

VETERINÁRNÍ UNIVERZITA BRNO

**FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ
FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE**

**KONFERENCE
INTERNÍ GRANTOVÉ AGENTURY**

konané dne 14. prosince 2021

SBORNÍK

BRNO 2021

Konference Interní grantové agentury VETUNI 2021

Fakulta veterinárního lékařství

Fakulta veterinární hygieny a ekologie

SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ

z výsledků řešení projektů IGA VETUNI 2021 financovaných z prostředků účelové podpory
na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT na rok 2021

Editovali:

doc. MVDr. Petr Chloupek, Ph.D.

prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.

doc. MVDr. Miša Škorič, Ph.D.

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

prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D.

Za věcnou a jazykovou správnost odpovídají autoři

Vydání první

Veterinární univerzita Brno 2021

ISBN 978-80-7305-865-4

Vážené kolegyně, vážení kolegové,

tento sborník Vám přináší příspěvky, které byly prezentovány na závěrečné konferenci Interní grantové agentury Veterinární univerzity Brno konané dne 14. prosince 2021.

Příspěvky prezentují výsledky projektů, které byly řešeny studenty a akademickými pracovníky VETUNI v rámci specifického výzkumu.

Děkuji všem řešitelským týmům za inspirativní výsledky jejich práce. Dále děkuji všem členům komise IGA VETUNI, oponentům, a dalším pracovníkům za to, že i v této nelehké době výborně zvládli své úkoly a přispěli k zajištění zdárného průběhu letošního ročníku IGA VETUNI.

doc. MVDr. Petr Chloupek, Ph.D.
předseda komise IGA VETUNI

OBSAH

Příspěvky FVL

Stanovení koncentrace iontů a pohlavních hormonů v tekutině získané z ovariálních cyst morčat.....	2
Sledování dynamiky hodnot aktivity proteinu C u psů s portosystémovým zkratem.....	6
Testování antivirových účinků fytofarmak na replikaci parvovirů masožravců.....	10
Detekce tkáňových parazitů volně žijících velkých šelem střední Evropy.....	14
Sledování výskytu a distribuce <i>Helicobacter</i> spp. v trávicím traktu psů.....	19
Zoonotický potenciál <i>Clostridioides difficile</i> : izolace a charakterizace kmenů ze psů a koček	24
Monitorování cytofagózy lososovitých ryb kvantifikací <i>Flavobacterium psychrophilum</i> ve vodě metodou qPCR	28
Stanovení mykobiomu v dolních cestách dýchacích u koní s equinním astmatem.....	33
Monitoring akutního poškození ledvin u koní léčených suxibuzonem.....	38
Sledování buněčných markerů v tumorech mléčné žlázy u fen.....	41
Vliv použité dávky medetomidinu na množství ejakulátu u kocourů a porovnání dvou metod odběru ejakulátu u kocourů – uretrální katetrizace a elektroejakulace.....	45
Vliv metadonu na nitrooční tlak, velikost zornice a produkci slz u psů.....	49
Účinnost a bezpečnost vyšších perorálních dávek azaperonu pro dosažení sedace u prasat....	53
Vliv vyhřívání dýchacího okruhu na tělesnou teplotu psů při umělé ventilaci.....	56
Vyhledání optimálního ředidla pro mrazení epididymálních spermií hřebců.....	60
Využití imunokoncepcie v regulaci pohlavní aktivity prepubertálních kozlů.....	64

