných výsledků, příprava publikací (Aktivita 3)

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 2, odpovědnost za čerpání finančních prostředků, příprava vzorků k chemickým analýzám a rozdělení připravených vzorků mezi jednotlivá pracoviště, příprava metodiky a podíl na stanovení spektra mastných kyselin, analýza a statistické hodnocení získaných výsledků, příprava publikace (Aktivita 2)

MVDr. Jiří Bednář, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, akademický pracovník, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitel – zajištění vzorků, zajištění tepelné úpravy a kulinární přípravy vzorků, senzorické vyšetření, analýza a statistické hodnocení získaných výsledků, příprava publikací (Aktivita 3)

Mgr. Kateřina Dorotíková, akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 0,5; spoluřešitelka – analýza vzorků, identifikace izolátů, charakterizace izolovaných kmenů bakterií, molekulárně-biologické analýzy, podíl na realizaci publikace (Aktivita 1)

Mgr. Marta Dušková, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitelka – analýza vzorků, identifikace izolátů, charakterizace izolovaných kmenů bakterií, molekulárně-biologické analýzy, 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 – zajištění vzorků, stanovení podílu bílkovin, tuku a vlhkosti/sušiny ve vzorcích, kulinární příprava vzorků, senzorické vyšetření, stanovení texturních parametrů, analýza a statistické hodnocení získaných výsledků, příprava publikací (Aktivita 2, 3)

Ing. Blanka Macharáčková, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitelka – analýza vzorků s využitím AAS za účelem stanovení obsahu sodíku a dalších vybraných prvků, statistické zpracování získaných výsledků a určení obsahu soli ve vzorcích, příprava publikace (Aktivita 2)

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

Mgr. Jan Pospíšil, akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitel – podíl na stanovení spektra mastných kyselin včetně vyhodnocení výsledků, podíl na přípravě publikace (Aktivita 2)

MVDr. Zora Šťásková, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 0,5; spoluřešitelka – podíl na praktické realizaci projektové metodiky, analýza získaných výsledků, podíl na realizaci publikace (Aktivita 1)

Mgr. Petra Furmančíková, student DSP FVHE VETUNI – prezenční forma, 4. rok studia, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE; spoluřešitelka – mikrobiologická analýza vzorků, podíl na realizaci publikace (Aktivita 1)

Změna oproti plánu projektu: z důvodu dlouhodobé pracovní neschopnosti **doc. MVDr. Hany Buchtové, Ph.D.** se na řešení úkolů, které dle původního plánu měla zajišťovat paní docentka, podílel Ing. František Ježek, Ph.D., a to včetně kontroly čerpání finančních prostředků v rámci aktivity 3.

5. 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.

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Předmětem řešení projektu byla problematika zdravotní nezávadnosti a kvality alternativních potravin a pokrmů, která je 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 předchozí úspěšně řešené projekty Ústavu hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie interních (IGA VETUNI, ITA VETUNI) či národních agentur (NAZV). 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 (max. 5 řádků):

Cílem projektu bylo posouzení vybraných parametrů bezpečnosti a kvality alternativ masa na bázi rostlinných bílkovin (PBMA) dostupných na trhu v České republice. Mikrobiologické analýzy byly zaměřeny na získání nových informací o úrovni mikrobiální kontaminace PBMA vybranými skupinami mikroorganismů a současně posouzení jejich potenciálního vlivu na údržnost a bezpečnost těchto produktů. Sledované fyzikálně-chemické parametry byly posuzovány s ohledem na výsledky odpovídajících výrobků ze zpracovaného masa. Senzorické hodnocení PBMA, včetně instrumentálního měření textury a barvy, bylo provedeno s cílem porovnání těchto výrobků se zpracovaným masem a zahrnovalo také analýzu možných důvodů vedoucích spotřebitele k nákupu těchto výrobků a predikci trendu jejich spotřeby v budoucnosti.

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany):

V tržní síti bylo zakoupeno celkem 42 vzorků PBMA různého typu (např. burger, steak, nudličky, kuličky) určených buď k chladiřenskému, nebo mrazicímu skladování a k porovnání výsledků 9 vzorků odpovídajících výrobků z masa.

Aktivita 1: Hodnocení mikrobiologické kvality analogů masa na bázi rostlinných bílkovin

U vzorků byla provedena kvalitativní i kvantitativní mikrobiologická analýza. Sledovány byly následující ukazatele: celkový počet mikroorganismů, čeleď *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, kvasinky a plísně, bakterie mléčného kvašení (BMK), aerobní a anaerobní sporuláty, *Staphylococcus aureus* a *Helicobacter pylori*. Pro kvantitativní hodnocení bylo sterilně odebráno 25 g vzorku a homogenizováno s 225 ml sterilní pufrované peptonové vody (PPV). Následně byly připraveny ředící řady s výsevem na pevná kultivační média dle příslušných norem. Kvalitativní vyšetření bylo provedeno s 10 g vzorku s následnou homogenizací v 90 ml PPV, v případě BMK v 90 ml MRS bujonu. Druhová identifikace izolátů byla provedena metodou MALDI TOF-MS. Při stanovení výskytu bakterie *H. pylori* byla ze vzorků vyextrahována bakteriální DNA pomocí kitu NucleoSpin Microbial DNA (Macherey-Nagel). Přítomnost *H. pylori* ve vzorku byla potvrzena detekcí genu *glmM* pomocí Nested polymerázové řetězové reakce (PCR).

Aktivita 2: Chemické složení rostlinných analogů masa

Byly stanoveny následující chemické ukazatele: podíl vlhkosti/sušiny pomocí metody ČSN 57 6021 Stanovení obsahu vody (Referenční metoda), obsah tuku pomocí metody ČSN ISO 1443 Stanovení celkového obsahu tuku, obsah celkových bílkovin s využitím metody ČSN 57 0153 Stanovení obsahu bílkovin podle Kjeldahla, zastoupení aminokyselin po kyselé hydrolyze vzorku pomocí automatického analyzátoru aminokyselin, spektrum mastných kyselin po methylesterifikaci vzorku s využitím plynové chromatografie s plamenově-ionizační detekcí, určení koncentrace sodíku a dalších prvků metodou plamenové atomové absorpční spektrometrie.

Aktivita 3: Senzorické hodnocení vybraných analogů masa na bázi rostlinných bílkovin

Pro senzorické hodnocení analogů masa byly navrženy hodnotitelské protokoly obsahující hedonické a intenzitní stupnice. Zvolen byl typ grafické nestrukturované stupnice s popisem krajních bodů a délkou 100 mm odpovídající rozsahu 0 až 100 bodů. Pomocí těchto stupnic byly hodnoceny charakteristiky: celkový vzhled, tuhost, pružnost/elasticita, barva na řezu, vůně, šťavnatost, vláknitost, soudržnost, masová chuť, sójová chuť, olejová příchut' a celkový dojem, a takto byl získán senzorický

profil pro každý vzorek. Hodnocení se účastnilo celkem 17 proškolených hodnotitelů, z nichž někteří absolvovali základní senzorkou zkoušku u Státní zemědělské a potravinářské inspekce. Jako degustační sousto bylo použito bílé pečivo a voda. Součástí hodnocení bylo také instrumentální hodnocení barvy v systému CIELab na přístroji Konica Minolta CM-5. Hodnocenými parametry byly L*-světlost, a*-červená a b*- žlutá. Měření probíhalo před tepelnou úpravou a výsledek byl získán z deseti dílčích měření pro každý vzorek. Instrumentální měření textury probíhalo po tepelné úpravě na přístroji Instron 5544 dle Warner-Bratzlera. Měřena byla velikost sřížní síly (N) potřebná k přestřížení vzorku o velikosti 10 x 10 x 20 mm. Výsledná hodnota pro každý vzorek byla získána z pěti dílčích měření.

Dosažené výsledky projektu (max. 1/2 strany):

Aktivita 1: Hodnocení mikrobiologické kvality analogů masa na bázi rostlinných bílkovin

Průměrný CPM činil 5,62 log KTJ/g. Vzorky vykázaly velkou variabilitu od 1,0 po 7,23 log KTJ/g, medián byl oproti průměru výrazně nižší (3,08 log KTJ/g). Vzorky mletých mas/masných polotovarů vykázaly vyšší mikrobiální kontaminaci, průměrný CPM dosáhl 7,66 log KTJ/g (min. 3,58; max. 8,45), i v této skupině byl medián výrazně pod průměrem (4,81 log KTJ/g).

BMK byly nalezeny jen ve 20 vzorcích PBMA z 43 (46,5 %), ve vzorcích mletého masa/masných polotovarů se vyskytovaly 100%. Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* byly zjištěny jen v 6 vzorcích PBMA (14,0 %), ale v 8 vzorcích z masa (88,9 %). U PBMA to byly identifikovány druhy *Cronobacter sakazakii*, *Hafnia alvei*, *Kluyvera cryocrescens*, ve vzorcích z masa byly zjištěny druhy *E. coli*, *Serratia liquefaciens*, *Buttiauxella gaviniae*, *Citrobacter gillenii*. Průměrný počet *Enterobacteriaceae* ve vzorcích z masa činil 3,4 KTJ/g. *E. coli* byla zjištěna v 1 vzorku PBMA (2,3 %), ale ve 100 % vzorků z masa. Žádný z izolátů nepatří do patotypu STEC. *S. aureus* byl prokázán ve 4 vzorcích PBMA (9,3 %), ale v 7 vzorcích z masa (77,7 %) v průměrném počtu 1,4 log KTJ/g. PBMA byly však významným zdrojem bakterií rodu *Bacillus*. Zatímco ve vzorcích masa byl *Bacillus* spp. zjištěn jen v 1 vzorku (11,1 %; <1,7 log KTJ/g), ve vzorcích PBMA to bylo v 86 % vzorků s průměrným počtem 2,6 log KTJ/g. V 36 vzorcích byl potvrzen výskyt druhu *B. cereus*.

H. pylori byl celkem stanoven v 6 vzorcích (12,0 %). Pozitivní vzorky byly baleny v ochranné atmosféře – MAP (3 vzorky) nebo vakuově (1). Dva pozitivní vzorky byly pouze zamražené. U jednoho výrobku (Garden Gourmet vegetarian grilled filets; baleno v MAP) byl záchyt *H. pylori* stanoven opakovaně, a to v červnu a listopadu roku 2022, což by mohlo ukazovat na zhoršenou úroveň hygieny výroby. Nález pozitivních vzorků chlazených a mražených výrobků tak vyvrací dříve často uváděný názor, který předpokládá rychlé odumírání této bakterie při chladírenských a mrazírenských teplotách, a naopak podporuje teorii založenou na schopnosti přeměny spirální formy *H. pylori* v odolné nekultivatelné, tzv. VNC formy, jež jsou ale stále schopny vyvolat alimentární onemocnění.

Aktivita 2: Chemické složení rostlinných analogů masa

V rámci aktivity týkající se chemického složení produktů bylo zjištěno, že obsah bílkovin se pohyboval u rostlinných analogů ve výrazně širším rozmezí (5,4-27,1 g/100g) než u výrobků z masa (16,1-18,6 g/100g), což může být dáno použitím různých bílkovinných zdrojů při výrobě analogů (dle údajů na obalech bílkovina sójová, hrachová nebo kombinace sójové a pšeničné). Z hlediska zastoupení aminokyselin bylo zjištěno, že všechny rostlinné analogy obsahují statisticky významně nižší ($p < 0,05$) obsah esenciální aminokyseliny methioninu (0,00-1,80 g/kg) na rozdíl od výrobků z masa (1,25-4,33 g/kg). Obsah tuku byl podobně jako obsah bílkovin u rostlinných analogů poměrně variabilní, na trhu jsou výrobky s minimálním obsahem tuku (0,003-0,093 g/100g), a také s různě vysokým obsahem tuku (1,44-16,43 g/100g), což koresponduje s obsahem tuku u výrobků z masa (4,33-17,85 g/100g). Z hlediska mastných kyselin byl největší (statisticky vysoce významný $p < 0,01$) rozdíl zjištěn v obsahu nasycených mastných kyselin, přičemž rostlinné alternativy obsahovaly statisticky vysoce významně méně ($p < 0,01$) nasycených mastných kyselin (0,20-1,38 g/100g) než výrobky z masa (4,55-7,42 g/100g). Zajímavý je také rozdíl v obsahu nutričně významných omega-3

nenasycených mastných kyselin (omega-3 PUFA), kde rostlinné analogy, které ve složení obsahovaly pouze řepkový olej, vykazovaly obsah v rozmezí 0,245-0,718 g/100g omega-3 PUFA, zatímco výrobky z masa pouze 0,026-0,094 g/100g a rostlinné analogy obsahující pouze slunečnicový olej 0,023-0,404 g/100g omega-3 PUFA. Obsah soli byl v podobném rozmezí u rostlinných výrobků (0,76-2,44 g/100g) i výrobků z masa (0,156-2,17 g/100g), což bylo zřejmě dáno použitou recepturou.

Aktivita 3: Senzorické hodnocení vybraných analogů masa na bázi rostlinných bílkovin

Z dosažených výsledků jak klasického sensorického, tak instrumentálního hodnocení, jsou patrné velké rozdíly mezi analogy masa. Při porovnání sensorických profilů těchto vzorků je patrné, že každý vzorek má poněkud odlišné vlastnosti. Liší se však také hodnocení jednotlivých hodnotitelů. Nicméně při porovnání sensorických vlastností analogů masa a výrobků z masa nelze jednoznačně říci, že jedna skupina je horší nebo lepší než druhá. Avšak zatímco mezi sensorickými profily analogů masa jsou patrné velké rozdíly, masné produkty mají sensorické profily velice podobné. Barva PBMA je ovlivněna obsahem použitých složek, popř. barviv. Texturu ovlivňuje rovněž typ výrobku, zda se jedná např. o burger nebo o mleté maso, které bylo ručně tvarováno.

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Byly získány informace o mikrobiologickém profilu a chemickém složení rostlinných analogů masných výrobků, jejichž spektrum a množství na trhu se neustále rozšiřuje, přičemž v literatuře je těchto informací prozatím velmi málo. Současně byly získány nové informace o sensorickém hodnocení a instrumentálních vlastnostech PBMA výrobků. O přínosu projektu svědčí zájem pracovníků SZPI o seminář, na kterém byly výsledky řešení projektu prezentovány odborné veřejnosti. Dosažené výsledky rozšíří informovanost vědecké veřejnosti v této velmi aktuální oblasti.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Získané výsledky byly prezentovány na semináři pořádaném formou Vzdělávacího projektu SZPI s názvem *Alternativní výrobky "z masa" (rostlinného původu) a princip jejich výroby*, díky kterému byly prohloubeny znalosti pracovníků SZPI v oblasti alternativních potravin. Seminář se konal 20. 12. 2022, zúčastnilo se 25 pracovníků SZPI. Pro velký zájem a velmi kladnou odezvu s náplní semináře ze strany SZPI je plánováno opakování semináře na únor 2023. Program semináře je přiložen formou přílohy. Současně se předpokládá prezentace výsledků ve vědeckých časopisech s IF, případně i odborných časopisech.

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

Aktivita 1:

Microbiological quality of plant-based meat analogues from retail (*Food Microbiology*; Q1)

Occurrence of *Bacillus cereus* in plant-based meat analogues (*Food Control*; Q1)

Aktivita 2:

Nutritional composition of plant-based meat analogues: spectrum of fatty acids and amino acids and salt content (*Foods*; Q2)

Aktivita 3:

Analysis of the reasons for the growing popularity of vegan analogues of meat preparations in the Czech Republic (*Foods*; Q2)

Dílní výsledky projektu již byly prezentovány formou 3 přednášek v rámci semináře *Alternativní výrobky "z masa" (rostlinného původu) a princip jejich výroby* (viz příloha závěrečné zprávy).

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

| Položka | Finanční prostředky | |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------|
| | Přidělené (v Kč) | Čerpané (v Kč) |
| Osobní náklady celkem (včetně odvodů) | 688 648,00 | 688 638,00 |
| Služby | 132 000,00 | 132 000,01 |
| Cestovné | 0,00 | 0,00 |
| Další provozní náklady | 625 222,00 | 625 231,99 |
| Doplňkové náklady | 216 880,00 | 216 880,00 |
| Celkem | 1 662 750,00 | 1 662 750,00 |

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

(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)

Přidělené finanční prostředky byly čerpány v plné výši, tj. **1 662 750,00 Kč**. V rámci jednotlivých položek došlo k přesunu finančních prostředků v částce 10,00 Kč z položky *Osobní náklady* do položky *Další provozní náklady* (9,99 Kč) a *Služby* (0,01 Kč).

Osobní náklady:

Celkové čerpání položky činilo **688 638,00 Kč**. Osobní náklady byly čerpány jednak v rámci odměn pro zapojené akademické pracovníky (detailní popis míry zapojení je uveden v části 4 Řešitelský kolektiv), a to ve výši **663 638,00 Kč** (odměny – 496 000,00 Kč; zdravotní pojištění 44 630, 00 Kč; sociální pojištění 123 008,00 Kč). Nevyčerpaná částka 10,00 Kč byla převedena do položky *Další provozní náklady* (9,99 Kč) a *Služby* (0,01 Kč). Stipendium pro studentku DSP bylo čerpáno v plánované výši **25 000,00 Kč**.

Služby:

Finanční prostředky z položky *Služby* byly využity na nutný servis chromatografu, k financování stanovení zastoupení aminokyselin (provedeno laboratorní Ústavu chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie formou interní zakázky) a na jazykovou korekturu textu článku v anglickém jazyce. Celkem bylo v rámci položky *Služby* vyčerpano **132 000,01 Kč**.

Cestovné:

Finanční prostředky v rámci položky *Cestovné* nebyly plánovány.

Další provozní náklady:

V položce *Další provozní náklady* byly čerpány finanční prostředky v celkové výši **625 231,99 Kč**. Tato položka byla oproti návrhu projektu navýšena o prostředky z položky *Osobní náklady* (9,99 Kč).

Finanční prostředky byly využity na nákup vzorků analogů masa a výrobků z masa. Rovněž bylo nakoupeno bílé pečivo jako degustační sousto (nutné k realizaci senzoričného hodnocení). Další náklady byly spojené s pořízením kuchyňského vybavení pro přípravu, tepelnou úpravu a následné předkládání vzorků hodnotitelům. Jednalo se především o prkénka, vidličky, nože, lžice, pánvičky a sklenice na vodu.

Pořízen byl dále materiál nezbytný pro mikrobiologickou analýzu vzorků – kultivační média, suplementy, vyvíječe pro mikroaerofilní a anaerobní kultivaci, homogenizační sáčky s filtrem, konfirmační testovací soupravy, jednorázový plastový spotřební materiál (zejména Petriho misky, špičky k automatickým pipetám, mikrozkuřavky). Dále soupravy pro izolaci DNA, komponenty pro metodu PCR a další laboratorní pomůcky a ostatní spotřební materiál pro izolaci DNA a PCR. Také

byla pořízena bezpečnostní chladnička Liebherr LKexv 1800 (obsah 180 l, digitální ukazatel teploty, min. teplota +1 °C) s pořizovací cenou 38 354, 00 Kč včetně DPH.

V souvislosti s realizací chemických analýz byly pořízeny tlakové lahve s plyny pro stanovení pomocí GC a AAS, standardy mastných kyselin a další potřebné chemikálie (např. NaOH, petrolether, kyselina dusičná, peroxid vodíku, síran sodný, aceton), laboratorní sklo včetně vialek, spotřební materiál jako kolona pro GC, náplň do lapače vlhkosti z nosného plynu, kapilára pro mikrovlnné spalování vzorků, dále byrety, zkumavky, baňky, kádinky, pipety, násypky, špachtle, rukavice, extrakční patrony, stopky a nádoby na vzorky, fixy na sklo a drobné kancelářské potřeby. Rovněž byly pořízeny kuchyňské čisticí prostředky, rukavice, utěrky, houbičky, chňapky a mýdlo (nutné pro čištění použitého nádobí a laboratorních pomůcek).

Doplňkové náklady:

Doplňkové náklady byly čerpány ve výši **216 880,00 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)

9. 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 4) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu:

9. 1. 2023 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 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:**

9. 1. 2023 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

přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

9. 1. 2023 doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

Datum, jméno a podpis
správce rozpočtu:

9. 1. 2023 Ing. Šárka Kelnarová

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:

9. 1. 2023 doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

Razítko

Přílohy:

Příloha 1 – Výpis z IFIS

Příloha 2 – Program semináře *Alternativní výrobky "z masa" (rostlinného původu) a princip jejich výroby*

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2022
(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu:

FVHE/Pikula/ITA2022

2. Název projektu:

Zoologická medicína: zdravotní problematika zvěře, netopýrů, obojživelníků a ryb

3. 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

4. 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 a studenti DSP Ústavu ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel

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

| | |
|--|-----------------------------|
| Mgr. Vojtech Baláž, Ph.D. | FVHE, 2190, AP 1.0 |
| 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+0,1 NAZV |
| MVDr. Hana Minářová, Ph.D. | FVHE, 2190, AP 0.5+0,1 NAZV |
| Mgr. Monika Němcová | FVHE, 2190, AP 0.5 |
| 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 |
| RNDr. Ing. Veronika Seidlová (Kováčová), Ph.D. | FVHE, 2190, AP 0.5 |
| Ing. František Vitula, Ph.D. | FVHE, 2190, AP 1.0 |

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

| | |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| MVDr. Šimon Adam | DSP VETUNI, presenční forma, 2. roč. |
| MVDr. Vendula Kalocsányiová | DSP VETUNI, presenční forma, 2. roč. |
| Mgr. Lucie Veitová | DSP VETUNI, presenční forma, 2. roč. |
| Mgr. Ivona Toullová | DSP VETUNI, presenční forma, 1. roč. |

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

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

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

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Cílem projektu byl rozvoj zoologické medicíny se zaměřením na: 1) Mikrobiom trávicího aparátu jelenovitých s ohledem na sezónnost a patogenní agens, 2) Možnosti kryokonzervace spermií volně žijících kopytníků, 3) Hlodavci – sentinelová zvířata pro detekci přítomnosti zoonotických agens na vybrané lokalitě, 4) Netopýři jako pokladnice patogenních agens, 5) Buněčné kultury derivované z hmyzožravých netopýřů: model pro posouzení rizika antiparazitik, 6) Ekotoxicita léčiv ve vodním prostředí, 7) Patogen *Sphaerothecum destruens* asociovaný s invazní střevličkou východní: potenciální riziko pro původní kaprovité ryby ČR a 8) Riziko invazních organismů pro společenstva obojživelníků.