Příspěvky FVHE

Hodnocení sensorických, fyzikálních a chemických vlastností vybraných analogů masa a analogů masných výrobků.....	69
Kultivace plísně <i>Pseudogymnoascus destructans</i> , která způsobuje syndrom bílého nosu u netopýrů	73
Detekce a kvantifikace vybraných včelích virů v různých materiálech ze včelích úlů.....	77
Změna texturních vlastností jedlých obalů při skladování v prostředí s rozdílnou vlhkostí.....	81
Potravní chování luňáků červených jako přirozených predátorů hrabošů polních – významných škůdců a přenašečů infekčních onemocnění.....	85
Posouzení efektu pesticidů a organických mikropolutantů na embryonální a embryolarvální stádia vodních organismů.....	88
Odpadné vody ako rezervoár baktérií rezistentných k antibiotikám poslednej voľby.....	92
Stanovení hypoglycinu A v rostlinných vzorcích pocházejících z javoru klen (<i>Acer pseudoplatanus</i>) a javoru jasanolistého (<i>Acer negundo</i>).....	96
Dynamika, komparatívna genomika a riziko šírenia multirezistentných patogénnych línií <i>Escherichia coli</i> u rackov bielohlavých na vodnom diele Nové Mlýny.....	100
Antioxidační a protizánětlivé účinky jedlého hmyzu v závislosti na krmení.....	104
Riziko vybraných nanokovů a jejich oxidů na akvatický ekosystém.....	108
Plazmidy přenášena rezistence ke kolistinu u humánních, animálních a environmentálních izolátů <i>Escherichia coli</i> : genomická surveillance.....	112
Detekce vybraných patogenních mikroorganismů v ready-to-eat potravinách.....	116
Porovnání úrovně dobrých životních podmínek v chovech a při přepravě na jatky u druhů a kategorií zvířat chovaných v ČR na základě výskytu úhynů a traumatických poškození zjišťovaných při veterinární prohlídce na jatkách.....	120
Přímá identifikace felinního koronaviru u koček chovaných v útulku a jeho vliv na welfare...	124
Vliv perorální aplikace nesteroidních antiflogistik na ryby.....	128
Stanovení železa, mědi a zinku v séru psů a posouzení jejich vztahu k výživě.....	132
Spermie a párovací systémy evropských netopýrů.....	136

Příspěvky

Fakulty veterinárního lékařství

Stanovení koncentrace iontů a pohlavních hormonů v tekutině získané z ovariálních cyst morčat

Pavla Hamouzová, Gabriella Bartakovicsová, Libuše Poldová

Ústav fyziologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno

Úvod

Výskyt ovariálních cyst u morčat vykazuje velmi vysokou prevalenci (Bean 2013, Bertram et al. 2018). Nejčastěji cysty vycházejí z *rete ovarii*, avšak vyskytují se i folikulární (Bean 2013). K přesnému rozlišení typu cysty se využívá detekce CD10, při níž jsou pozitivní buňky *rete ovarii*, ale nikoli buňky folikulární (Bertram et al. 2018). Navzdory vysoké prevalenci je etiopatogeneze stále neznámá (Bean 2013). Předpokládá se, že se do lumen dostává (transudací či sekrecí) tekutina a její akumulace má za následek cystickou dilataci *rete ovarii* (Keller et al. 1987).

K odhalení mechanismu, jímž cysty *rete ovarii* vznikají, bylo použito kritérium rozdělující cysty na transudativní, které se vyznačují iontovým složením tekutiny odpovídajícím sérové koncentraci, a sekreční, jejichž tekutina obsahuje zvýšené množství draslíku (Sisman et al. 2009).

Zatímco epitel folikulárních cyst může produkovat steroidní hormony, u výstelky *rete ovarii* steroidogenní aktivita není předpokládána (Bean 2013). I u morčat trpících prokazatelně cystami *rete ovarii* však byly zaznamenány příznaky hyperestrogenismu (Bertram et al. 2018). Stanovení estradiolu a progesteronu v tekutině z ovariálních cyst byla však u morčat dosud věnována poměrně malá pozornost (Riecken 2008, Kohutova et al. 2017).

Cílem projektu bylo určit typ ovariálních cyst, stanovit koncentrace vybraných iontů a pohlavních hormonů v tekutině získané z ovariálních cyst morčat a přispět tak k objasnění mechanismů podílejících se na jejich rozvoji.

Materiál a metodika

Vzorky

Histologické vzorky vaječnicků s cystami a tekutina vyplňující ovariální cysty byly získány z 20 ovariektomií morčat prováděných veterinární ambulancí z terapeutických důvodů. Na zvířatech nebyly prováděny žádné pokusy.

Analýza tekutiny získané z ovariálních cyst

Tekutina byla z cyst odebrána injekční stříkačkou bezprostředně po ovariektomii. Byla skladována při -20 °C po dobu nepřesahující 2 měsíce. Koncentrace Na⁺, K⁺ a Cl⁻ byly stanoveny přístrojem Architect Plus CI (Abbott), koncentrace estradiolu a progesteronu přístrojem Immulite 1000 (Siemens).