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany):

1) Mikrobiom trávicího aparátu jelenovitých s ohledem na sezónnost a patogenní agens

Byly odebrány vzorky z jednotlivých částí GIT od 12 daňků evropských, 10 srnců obecných a 8 jelenů sika. Vzorky byly odebírány z předžaludků, tenkého a tlustého střeva (obsah a sliznice v daném úseku GIT). Vzorky byly odebrány z čerstvě získaných vývrhů po odlovení každého jedince a byly bezprostředně po odběru zamrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. K izolaci DNA ze vzorků byl použit kolonkový kit. Pomocí PCR byl amplifikován celý gen pro 16S rRNA a sekvenace proběhla s využitím nanoporového sekvenátoru třetí generace MinION. Získaná data byla analyzována s využitím USEARCH a R.

2) Možnosti kryokonzervace spermií volně žijících kopytníků

V projektu byli využiti adultní samci tří druhů velké srstnaté zvěře, jelen lesní *Cervus elaphus* (n=3), daněk evropský *Dama dama* (n=8) a srnec obecný *Capreolus capreolus* (n=6). Vzorky spermií byly odebrány z tkáně varlat (*caput epididymidis*) ihned po legálním ulovení zvířete na ŠZP Nový Jičín (obora a volná honitba) v období vrcholu pohlavní aktivity a neprodleně po odběru byly podrobeny vyšetření pomocí systému CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) za použití modulu pro stanovení motility a koncentrace. U čerstvě odebraných spermií byly posuzované následovné parametry: koncentrace (CONC, $10^6/\text{ml}$), velikost hlavičky (HA, μm), průměrná rychlost a progresivita (VAP, %), frekvence pohybu (BCF, Hz), celková motilita (MO, %), progresivní motilita (PR, %), cirkulární pohyb (CT, %), průnik sliznicí (MP, %). Po odběru a vyšetření byly vzorky naředěny čtyřmi různými kryoprotektivními ředidly (Andromed, Triladyl, dimethylsulfoxid - DMSO a dimethylacetamid - DMA) a zamrazeny v tekutém dusíku. Vzorky byly skladovány jeden měsíc při $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, následně byly rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a podrobeny stejnému vyšetření jako čerstvé vzorky.

3) Hlodavci – sentinelová zvířata pro detekci přítomnosti zoonotických agens na vybrané lokalitě

V roce 2022 proběhly odchvy hlodavců na dlouhodobě monitorované lokalitě Salaš v pohoří Chříby. Hlodavci byli na základě schváleného projektu pokusu odchytáváni do sklapovacích pastiček a následně pitváni pro odběr vnitřních orgánů. Izolovaná DNA pak byla testována na přítomnost zoonotických bakteriálních patogenů. V letošním roce jsme začali také s testováním na *Francisella tularensis* a s odběry materiálu pro helmintologické vyšetření.

4) Netopýři jako pokladnice patogenních agens

V rámci projektu byly během odchytů v České republice a v Bulharsku odebrány vzorky krve od 92 netopýřů (viz Tabulka 1.). Jednotlivým zvířatům byla odebrána krev punkcí v. *saphaena*. Bezprostředně po odběru byla část krve použita ke zhotovení krevního nátěru a k analýze

hematologických a biochemických parametrů pomocí kartridže EC8+ v přístroji iSTAT (Abaxis, USA). Část odebraného vzorku krve (20 µl) byla použita na izolaci DNA pomocí kolonkového izolačního kitu. Vyizolovaná DNA byla následně použita jako templát pro nested PCR a produkty PCR byly následně naneseny na 1,5 % agarózový gel, pozitivní bendy byly vyříznuty, purifikovány a zaslány na sekvenaci.

| Druh netopýra | Počet jedinců celkem | Pohlaví (samci/samice) | Původ zvířat |
|----------------------------------|----------------------|------------------------|-----------------|
| <i>Nyctalus noctula</i> | 24 | 10/14 | Česká republika |
| <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> | 38 | 18/20 | Bulharsko |
| <i>Rhinolophus euryale</i> | 30 | 13/17 | Bulharsko |

5) Buněčné kultury derivované z hmyzožravých netopýrů: model pro posouzení rizika antiparazitik

Toxicita ivermektinu byla sledována na buněčných liniích získaných z netopýra rezavého (*Nyctalus noctula*) a netopýra velkého (*Myotis myotis*), konkrétně na hepatocytech a buňkách ledvin, které jsou hlavními místy detoxikačního metabolismu, a nervových buňkách, u kterých se předpokládá nejvyšší citlivost vůči ivermektinu. Cytotoxické účinky byly sledovány po 24-hodinové expozici ivermektinu v koncentracích 0,0005; 0,05; 5; 500 a 50 000 µg/l pomocí testů zaměřených na detekci apoptózy a nekrózy, síly metabolismu, fragmentace DNA a množství RNA kódující stresové proteiny.

6) Ekotoxicita léčiv ve vodním prostředí

Byla stanovena ekotoxicita fluorochinolonů (enrofloxacin a marbofloxacin) pro ryby na modelu *Danio rerio* podle standardních metodických postupů (OECD a ČSN EN ISO). Rybí embrya byla exponována účinku fluorochinolonů v pěti různých koncentracích (3, 6, 18, 36, 50, 100 mg/l). Nejprve byla s pomocí stereomikroskopu vybrána oplozená normálně se vyvíjející vajíčka ve stádiu blastuly (do 4 hodin po oplození). Pravidelně byla pak zaznamenávána mortalita a subletální efekty (deformity hlavy, páteře a ocasu, edém srdce a žlutkového váčku, ztráta pigmentace) a hodnoceno kulení plůdku. Po 96 hodinách od oplození jsme měřili srdeční frekvenci.

7) Patogen *Sphaerothecum destruens* asociovaný s invazní střevličkou východní: potenciální riziko pro původní kaprovité ryby ČR

Sphaerothecum destruens je intracelulární parazit ryb s potenciálem působit rozsáhlé úhyny v populaci hostitelů; zároveň napadá široké spektrum druhů ryb, a je proto hrozbou pro biologickou rozmanitost vodních ekosystémů. Jeho původ a rozšíření v Evropě nejsou doposud plně zdokumentovány. Cílem naší studie proto bylo otestovat sleziny a ledviny odebrané z celkem 106 jedinců střevličky východní (*Pseudorasbora parva*) ze tří přírodních lokalit ČR na přítomnost *Sphaerothecum destruens*. DNA izolovaná ze vzorků byla podrobena nested PCR za použití primerů k detekci genu ITS 1 a následné elektroforéze.

8) Riziko invazních organismů pro společenstva obojživelníků

Na základě online kampaně s cílem oslovit terénní pracovníky AOPK a veřejnost se zájmem o ochranu obojživelníků a plazů jsme zaznamenali několik případů podezřelých úhynů ropuch a skokanů. Z několika případů se povedlo získat vzorky tkání z uhynulých obojživelníků z Česka a Slovenska. Izolace DNA proběhla pomocí izolačního kitu NucleoSpin (Macherey-Nagel). Analyzovány byly pomocí real time PCR.

Dosažené výsledky projektu (max. 1/2 strany):

1) Mikrobiom trávicího aparátu jelenovitých s ohledem na sezónnost a patogenní agens

Byla provedena bioinformatická analýza osekvenovaných vzorků. Předběžné výsledky analýzy mikrobiomu střevního obsahu naznačují, že mezi mikrobiomem tlustého střeva u daňka a srnce není výraznější rozdíl, nicméně výraznější odlišnosti mezi námi sledovanými druhy jelenovitých očekáváme vzhledem k odlišnostem v přijímané potravě spíše u mikrobiomu bachoru.

2) Možnosti kryokonzervace spermií volně žijících kopytníků

Při porovnání hodnot koncentrace nebyly pozorovány žádné rozdíly mezi čerstvými vzorky a vzorky po rozmrazení, nebo mezi kryoprotektivními ředidly u žádného s druhů. Morfologický parametr

spermií velikost hlavičky (HA, μm) vykazoval statistický rozdíl u všech druhů a rovněž u všech použitých ředidel, ale nebyl ovlivněn zmražováním. Všechny parametry motility (MO, PR, VAP, BF a CT) byly ovlivněny kryokonzervací, ale mezi použitými kryoprotektivními ředidly se významně nelišily. U jelena lesního a srnce obecného byly konečné parametry progresivní motility v období po rozmrazení srovnatelné pro všechna použitá ředidla. Na rozdíl od toho u daňka evropského, se komerčně používaná ředidla (Andromed a Triladyl) ukázala jako vhodnější pro dlouhodobé skladování spermatu než alternativní ředidla (DMSO a DMA). Průnik sliznicí (MP, %) byl ovlivněn jak použitým ředidlem, tak samotným procesem kryokonzervace u srnce obecného a částečně i u daňka evropského. Volba ředidla tento parametr u jelena lesního neovlivňuje.

3) Hlodavci – sentinelová zvířata pro detekci přítomnosti zoonotických agens na vybrané lokalitě

Odchyceno a vyšetřeno bylo celkem 13 druhů drobných savců (hlodavci a hmyzožravci). Byla zaznamenána pozitivita na patogeny *Anaplasma*, *Rickettsia*, *Leptospira*, *Borrelia*, *Bartonella*, *Babesia* a *Francisella* s prevalencí v jednotkách procent.

4) Netopýři jako pokladnice patogenních agens

Aktuálně je kompletně vyšetřeno 73 vzorků. V rámci vyšetřených zvířat byly potvrzeny 3 vzorky pozitivní na babesie a to pouze u netopýřů rezavých (*Nyctalus noctula*), další druhy byly negativní. Z předběžných výsledků je patrné, že prevalence babesií je relativně nízká a na rozdíl od trypanosom je i na základě našich předchozích výsledků napříč různými druhy netopýřů patrná úzká vazba na konkrétní druhy netopýřů, konkrétně na netopýra rezavého (*Nyctalus noctula*).

5) Buněčné kultury derivované z hmyzožravých netopýřů: model pro posouzení rizika antiparazitik

Cytotoxické účinky ivermektinu se liší v závislosti na typu buněk a koncentraci ivermektinu. Nejvyšší testovaná koncentrace 50 000 $\mu\text{g/l}$, odpovídající LD50 u potkanů, způsobila destrukci až 38 a 44 % buněk ledvin a nervů již během prvních 12 hodin. Jaterní buňky podléhají nekróze v menší míře a nejvyšší hodnoty (42% cytotoxicita) dosahují až po 24 hodinách expozice ivermektinu. Nižší koncentrace ve srovnání s kontrolními neošetřenými buňkami nemají nekrotický účinek ale spíše apoptický, především u nervových buněk, kdy během prvních 2 hodin expozice dochází až k 3-násobnému nárůstu markerů apoptózy ve srovnání s neošetřenými kontrolními buňkami. Rychlost/síla metabolismu v porovnání s nešetřenými kontrolními buňkami klesá v rozsahu 5–20 %, vyjma kultury ledvin, u které došlo naopak k excitaci metabolismu působením ivermektinu. Zároveň u nejvyšší koncentrace dochází k silné nekróze, tedy i redukci metabolismu v důsledku sníženého počtu metabolicky aktivních buněk. Rozdílná odezva byla sledována rovněž při kometovém testu k detekci fragmentů DNA. Jaterní buňky nevykazovaly poškození DNA vlivem ivermektinu, rozsáhlé poškození bylo detekováno u buněk ledvin, u *nervu olfactoriu* se naopak zdá, že ivermektin dokáže zmírnit negativní vliv dimethyl sulfoxidu, který sloužil pro převedení ivermektinu do roztoku. Množství RNA kódující HSP70, HSP90AA a HSP90AB, proteiny produkované v rámci nespecifické reakce organismu vůči stresu, bylo navzdory očekávání až na výjimky redukováno v porovnání s neošetřenou kontrolou.

6) Ekotoxicita léčiv ve vodním prostředí

Akutní toxicita fluorochinolonů se u embryí *Danio rerio* projevovala koagulací žloutku, edémem srdce a deformacemi páteře. Pokud jde o rostoucí koncentraci fluorochinolonů, pozorovat bylo možné stimulaci srdeční frekvence, zkrácení délky těla a opožděné kulení.

7) Patogen *Sphaerothecum destruens* asociovaný s invazní střevličkou východní: potenciální riziko pro původní kaprovité ryby ČR

Elektorforéza ukázala, že došlo nespécifickému nasedání primerů a amplifikaci necílových úseků. Následná sekvenace vybraných PCR produktů potvrdila, že nespécificky tvořený produkt odpovídá úsekům genetické informace hostitelského druhu, tedy střevlice východní. Je proto nutné pokračovat v analýzách, upravit metodický postup a použít modifikované primery, případně jiné primery amplifikující odlišný úsek DNA charakteristický pro *Sphaerothecum destruens*.

8) Riziko invazních organismů pro společenstva obojživelníků

Předběžné analýzy potvrdily přítomnost herpesvirů, pravděpodobně dvou různých linií – Ranaherpesvirus a Bufoherpesvirus. Momentálně probíhá zpracování pro sekvenční potvrzení výsledků a identity herpesvirů. Ve výzkumu *B. dendrobatidis* (Bd) se v rámci spolupráce se zahraničím povedlo potvrdit výskyt u nepůvodních skokanů *Pelophylax perezi* a rovnou i získat živé

kultury Bd z Kanárských ostrovů. K detekci Bd byla použita rychlá diagnostika pomocí specifické LAMP v terénu a následně byl odebrán materiál pro kultivaci pouze z infikovaných zvířat. Na našem ústavu byly kultury Bd katalogizovány a zmrazeny při -70 °C pro další využití.

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Účast na řešení projektu byla pro tým Ústavu ekologie a chorob zoonozivních zvířat, zvěře, ryb a včel motivací k intenzivnímu výzkumu, jež se uplatní v časopisech Q1 a Q2 kategorie, bude mít značný mezinárodní přesah a přispěje k osobnímu růstu zapojených pracovníků. Řešení projektu přispěje k rozvoji zoologické medicíny se zaměřením na zdravotní problematiku volně žijících zvířat, zvěře a ryb a k ochraně životního prostředí a ohrožených obratlovců a veřejného zdraví. Nové medicínské a ekologické poznatky budou také bezprostředně využívány při výuce studentů VETUNI.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

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) Microbiome of the digestive tract of cervids: effects of seasonality and presence of pathogenic agents. *Journal of Wildlife Diseases*, IF 1,535, Q2; **zpracovávání dat + rukopis v přípravě**
- 2) Cryoconservation of sperm cells of cervids. *Animal Reproduction*, IF 1,807, Q2; **rukopis připraven k odeslání do časopisu**
- 3) Wild rodents: sentinel animals for the detection of environmental pathogen circulation. *Zoonoses and Public Health*, IF 2,702, Q1; **zpracovávání dat + rukopis v přípravě**
- 4) Babesiosis-induced acid base imbalance in hibernating bats. *Parasites & Vectors*, IF 3,876, Q1
- 5) a. Toxicity of ivermectin to bat-derived cells under conditions simulating euthermia and hibernation. *Toxins*, IF 4,546, Q1; **zpracovávání dat + rukopis v přípravě**
b. Bat-derived cells survive freezing at -20 °C in cryoprotectant-free media. *Journal of Thermal Biology*, IF 3,189, Q1; **odesláno do redakce**
- 6) Ecotoxicity of fluoroquinolones in aquatic environment organisms. *PLoS One*, IF 3,24, Q2; **zpracovávání dat + rukopis v přípravě**
- 7) *Sphaerothecum destruens*: an emerging pathogen in Central European cyprinid fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, IF 2,767, Q1; **zpracovávání dat + rukopis v přípravě**
- 8) Emerging pathogens in Central European amphibians. *Biological Conservation*, IF 5,991, Q1; **rukopis v přípravě**

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

| Položka | Finanční prostředky | |
|---------------------------------------|---------------------|------------------|
| | Přidělené (v Kč) | Čerpané (v Kč) |
| Osobní náklady celkem (včetně odvodů) | 668 790 | 668 790 |
| Služby | 60 000 | 60 000 |
| Cestovné | 89 000 | 89 000 |
| Další provozní náklady | 541 515 | 541 515 |
| Doplňkové náklady | 203 895 | 203 895 |
| Celkem | 1 563 200 | 1 563 200 |

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

(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: | čerpáno 668 790 Kč |
|--|---------------------------|
| Mgr. Vojtech Baláž, Ph.D. | odměna 30 000 Kč |
| doc. MVDr. Hana Bandouchová, Ph.D., dipl. ECZM | odměna 30 000 Kč |
| prof. RNDr. Miroslava Beklová, CSc. | odměna 35 000 Kč |
| Mgr. Barbora Havelková, Ph.D. | odměna 35 000 Kč |
| MVDr. Ivana Mikulíková, Ph.D. | odměna 28 000 Kč |
| MVDr. Hana Minářová, Ph.D. | odměna 28 000 Kč |
| Mgr. Monika Němcová | odměna 28 000 Kč |
| doc. MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D. | odměna 45 000 Kč |
| MVDr. Ivana Papežíková, Ph.D. | odměna 30 000 Kč |
| MVDr. Vladimír Piaček, Ph.D. | odměna 30 000 Kč |
| prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D., dipl. ECZM | odměna 45 000 Kč |
| Ing. Jana Sedláčková, Ph.D. | odměna 30 000 Kč |
| RNDr. Ing. Veronika Seidlová, Ph.D. | odměna 30 000 Kč |
| Ing. František Vítula, Ph.D. | odměna 31 000 Kč |
| MVDr. Šimon Adam | stipendium 15 000 Kč |
| MVDr. Vendula Kalocsányiová | stipendium 15 000 Kč |
| Mgr. Lucie Veitová | stipendium 15 000 Kč |
| Mgr. Ivona Toullová | stipendium 15 000 Kč |

Poznámka: odměny jsou uvedeny bez odvodů a vyjadřují podíl jednotlivých pracovníků na řešení projektu, čerpáno bylo v souladu s původními požadavky.

Služby:

čerpáno 60 000 Kč

Celkové náklady na služby (60 tis. Kč) byly využity na uhrazení publikačních nákladů v časopisech Open Access, jazykový proofreading a sekvenování PCR produktů.

Cestovné:

čerpáno 89 000 Kč

Cestovné (89 tis. Kč) bylo použito k zajištění terénního sběru vzorků na lokalitách v ČR a Bulharsku a nákladů souvisejících s aktivní účastí na konferenci v USA (NASBR v Austinu, Texas).

Další provozní náklady:

čerpáno 541 515 Kč

Další provozní náklady (541 515 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 izolace DNA (skalpely, 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 (stripy, *B. dendrobatidis* a *B. salamandrivorans* LAMP mastermixy, špičky). Dále šlo o náklady spojené s chovy a kultivací testovacích organismů a s nákupy čistých chemikálií, materiálu pro přípravu živných roztoků, standardů (fluorochinolony) 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.

Doplňkové náklady:

čerpáno 203 895 Kč

Odvedeny doplňkové 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)

9. 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 2021 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:

28.12.2022 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 2021 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:** 28.12.2022 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

přednosta ústavu:

28.12.2022 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:

doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2022
(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu: FVHE/Dobšíková/ITA2022 (TA222061)

2. Název projektu: Výživa potravinových zvířat jako nezbytný předpoklad zajištění jejich dobrého zdravotního stavu a kvality finální živočišné potraviny

3. Řešitel projektu:

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

Fakulta/celoškolské pracoviště: FVHE

E-mail: dobsikovar@vfu.cz

Telefon: 541 562 784

4. 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, AP, úvazek 1,0; hlavní řešitel – vedení projektu a koordinace činností řešitelského kolektivu, koordinace dílčích úkolů a částí projektu, stanovení hematologických ukazatelů kuřat, zajištění mikrobiologických a imunologických analýz vzorků, analýza výsledků, statistické zpracování a vyhodnocení dat, příprava publikačních výstupů, zpracování zprávy a prezentace k dílčímu projektu, sepsání závěrečné zprávy a příprava prezentace k obhajobě projektu

prof. Ing. David Zapletal, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, AP, úvazek 1,0; spoluřešitel – koordinace dílčích úkolů, vypracování metodiky a management pokusu s kuřaty, sestavení pokusných diet, zjišťování výkrmnosti, disekce porážených kuřat, zajištění morfometrických ukazatelů stěny střeva, analýza výsledků, statistické zpracování a vyhodnocení dat, příprava publikačních výstupů