Analýza histologických vzorků a statistické zpracování dat

Vzorky vaječníků s cystami byly fixovány v 10% formalinu a následně zpracovány rutinními histologickými metodami pro světelnou mikroskopii. Z každého vaječniku byl jeden řez obarven hematoxylinem-eosinem pro celkové posouzení. Na dalším řezu byla provedena imunohistochemická detekce CD10: vzorky byly odparafinovány v xylenu, zavodněny sestupnou etanolovou řadou, revitalizace antigenů byla provedena zahřátím v mikrovlnné troubě (citrátový pufr, pH 6), po blokaci endogenní peroxidázy a nespecifické vazby protilátky byla aplikována primární protilátka (anti-CD10, clone 56C6) v ředění 1:50. Inkubace probíhala přes noc při teplotě 4 °C. Reakce byla vizualizována prostřednictvím sekundární biotinylované protilátky, streptavidinu-peroxidázy a diaminobenzidinu. Řezy byly dobarveny hematoxylinem, zamontovány a hodnoceny při zvětšení 400×. Výsledky byly hodnoceny v MedCalc statistical software pomocí Wilcoxonova testu a korelační analýzy.

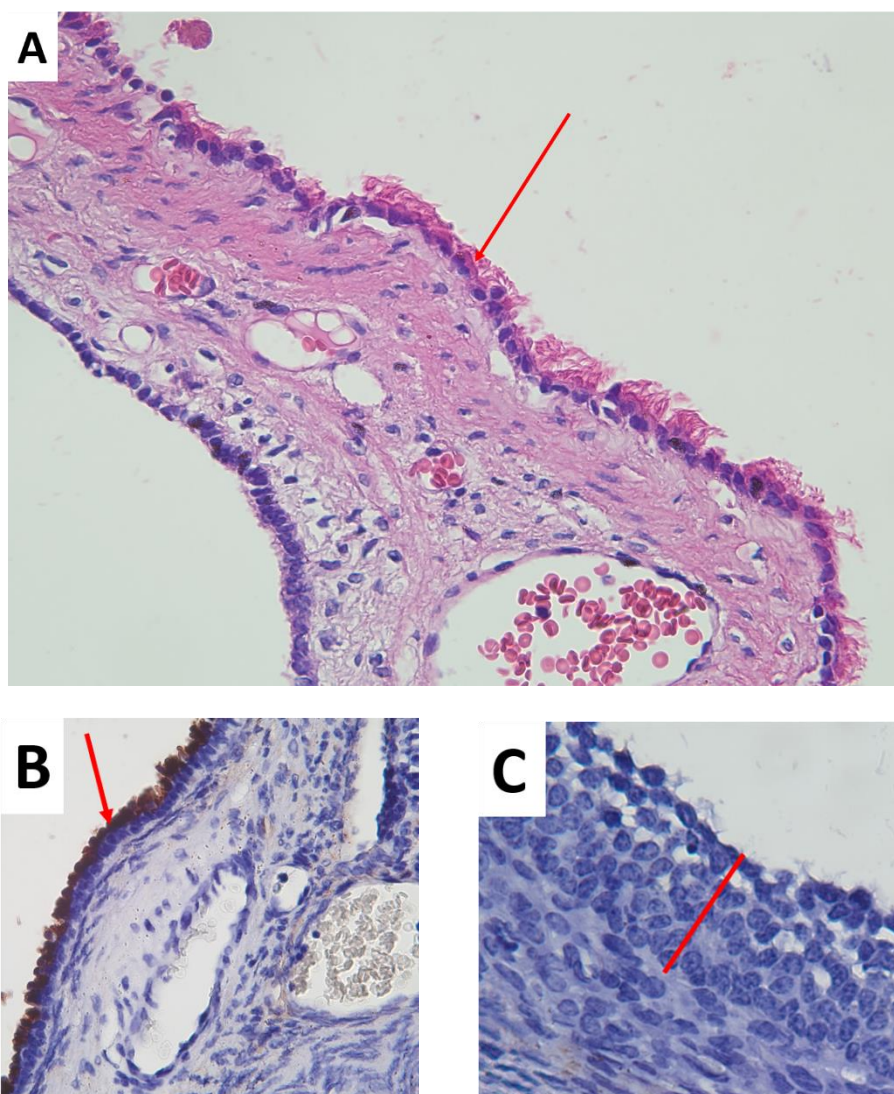
Výsledky

U všech morčat byla potvrzena oboustranná přítomnost cyst vycházejících z *rete ovarii* (Obr. 1), folikulární cysty nebyly zaznamenány.