MVDr. Vlastimil Šimek, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, AP, úvazek 1,0; spoluřešitel – dohled nad realizací výkrmového pokusu, zjišťování hmotnosti kuřat a spotřeby krmiv, hematologické vyšetření, odběr biologických vzorků a stanovení hmotností vybraných orgánů, disekce porážených kuřat, analýza výsledků, statistické zpracování a vyhodnocení dat, příprava publikačních výstupů

Mgr. Petra Jakešová, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, AP, úvazek 1,0; spoluřešitel – zjišťování výkrmnosti a jatečné hodnoty kuřat, odběr a příprava vzorků k analýzám, odběr vzorků masa, vyšetření trusu, analýza výsledků, statistické zpracování a vyhodnocení dat, příprava publikačních výstupů. *Mgr. Jakešová od července 2022 ukončila pracovní poměr a následně byly do projektu začleněny noví dva akademičtí pracovníci, MVDr. Lenka Rozsypalová a Ing. Martina Kostůková, Ph.D.*

MVDr. Lenka Rozsypalová – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, AP, úvazek 1,0; spoluřešitel – odběr a příprava vzorků k analýzám, odběr vzorků masa, statistické zpracování a vyhodnocení dat, příprava publikačních výstupů

Ing. Martina Kostůková, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, AP, úvazek 1,0; spoluřešitel – odběr a příprava vzorků k analýzám, odběr vzorků masa, statistické zpracování a vyhodnocení dat, příprava publikačních výstupů

MVDr. et MVDr. Viola Zentrichová – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, AP, úvazek 1,0; spoluřešitel – odběr biologických vzorků kuřat, stanovení vybraných ukazatelů krve, rešeršní činnost k problematice, analýza výsledků, statistické zpracování dat, příprava publikačních výstupů

prof. Ing. Eva Straková, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, AP, úvazek 1,0; spoluřešitel – koordinace projektových aktivit dílčího projektu, metodické zpracování a vedení projektu, vyhodnocení analytické činnosti, tvorba databází výsledků, statistické zpracování výsledků, publikační činnost, zpracování dílčí zprávy a prezentace k dílčímu projektu

Ing. Lucie Všetická, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, AP, úvazek 1,0, od 2.2 r. 2022 úvazek 0,5; spoluřešitel – sumarizace výsledků pro statistickou analýzu, práce s literárními databázemi, rešeršní činnost k řešené problematice, publikační činnost

Mgr. Ing. Ludmila Křížová, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, AP, úvazek 1,0; spoluřešitel – koordinace projektových aktivit dílčího projektu, příprava metodik, statistické vyhodnocení výsledků, publikace výsledků, zpracování zprávy a prezentace k dílčímu projektu

doc. MVDr. Alena Pechová, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, AP, úvazek 1,0; spoluřešitel – odběry bachorové tekutiny, provádění *in vitro* experimentů, interpretace výsledků a jejich publikace

MVDr. Jana Tšponová, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, AP, úvazek 1,0; spoluřešitel – provádění *in vitro* experimentů, tvorba databází výsledků, jejich vyhodnocování a publikace

Mgr. Kateřina Sedláková, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, AP, úvazek 1,0; spoluřešitel – provádění *in vitro* experimentů, tvorba databází výsledků, jejich vyhodnocování a publikace

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

-

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Zaměření projektu „Výživa potravinových zvířat jako nezbytný předpoklad zajištění jejich dobrého zdravotního stavu a kvality finální živočišné potraviny“ je plně v souladu s vědeckými a výzkumnými aktivitami vytýčenými v rámci Institucionálního výzkumu na VETUNI, a to konkrétně s problematikou ochrany zvířat, welfare a etologie včetně působení stresorů a toxinů na zvířata, resp. je v souladu s výzkumným zaměřením Sekce chovu a ochrany zvířat a veřejného veterinárního lékařství a Ústavu chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, který se mimo jiné zabývá vyhodnocením vlivu dietárních faktorů, včetně biologicky aktivních látek a antinutričních látek, na zdravotní stav, parametry vnitřního prostředí, užitkovost zvířat a kvalitu a zdravotní nezávadnost jejich produkce.

Při hodnocení welfare zvířat je pozornost věnována nejen životním podmínkám a prostředí zvířat, ale zejména je posuzována kvalita krmiva, která výrazně ovlivňuje zdraví a pohodu zvířat, rozhoduje o zdravotním stavu zvířete, resp. o celkové prosperitě chovu. U hospodářských (resp. potravinových) zvířat existuje spojitost mezi odpovídajícími životními podmínkami a zdravím zvířat, přičemž dobrý zdravotní stav hospodářských zvířat ovlivňuje finální kvalitu a bezpečnost potravin živočišného původu.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Cílem projektu TA222061 bylo vyhodnotit vliv suplementace standardního komerčního krmiva o vybraná aditiva na zdravotní stav, parametry vnitřního prostředí a kvalitu finálního živočišného produktu kura domácího, resp. posoudit vliv současného působení vybraných isoflavonů a minoritních mykotoxinů na parametry bachorového prostředí a využitelnost krmiva u skotu.

Cílem dílčího projektu 1 bylo vyhodnocení vlivu dietárního začlenění pelyňku pravého na fyziologii, morfologii stěny tenkého střeva, mikrobiologický profil GIT, imunologii a zdraví a užitkovost rychle rostoucích brojlerových kuřat a dále na jejich jatečnou hodnotu a kvalitu masa.

Cílem dílčího projektu 2 bylo posouzení vlivu vybraných druhů rostlinných olejů přidaných do krmných směsí pro brojlerová kuřata na zastoupení dieteticky významných mastných kyselin ve svalovině brojlerových kuřat.

Cílem dílčího projektu 3 bylo vyhodnocení vlivu současného výskytu vybraných isoflavonů a minoritních mykotoxinů v krmných dávkách dojníc na parametry bachorového prostředí a na stravitelnost neutrálně detergentní vlákniny (NDF), sušiny a organické hmoty směsné krmné dávky s využitím *in vitro* metod.

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany):

Dílčí projekt 1 směřoval k vyhodnocení specifických účinků dietárně předkládaného pelyňku pravého (*Artemisia absinthium*) na fyziologické funkce, morfologii stěny tenkého střeva, mikrobiologický profil GIT, imunologii a zdraví, výkrmnost, jatečnou hodnotu a kvalitu masa vykrmovaných rychle rostoucích brojlerových kuřat. Pro pokus jsou využiti kohoutci brojlerových kuřat ROSS 308 (n = 208), u kterých je uplatněn 3fázový systém výživy (BR 1, BR 2, BR 3). Celkem jsou v pokusu použity 4 typově odlišné diety: pozitivní kontrola (obsahující běžné antikokcidikum), negativní kontrola (bez antikokcidika), 3 % a 6 % začlenění pelyňku v dietě. V průběhu pokusu jsou realizována 4 opakování v rámci každé hodnocené diety. Pokus probíhá do 42 dnů věku brojlerů, všechna kuřata jsou ustájena ve shodných podmínkách prostředí, jež respektují doporučení dle technologického návodu pro danou hybridní kombinaci. V pravidelných týdenních intervalech je prováděno vážení kuřat a zjišťování spotřeby krmiv. Ve 21. a 42. dnu věku je proveden odběr vzorků krve a krevní plazmy. Ve 21. dnu věku je u náhodně vybraných kuřat provedeno usmrcení (8 kohoutků/skupina) s následným zjištěním hmotnosti sleziny, thymu a burzy Fabrici a odběr vzorků tráveniny z céka a obsahu volete pro determinaci mikrobiologického profilu těchto částí GIT. Výše uvedené ukazatele jsou vyhodnoceny rovněž na konci pokusu, tj. ve 42. den věku brojlerů. Ve stejném věku je u náhodně vybraných kuřat proveden odběr částí tenkého střeva pro determinaci délky a šířky klků a hloubky krypt střevní sliznice. Při ukončení pokusu, tj. 42. den věku, je u náhodně vybraných kuřat (16 kohoutů/krmná skupina) provedeno jejich porážení a disekce těla s cílem determinace složení JOT a výtěžností významných částí JOT s odběrem vzorků prsní a stehenní svaloviny ke stanovení vybraných kvalitativních ukazatelů masa a vyhodnocení fyzikálních, chemických a senzorických parametrů svaloviny. Ve vzorcích trusu kuřat je provedeno parazitologické vyšetření výskytu oocyst kokciidií. Zjištěná data jsou statisticky zpracována a vyhodnocena.

Dílčí projekt 2 očekával změnu v koncentracích mastných kyselin ve svalovině brojlerových kuřat dle různých zdrojů dietárního oleje (sójový, řepkový, slunečnicový) v krmných směsích brojlerových kuřat. Do pokusného sledování byli zařazeni jednodenní kohoutci, masné hybridní kombinace brojlerových kuřat ROSS 308, kteří byli náhodně rozděleni do tří skupin po 15 kusech při respektování technologického postupu výkrmu dle doporučení dodavatele brojlerových kuřat při ustájení na hluboké podestýlce. Výsledky živé hmotnosti, konverze krmné směsi a úhyn byly vyjádřeny k 1., 10., 25. a 42. dnu věku. Během výkrmu byly zkrmovány kompletní krmné směsi BR 1

(1. - 10. den), BR 2 (11. - 25. den) a BR 3 (26. - 42. den), předkládané *ad libitum* prostřednictvím tubusových samokrmítek, voda byla sledovanými jedinci přijímána *ad libitně* z kloboukových napáječek. Krmná směs BR1 byla připravena na bázi sójového oleje a byla shodná pro všechny 3 skupiny. Krmné směsi BR 2 a BR 3 obsahovaly přídavek rostlinných olejů, a to sójového (SO), řepkového (RO) a slunečnicového (SLO). Byla posouzena koncentrace mastných kyselin v rostlinných olejích a v kompletních krmných směsích a po ukončení pokusného sledování v prsní a stehenní svalovině brojlerů. Z každé experimentální skupiny bylo u 10 vzorků prsní a stehenní svaloviny vyhodnoceno zastoupení mastných kyselin jak individuálně, tak i sumárně jako nasycené mastné kyseliny a polynenasycené mastné kyseliny MUFA a PUFA (n-3 a n-6). Získané údaje byly zpracovány a vyhodnoceny matematicko-statistickými metodami programem Unistat for Excel, verze 5.6.

Dílčí projekt 3 vycházel z hypotézy, že současné působení isoflavonů a minoritních mykotoxinů enniatinu B a beauvericinu díky svým antibakteriálním účinkům negativně ovlivní průběh fermentačního procesu během inkubace *in vitro* a tím i stravitelnost NDF, sušiny a organické hmoty. Byly provedeny tři experimenty, jejichž cílem bylo stanovit vliv současného působení isoflavonů daidzeinu a genisteinu a minoritního mykotoxinu enniatinu B (Exp. 1), výše uvedených isoflavonů a beauvericinu (Exp. 2) a výše uvedených isoflavonů, enniatinu B a beauvericinu (Exp. 3) na stravitelnost sušiny, NDF a organické hmoty směsné krmné dávky a na parametry bachorového prostředí s využitím *in vitro* metod. Jako zdroj isoflavonů byly použity standardy daidzeinu a genisteinu v poměru 1:1,3 v množství odpovídajícím příjmu sójových isoflavonů u dojnic, tj. 10 g/d. Jako zdroj minoritních mykotoxinů byly použity standardy enniatinu B a beauvericinu v množství odpovídajícím dvojnásobku akutní expozice stanovené dle EFSA (2014). Experimenty *in vitro* vycházely z modifikované metody Tilley a Terry (1963), jako zdroj bachorové tekutiny byly použity dojnice ze ŠZP Nové Dvory a testované vzorky krmiv použité do inkubací byly stejné, jako krmná dávka těchto dojnic. Inkubace byly prováděny ve skleněných tubách opatřených Bunsenovým uzávěrem. Vzorky směsné krmné dávky v množství 0,5 g/tuba byly inkubovány v pufrované bachorové tekutině (ředěná 1:4 roztokem umělých slin) po dobu 48 hod při teplotě 39 °C. Každá kombinace faktorů byla provedena v 8 opakováních. Jako kritérium odezvy byly sledovány změny v pH, obsahu těkavých mastných kyselin, NH₃ a stravitelnosti NDF, sušiny a organické hmoty *in vitro*.

Dosažené výsledky projektu (max. 1/2 strany):

Výsledkem dílčího projektu 1 je objasnění souvislostí mezi dietárním začleněním pelyňku pravého a fyziologickými funkcemi, histomorfologií tenkého střeva, imunologií, mikrobiálním osazením GIT a zdravím vykrmovaných kuřat, včetně vlivu použité byliny na užitkové vlastnosti brojlerů a kvalitu kuřecí svaloviny. Očekávaným výsledkem je metabolická odezva ke zvoleným dietárním manipulacím u brojlerů, dále alterace mikrobiologického profilu GIT kuřat a vliv diety na některé kvalitativní ukazatele masa. Výsledky experimentální studie dílčího projektu 1 v současné době nejsou k dispozici. Jejich uplatnění se předpokládá ve veterinární, krmivářské a chovatelské sféře a u zpracovatelů masa, kdy mohou významně rozšířit dosavadní poznatky o účincích bylin na fyziologii, zdraví a kvalitu produkce kuřat.

V dílčím projektu 2 umožnily v KKS použité rostlinné oleje s odlišným zastoupením některých mastných kyselin (MK) pro kohoutky brojlerových kuřat sledovat vztahy mezi obsahem MK v experimentálních krmných směsích a jejich obsahem v prsní a stehenní svalovině. Použité rostlinné oleje se lišily zastoupením MK, především kys. olejovou, linolovou a α -linolenovou. V období předvýkrmu přijímali brojleři všech skupin stejnou krmnou směs se sójovým olejem, kde měly nejvyšší zastoupení kyselina linolová a olejová (45.77, resp. 19.65 g/100 g oleje). V období výkrmu

(BR2) a dokrmu (BR3) byla u skupiny SO (sójový olej) nejvíce zastoupena kyselina linolová (47.80 a 46.82 g/100 g oleje) a olejová (20.62 a 23.96 g/100 g oleje). Ve stejných fázích výkrmu bylo u skupiny RO (řepkový olej) nejvíce kyseliny olejové (45.34 a 39.90 g/100 g oleje) a nižší zastoupení měla kyselina linonová (26,67 a 32,85 g/100 g oleje). Skupina SLO (olej slunečnicový) měla nejvíce kyseliny linonové, a to 55.52 a 48.58 g/100 g oleje a kyseliny olejové 20.32 a 22.81 g/100 g oleje. Zkrmování uvedených experimentálních diet od 11. do 42. dne věku kuřat významně ovlivnilo zastoupení vybraných MK v tuku prsní a stehenní svaloviny. Výsledky doložily, že vhodné doplnění diety brojlerových kuřat rostlinnými oleji ovlivňuje zastoupení jednotlivých MK ve svalovině prsní a stehenní. Významný byl vliv vzájemného poměru kyseliny linolové a α -linolenové na koncentrace kyseliny arachidonové v prsní i stehenní svalovině, kde kyselina arachidonová vzniká z kyseliny linolové. Snížení podílu nasycených MK a zvýšení podílu PUFA n-3 je z hlediska zdravotní bezpečnosti produktu žádoucí a poměr n-3/n-6 by neměl přesáhnout hodnotu 1:5. Z hlediska lidské výživy je zúžený poměr dokladem vyšší dietetické hodnoty. Většina sledovaných MK, s výjimkou kyseliny stearové a arachidonové, vykazala vyšší zastoupení ve stehenní svalovině oproti svalovině prsní. Z hlediska dosažení optimálního poměru n-3:n-6 MK lze v návaznosti na produkci funkčních potravin doporučit používání zejména řepkového nebo sójového oleje v KKS pro brojlerová kuřata.

Výsledky dílčího projektu 3 vycházejí ze tří experimentů. V Exp. 1 byl sledován vliv současného působení isoflavonů daidzeinu a genisteinu a minoritního mykotoxinu enniatinu B na parametry bacherové fermentace a stravitelnost sušiny, NDF a organické hmoty směsné krmné dávky v podmínkách *in vitro*. Isoflavony byly do inkubací přidány v množství 5 mg/tuba (skupiny I a I+ENN), enniatin B v množství 1 ml/tuba (skupiny ENN a I+ENN) a byly srovnávány s kontrolní skupinou (K). Inkubace probíhala po dobu 48 hod. Stravitelnost sušiny byla vyšší ve skupinách ENN a I+ENN ve srovnání s K ($P < 0,05$), stravitelnost organické hmoty nebyla ovlivněna ($P > 0,05$), stravitelnost NDF byla nejvyšší ve skupině I a nejnižší ve skupinách s přísadkou enniatinu B (ENN a I+ENN, $P < 0,05$). pH po inkubaci bylo ve skupině K nižší než u skupin ENN a I+ENN ($P < 0,05$). Množství těkavých mastných kyselin nebylo pokusným zásahem ovlivněno ($P > 0,05$). Obsah amoniaku ve skupině EN byl nižší než ve skupinách I a I+ENN ($P < 0,05$).

V Exp. 2 byl sledován vliv současného působení isoflavonů daidzeinu a genisteinu a minoritního mykotoxinu beauvericinu na parametry bacherové fermentace a stravitelnost sušiny, NDF a organické hmoty směsné krmné dávky v podmínkách *in vitro*. Isoflavony byly do inkubací přidány v množství 5 mg/tuba (skupiny I a I+BEA), beauvericin v množství 1 ml/tuba (skupiny BEA a I+BEA) a byly srovnávány s kontrolní skupinou (K). Inkubace probíhala po dobu 48 hod. Stravitelnost sušiny a NDF byla vyšší ve skupině I ve srovnání se skupinou I+BEA ($P < 0,05$), stravitelnost organické hmoty nebyla ovlivněna ($P > 0,05$). pH po inkubaci bylo ve skupině K a I nižší než u skupiny I+BEA ($P < 0,05$). Množství těkavých mastných kyselin, poměr octové a propionové a obsah amoniaku nebylo pokusným zásahem ovlivněno ($P > 0,05$).

V Exp. 3 byl sledován vliv současného působení isoflavonů daidzeinu a genisteinu a minoritních mykotoxinů enniatinu B a beauvericinu na parametry bacherové fermentace a stravitelnost sušiny, NDF a organické hmoty směsné krmné dávky v podmínkách *in vitro*. Isoflavony byly do inkubací přidány v množství 5 mg/tuba (skupiny I a I+ENN+BEA), enniatin B a beauvericin každý v množství 1 ml/tuba (skupiny ENN+BEA a I+ENN+BEA) a byly srovnávány s kontrolní skupinou (K). Inkubace probíhala po dobu 48 hod. Stravitelnost sušiny byla vyšší ve skupinách ENN+BEA a I+ENN+BEA ve srovnání s kontrolou K ($P < 0,05$), stravitelnost NDF a organické hmoty nebyla ovlivněna ($P > 0,05$). pH po inkubaci bylo ve skupině K a I nižší než u skupiny I+ENN+BEA ($P < 0,05$). Množství těkavých mastných kyselin a poměr octové a propionové nebylo pokusným zásahem ovlivněno ($P > 0,05$), naproti tomu množství amoniaku bylo mezi skupinami odlišné ($P < 0,05$).

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Přínosem dílčího projektu 1 je zisk poznatků o účincích dietárně předkládaného pelyňku pravého na fyziologii a mikrobiální osazení GIT, imunitní odpověď kuřat a další sledované ukazatele. Předpokládané potvrzení vlivu pelyňku na organismus brojlerových kuřat je předpokladem pro vytvoření metodického postupu k tvorbě diet k udržení dobrého zdravotního stavu, welfare a užitkovosti brojlerů v kontextu rentabilní produkce bezpečného a kvalitního kuřecího masa, event. k případnému rozšíření výzkumu na další významné chované druhy potravinových zvířat.

Dílčí projekt 2 potvrdil, že specifický přídavek MK do krmných směsí pro výkrm brojlerových kuřat ovlivňuje jejich koncentraci ve finálním produktu, tj. v prsní a stehenní svalovině. Obohacení drůbežích produktů n-6 a n-3 PUFA může zajistit vhodný zdroj těchto kyselin ve výživě člověka. Z pohledu praktického přínosu můžeme konstatovat, že drůbeží maso může být využito jako funkční potravina vzhledem k tomu, že polynenasycené MK snižují frekvenci výskytu civilizačních chorob. Je možné doporučit jejich zařazení do krmných směsí potravinových zvířat.

Přínosem dílčího projektu 3 je upřesnění a doplnění informací o vlivu kombinovaného účinku testovaných isoflavonů a minoritních emergentních mykotoxinů na fermentační pochody v bachoru. Předpokládá se využití výsledků pro přípravu navazujících výzkumných projektů, resp. pro *in vivo* experimenty.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Očekává se uplatnění výsledků projektu ve vědecké a vzdělávací oblasti, ve sféře krmivářské a chovatelské praxe a dále v rámci konzultační a poradenské činnosti.

Výsledky budou prezentovány formou publikací ve vědeckých časopisech s IF, resp. formou odborných publikací, a budou využitelné pro přípravu návazných projektů základního a aplikovaného výzkumu.

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

Dílčí projekt 1:

Dietary effect of wormwood (*Artemisia absinthium*) supplementation on performance, meat quality, gut morphology, digestive enzymes, immune response and microbial and coccidial profile of broiler chickens.

Poultry Science, Q1

Dílčí projekt 2:

Effect of dietary oils on fatty acid content in broiler chicken muscle

Italian Journal of Animal Science, Q1

Dílčí projekt 3:

Effect of co-occurrence of isoflavones and minor mycotoxins in the dairy diets on the rumen fermentation and the NDF digestibility using *in vitro* methods

Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, Q2

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

| Položka | Finanční prostředky | |
|---------------------------------------|---------------------|--------------------|
| | Přidělené (v Kč) | Čerpané (v Kč) |
| Osobní náklady celkem (včetně odvodů) | 521.820,- | 521.820,- |
| Služby | 85.000,- | 69.510,19 |
| Cestovné | 17.000,- | 5.884,- |
| Další provozní náklady | 343.789,- | 370.394,81 |
| Doplňkové náklady | 145.141,- | 145.141,- |
| Celkem | 1,112.750,- | 1,112.750,- |

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

(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 vyplaceny akademickým pracovníkům, kteří se na řešení projektu podíleli, a to v plné výši dle finančních prostředků alokovaných na osobní náklady celkem, tj. **521.820,- Kč** (včetně odvodů). Osobní náklady byly rozděleny na náklady na mzdy (odměny) 374.768,-Kč, náklady na OPPP-dohody 20.380,- Kč, zdravotní pojištění: 33.729,- Kč a sociální pojištění: 92.943,- Kč. Akademickým pracovníkům, kteří se na řešení projektu podíleli po celý rok 2022, byly finanční prostředky vyplaceny v souladu s projektem. Osobní náklady plánované pro Mgr. Petru Jakešovou, Ph.D., která se na řešení projektu z důvodu zrušení PP na VETUNI nepodílela, byly alokovány novým spoluřešitelům projektu, MVDr. Lence Rozsypalové a Ing. Martině Kostůkové, Ph.D., zbylá část finančních prostředků byla alokována na dohody o provedení práce.

Služby:

Služby na projekt byly plánovány v celkové výši 85.000,- Kč. Reálně byly tyto finanční prostředky vyčerpány ve výši **69.510,19 Kč**, a to na pokrytí nákladů na laboratorní vyhodnocení biologických vzorků, interní technické služby, opravu technologického zařízení experimentální stáje a dále na stanovení obsahu TMK ve vzorcích inokula na externím pracovišti, na překladatelskou činnost v souvislosti s plánovanou publikační aktivitou a na pokrytí redakčního poplatku za uveřejnění publikace v IF časopise. Nevyčerpané finanční prostředky (15.489,81 Kč) byly převedeny do kapitoly Další provozní náklady.

Cestovné:

Cestovné na realizaci projektu bylo vyplaceno v celkové výši 5.884,- Kč. Tyto finanční prostředky byly čerpány na pokrytí nákladů na služební cestu do Českých Budějovic, na úhradu konferenčního poplatku konference „Drůbež 2022“ a služební cesty související s odběry vzorků bachorové tekutiny na ŠZP Nové Dvory. Nevyčerpané finanční prostředky (11.116,- Kč) byly převedeny do kapitoly Další provozní náklady.

Další provozní náklady:

Další provozní náklady na projekt byly plánovány v celkové výši 343.789,- Kč, přičemž skutečné čerpání bylo ve výši **370.394,81 Kč** (z důvodu převodu nevyčerpaných finančních prostředků z položky Služby a Cestovné; včetně poplatku bankám, poště). Tyto finanční prostředky byly využity

na zakoupení pokusných zvířat, krmiva, bylin a podestýlky pro experiment, chemikálií a komerčních kitů pro vyšetření vybraných ukazatelů krve a krevní plazmy, spotřebního materiálu pro hodnocení kvalitativních ukazatelů vzorků svaloviny a stanovení kokcií ve vzorcích trusu, drobných chovatelských potřeb (např. topná deska, regulátory teploty, infralampy), sond pro měření vybraných faktorů stájového prostředí apod. Dále byly finanční prostředky na další provozní náklady použity na nákup standardů isoflavonů daidzeinu a genisteinu a standardů minoritních mykotoxinů enniatinu B a beauvericinu, na nákup chemikálií, spotřebního laboratorního a drobného materiálu (laurylsíran sodný, sulfid sodný, salicylan sodný aj., filtrační sáčky na stanovení NDF, gáza, vata, pH papírky) a kancelářských potřeb (tonery). chemikálií a spotřebního laboratorního materiálu, jako např. laurylsulfát, kyselina sírová, hydroxid sodný, diethylether, titanium chloride solution, thiodiethylene glycol, kyselina boritá p.a., uhličitan sodný bezvodý p.a., hydroxid sodný p.a., na nákup 2 laboratorních vozíků pro bezpečnější manipulaci s chemikáliemi, ochranných pomůcek a drobných kancelářských potřeb a PHM.

Doplňkové náklady:

Doplňkové náklady na projekt byly plánovány ve výši 15 % z přímých nákladů, tj. celkem **145.141,- Kč**.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

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

9. 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:

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:**

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 2022
(vyplní řešitel)

1. **Identifikační číslo projektu:** 2022ITA31

2. **Název projektu:**

One Health Concept II, epizootologie infekčních chorob domácích a volně žijících zvířat

3. **Řešitel projektu:**

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

Fakulta/celoškolské pracoviště: Celoškolské pracoviště: CEITEC (Skupina Infekční choroby a molekulární mikrobiologie)

E-mail: literaki@vfu.cz

Telefon: 541 562 631

4. **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, CEITEC)

Koordinace řešení celého projektu

koordinace terénních výzkumů, analýza cest šíření klinicky významných bakterií telemetrickým sledováním potenciálních ptačích vektorů, analýza dat, příprava publikačních výstupů

Prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.

VETUNI, 1,0 (AP, CEITEC)

plánování experimentů, koordinace terénních a laboratorních vyšetření, analýza dat, příprava publikačních výstupů

Doc. RNDr. Monika Dolejská, Ph.D.

VETUNI, 0,6 (AP, CEITEC, projektový výzkumný pracovník)

plánování experimentů, koordinace laboratorních vyšetření, analýza dat, příprava publikačních výstupů

Prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D.

VETUNI, 1,0 (AP, CEITEC)

plánování experimentů, koordinace laboratorních vyšetření, analýza dat, příprava publikačních výstupů

Prof. MVDr. Pavel Široký, Ph.D.

VETUNI, 1,0 (AP, CEITEC)

design experimentů a vyšetření krevních protist ektotermních tetrapodů, příprava publikačních výstupů

- Mgr. Iva Sukkar (roz. Kutilová), Ph. D.** VETUNI, 0,8 (CEITEC, projektový výzkumný pracovník)
celogenomové sekvenování, bioinformatická analýza dat
- Mgr. Miroslava Barančková, Ph.D.** VETUNI, 1,0 (CEITEC, projektový výzkumný pracovník)
laboratorních vyšetření, analýza dat, příprava publikačních výstupů

Studenti DSP

- Mgr. Tomáš Nohejl** DSP student VETUNI, prezenční forma
izolace genomové a plazmidové DNA pro celogenomové sekvenování, PCR detekce genů rezistence
- Mgr. Jarmila Laušová** DSP student VETUNI, prezenční forma,
příprava kultivačních médií, izolace DNA, agarová gelová elektroforéza
- Mgr. Katarína Stred'anská** DSP student VETUNI, prezenční forma,
selektivní kultivace, identifikace bakterií metodou MALDI-TOF
- Mgr. Michaela Růžičková** DSP student VETUNI, prezenční forma,
příprava DNA knihoven pro celogenomové sekvenování, bioinformatická analýza sekvencí plazmidů
- Mgr. Šárka Bednaříková** DSP VETUNI, prezenční forma,
detekce bakterií *Wolbachia* v ektoparazitech netopýrů
- Mgr. Žaneta Živčicová** DSP student VETUNI, prezenční forma,
práce s krevními nátěry a analýzy DNA
- MVDr. Věra Nováková** DSP student VETUNI, prezenční forma,
Bakteriologické kultivace a identifikace a charakterizace izolátů
- Mgr. Marek Dostál** DSP student VETUNI, prezenční forma
analýza cest šíření klinicky významných bakterií telemetrickým sledováním potenciálních ptačích vektorů
- Mgr. Šimon Krejčí** DSP student VETUNI, prezenční forma,
analýza cest šíření klinicky významných bakterií telemetrickým sledováním potenciálních ptačích vektorů

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

Nejedná se o společný projekt

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Projekt zapadá do rámce výzkumu na VETUNI i prioritních témat soutěže ITA VETUNI 2022 (problematika původců infekčních a parazitárních onemocnění a nálezů zvířat, problematika veterinární molekulární biologie). Antibiotická rezistence a epidemiologie a epizootologie rezistentních bakterií je v současnosti jedním z nejdůležitějších témat humánní a veterinární medicíny. Studium infekčních agens asociovaných s netopýry je vysoce aktuální s ohledem na hodnocení rizik pro domácí a hospodářská zvířata i člověka. Problematika parazitóz volně žijících zvířat je integrální součástí výzkumu na VETUNI.

Na řešení projektu se budou podílet studenti DSP ale také pregraduální studenti VETUNI řešící své kvalifikační práce.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Charakterizovat izoláty *Escherichia coli* s mechanismy rezistence ke klinicky významným antibiotikům v populacích volně žijících migrujících ptáků a v chovech potravinových zvířat a detekovat odpovědné geny rezistence společně s mobilními genetickými elementy. U vyšetřovaných ptáků určit možné cesty šíření *E. coli* s mechanismy rezistence ke klinicky významným antibiotikům. Provedení retrospektivní a prospektivní studie výskytu infekcí koní a člověka vyvolaných *Staphylococcus aureus* na Klinice chorob koní FVL VETUNI se zaměřením na meticilin rezistentní kmeny (MRSA) za období 2008 až 2022. Izoláty MRSA detailně charakterizovat molekulárně genetickými metodami. Studovat biodiverzitu, evoluční vztahy a genealogii haemogragarin rodu *Hemolivia* z želv za použití mikroskopie v kombinaci s analýzou sekvencí DNA. Studovat výskyt endosymbiotické bakterie *Wolbachia* spp. u ektoparazitů netopýřů.

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany):

Vyšetřen byl soubor kloakálních výtěrů volně žijících migrujících dravých a vodních ptáků a vzorky z chovů potravinových zvířat. Typizovaly se izoláty *E. coli* s rezistencí ke kriticky důležitým skupinám antibiotik. Soubor všech získaných izolátů byl podroben fenotypové a genotypové charakterizaci s využitím širokého spektra mikrobiologických a molekulárně-biologických metod. Byla provedena detekce genů pomocí PCR pro rezistenci k beta-laktamům (zejména geny pro širokospektré a AmpC beta-laktamázy a karbapenemázy) a kolistinu (geny skupiny *mcr*). Byla stanovena epidemiologická příbuznost kmenů. U vybraných kmenů byla izolována celogenomová DNA, která byla použita pro přípravu DNA knihoven pomocí kitu Nextera XT. Sekvenační data byla použita pro stanovení sekvenčních typů izolátů, genů antibiotické rezistence, plazmidů a genů virulence. Byla provedena fylogenetická analýza izolátů. Byl proveden výběr izolátů k sekvenování dlouhých čtení na platformě MinION pro získání kvalitních referenčních genomů.

Na vyšetřené luňáky byly instalovány telemetrické vysílačky. Data o poloze sledovaných jedinců byla analyzována pomocí programu ArcGIS 10.1. Byly detailně charakterizovány časoprostorové aktivity sledovaných ptáků ve vztahu k potenciálnímu šíření významných kmenů *E. coli*.

Studie výskytu stafylokokových infekcí na KCHK byla založena na detekci kolonizace koní a personálu kliniky a kontaminace prostředí kliniky. Izoláty MRSA byly charakterizovány fenotypem antibiotické rezistence a průkazu genu *mecA*. Byla provedena typizace izolátů s využitím sekvenování variabilního regionu X genu *spa* kódujícího protein A. Získané sekvence byly analyzovány softwarem dostupným na centrálním spa serveru (<http://www.spaserver.ridom.de>). Reprezentativní izoláty byly celogenomově sekvenovány k posouzení klonality a šíření MRSA v čase a místě.

V rámci veterinárního skríningu bylo odebráno přes 100 vzorků (krevní nátěry plus fixovaná plná krev na molekulární analýzy), převážně sladkovodních želv (*Cuora* spp., *Cyclemys* spp., *Mauremys sinensis*, *Rhinoclemmys* spp.), mezi nimi 30 jedinců *Rhinoclemmys pulcherrima manni*. Všechny vzorky byly vyšetřeny mikroskopicky a podrobeny analýze sekvencí 18S rDNA (primery Hemo1/Hemo2, HepF300/HepR900, EF/ER) s použitím standardních fylogenetických metod založených na Bayesovské analýze a analýze maximum likelihood, genealogie izolátů byla zkoumána programem TCS.

Byla vyšetřena kolekce ektoparazitů netopýřů sesbíraných v letech 2013 až 2022 z netopýřů na lokalitách v pěti zemích. Celkem se jednalo o 217 jedinců netopýřů 11 druhů. Ektoparazité netopýřů byli determinováni pomocí morfologických znaků. Po izolaci DNA z ektoparazitů následovala amplifikace 16S rRNA fragmentu genu (~1,100 bp) specifického pro bakterii *Wolbachia* (primery:

16S 281F 5'-CTATAGCTGATCTGAGAGGAT-3' and 16S 1372R 5'-YGCTTCGAGTGAAACCAATTC-3').

Dosažené výsledky projektu (max. 1/2 strany):

U *E. coli* z volně žijících dravých ptáků byly detekovány geny skupiny *bla*_{CMY-2} a *bla*_{CTX-M} kódující rezistenci k cefalosporinům, u tří izolátů byl nalezen gen *mcr-1* kódující rezistenci ke kolistinu a tři nesly gen *bla*_{OXA-244} zprostředkující rezistenci ke karbapenemům. Zmíněné izoláty byly podrobeny celogenomovému sekvenování a dle následných analýz vykazovaly multirezistentní profil, vysokou četnost virulencních faktorů (*ent*, *fep*, *fim*, *gsp*, *omp* a *ecp*) a výskyt plazmidových replikonů skupin IncF-type, IncHI2, IncI, IncK, IncN, IncX1 a IncY. Nejčastěji se vyskytujícími geny byly *qnrB* a *qnrS*. Jeden izolát selektovaný na kolistinu nesl gen *mcr-1*. Kmeny *E. coli* nesoucí gen *mcr-1* byly zachyceny také v čerstvém domácím mase. Gen *mcr-1* byl nejčastěji lokalizován na plazmidech replikonových skupin IncX4, IncI2 a IncHI2.

U luňáků hnědých ze západní Sibíře byly odhaleny migrační trasy ptáků překonávajících Karákoram a zimoviště v nížinných oblastech Pákistánu a Indie. Bylo zjištěno, že zimující ptáci využívají skládky komunálních odpadů jako významný zdroj potravy. U luňáků hnědých zimujících v Evropě a rovněž využívajících skládky komunálních odpadů byl dokumentován jejich letní pobyt v předpokládaných místech hnízdění v evropské části Ruska.

Retrospektivní studií nálezů stafylokokových infekcí z KCHK byl zjištěn během sledovaného období let 2008 až 2022 statisticky významný nárůst infekcí vyvolaných MRSA. Průměrný podíl kmenů MRSA na stafylokokových infekcích činil za období 2008-2014 činil 22 % a za období let 2015 až 2022 už představoval 60 %. Tento nepříznivý stav byl potvrzen i prospektivní studií v během roku 2022, kdy byla zjištěna kolonizace sliznice nosu kmeny MRSA u 9 z 40 členů personálu KCHK a kontaminace prostředí. U většiny izolátů MRSA dominoval shodný profil antibiotické rezistence vůči ampicilinu, cefoxitinu, gentamicinu a enrofloxacinu. Výsledky sekvenování variabilního regionu X genu *spa* u 84 vybraných izolátů MRSA ukázaly dominantní podíl *spa* typu t011, ojediněle byl prokázán t064, t034 a t2349. Na KCHK se ve sledovaném období vyskytovala specifická podskupina LA(livestock-associated)-MRSA, představovaná především ST398. Podrobné posouzení klonality MRSA a šíření klonů v čase a místě bude provedeno po vyhodnocení výsledků celogenomového sekvenování 20 reprezentativních izolátů MRSA.

Krevní paraziti rodu *Hemolivia* byli nalezeni u 10 jedinců *Rhinoclemys pulcherrima manni* (prevalence 33%). Detailním vyšetřením byla zjištěna přítomnost 2 nových, dosud nepopsaných druhů r. *Hemolivia* druhu, který bude popsán, taxonomicky zařazen a fylogeneticky definován.

Bakterie *Wolbachia* spp. byly detekovány u 44 (18%) vzorků z 251 ektoparazitů (*Basilina nattereri*, *B. rybini*, *Ixodes vespertilionis*, *Macronyssus granulatus*, *Myodopsylla trisellii*, *Nycteribia kolenatii*, *N. latreillii*, *N. quasiocellata*, *N. vexata*, *Phthiridium biarticulatum*, *Penicillidia dufouri*, *Spinturnix kolenatii*, *S. myoti*, *S. psi*, *Rhinolophopsylla unipectinata* a *Steatonyssus spinosus*).

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Projekt odhalil klinicky významné rezistentní bakterie v populacích migrujících ptáků a potravinových zvířat. Porovnáním izolovaných klinicky významných bakterií s aktuálními světovými studiemi projekt pomohl osvětlit komplexní problematiku šíření antibiotické rezistence u volně žijících a potravinových zvířat. Byly zjištěny epizootologicky významné skutečnosti ve vztahu k možným cestám šíření nebezpečných bakterií prostřednictvím synantropních luňáků hnědých. Bylo prokázáno, že infekce koní i personálu na KCHK VETUNI dlouhodobě přetrvávají a že jsou způsobeny klonem ST398, který cirkuluje i na jiných koňských klinikách. Podle výsledku studie budou upraveny postupy na KCHK, aby došlo k snížení výskytu nozokomiálních infekcí. U

středoamerických želv jsme odhalili přítomnost haemogregarin rodu *Hemolivia*, tvořícím dvě evoluční linie s hloubkou větvení odpovídající dvěma samostatným druhům. U řady ektoparazitů netopýrů byly nalezeny endosymbiontní bakterie rodu *Wolbachia*.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Výsledky studie budou publikovány v odborných zahraničních časopisech s impakt faktorem (v kategoriích Q1 a Q2). Výsledky budou prezentovány na mezinárodních konferencích. 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:

Tarabai H., Krejci S., Karyakin I., Bitar I., Literak I., Dolejska M. What black kites in Russia can tell us about the spread of antibiotic resistance in wildlife? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Q1 (rukopis submitován)

Literák I., Škrábal J., Karyakin I.V., Andeyenkova N.G., Vazhov S.V. Black Kites on a flyway between Western Siberia and the Indian Subcontinent. *Scientific Reports*, 2022, vol. 12, no. 1, article number 5581 (p. 1–16). (ITA VETUNI Brno, 2022ITA31) (Multidisciplinary Sciences Q1)

Literák I., Reháková V., Xirouchakis S., Škrábal J., Starenko V. Black kites wintering in Europe: estimated number, subspecies status, and behaviour of a bird wintering on Crete and Turkey. *The European Zoological Journal*, 2022, vol. 89, no. 1, p. 1271–1284. (ITA VETUNI Brno, 2022ITA31) (Zoology Q2)

Papoušková A., Masaříková M., Čížek A., Tkadlec J. Retrospective analysis of nosocomial infections with methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on an equine clinic. *BMC Veterinary Research* (Q1) (příprava rukopisu)

Široký P. et al. Two new species of *Hemolivia* in *Rhinoclemmys pulcherrima manni*? Diversity of haemogregarines can be higher than expected. *Parasitology*, Q2 (příprava rukopisu)

Phylogeography of *Wolbachia* spp. and vector-borne infectious agents associated with bat ectoparasites. *Parasites & Vectors*, Q1 (příprava rukopisu)

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

| Položka | Finanční prostředky | |
|---------------------------------------|---------------------|------------------|
| | Přidělené (v Kč) | Čerpané (v Kč) |
| Osobní náklady celkem (včetně odvodů) | 1 386 600 | 1 386 600 |
| Služby | 265 000 | 268 304 |
| Cestovné | 80 000 | 59 045 |
| Další provozní náklady | 345 966 | 363 617 |
| Doplňkové náklady | 311 634 | 311 634 |
| Celkem | 2 389 200 | 2 389 200 |

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

(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 proti schválenému rozpočtu projektu)

Výše čerpání i struktura nákladů se jen velmi mírně lišila ve vztahu k schváleným parametrům u položek další provozní náklady (zvýšení čerpání o 17.651 Kč), cestovné (snížení čerpání o 20.955 Kč) a služby (zvýšení čerpání o 3304 Kč).

Osobní náklady:

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

Služby:

Přeprava vzorků z terénu, sekvenování DNA, nákup licence na analýzu sekvenačních dat, oprava a servis přístrojů používaných k laboratorním vyšetřením, náklady na telemetrické sledování,

Cestovné:

Odběr vzorků v terénu, ZSC na Slovensko a do Bulharska.

Další provozní náklady:

Ochranné pomůcky a dezinfekce, antibiotika a substance na testování citlivosti, plastik a tampóny na kultivaci bakterií, zkumavky pro archivaci bakterií, laboratorní sklo a plasty, chemikálie včetně chemikálií pro molekulárně genetická vyšetření, soupravy pro izolaci DNA, materiál a reagentie pro PCR, materiál pro biochemické vyšetření vzorků krve, kancelářské potřeby.

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)

9. 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:

2. 1. 2023 Prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.

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:**

2. 1. 2023 Prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.

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. Jiří Šmerda

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