Analýza tekutiny z ovariálních cyst prokázala, že koncentrace draslíku ($5 \pm 0,8$ mmol/l) odpovídá referenčním hodnotám pro sérovou koncentraci publikovanou autory Washington a van Hoosier (2012), jedná se tudíž o cysty transudativního typu. Koncentrace sodíku ($142 \pm 5,0$ mmol/l) se rovněž pohybovala u všech zvířat v sérových referenčních hodnotách, které uvádějí Washington a van Hoosier (2012), v případě chloridů ($116 \pm 5,3$ mmol/l) byly hodnoty v referenčním rozmezí pro sérum u 47 % vzorků, u 53 % vzorků referenční hodnoty mírně přesahovaly. V žádném z parametrů nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi levým a pravým vaječником ($P > 0,05$). Pozitivní korelace byla zjištěna pouze mezi koncentrací sodíku a chloridů ($r = 0,7713$, $P < 0,01$).

Koncentrace estradiolu v tekutině z ovariálních cyst byla $62 \pm 17,4$ pg/ml, progesteronu $3 \pm 5,4$ ng/ml. V žádném z parametrů nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi levým a pravým vaječником ($P > 0,05$). Byla popsána negativní korelace mezi koncentrací estradiolu a progesteronu ($r = -0,4296$, $P < 0,05$).

Obrázek 1 A: stěna cysty *rete ovarii*, jednovrstevný kubický epitel s řasinkami (šipka), HE, 400×, B: CD10-pozitivní buňky *rete ovarii* (šipka), 400×, C: CD10-negativní buňky *stratum granulosum* terciárního folikulu (červeně), 400×



Závěr

Ve vzorcích ovariálních cyst morčat, shromážděných od 20 zvířat, byl určen typ ovariální cysty s využitím imunohistochemické detekce CD10. V tekutině získané z cyst byly stanoveny koncentrace sodíku, draslíku, chloridů, estradiolu a progesteronu. Cysty vycházející z *rete ovarii* byly zaznamenány u všech 20 morčat, žádné folikulární cysty prokázány nebyly. Projekt tudíž prokázal vysoké zastoupení cyst z *rete ovarii* mezi ovariálními cystami u morčat.

Analýzou tekutiny vyplňující cysty bylo zjištěno, že koncentrace sodíku, draslíku a chloridů odpovídají extracelulární tekutině z důvodu nízkého obsahu draslíku. Cysty *rete ovarii* morčat tedy náleží k tzv. transudativnímu, nikoli sekrečnímu typu. Byla zjištěna pozitivní korelace mezi koncentracemi sodíku a chloridů.

Koncentrace estradiolu a progesteronu v tekutině z cyst *rete ovarii* odpovídaly sérovým hodnotám uváděným u zdravých morčat, přestože steroidogenní aktivita výstelky *rete ovarii* není u

morčat prozatím předpokládána. Byla zjištěna negativní korelace mezi koncentrací estradiolu a progesteronu. Výsledky projektu přináší nové poznatky týkající se ovariálních cyst u morčat a přispívají tak k objasnění jejich patogeneze.

Seznam literatury:

- 1) BEAN, A. D.: Ovarian cysts in the guinea pig (*Cavia porcellus*). *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*. 2013, 16(3), 757-776.
- 2) BERTRAM, C. A.; MÜLLER, K.; KLOPFLEISCH, R.: Genital tract pathology in female pet guinea pigs (*Cavia porcellus*): a retrospective study of 655 post-mortem and 64 biopsy cases. *Journal of Comparative Pathology*. 2018, 165, 13-22.
- 3) KELLER, L. S. F.; GRIFFITH, J. W.; LANG, C. M.: Reproductive failure associated with cystic *rete ovarii* in guinea pigs. *Veterinary Pathology*. 1987, 24, 335-339.
- 4) KOHUTOVA, S.; PANINAROVA, M.; ŠKORIČ, M.; JEKL, V.; KNOTEK, Z.; HAUPTMAN, K.: Cystic endometrial hyperplasia and bacterial endometritis associated with an intrauterine foreign body in a guinea pig with ovarian cystic disease. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 2017, 41-45.
- 5) RIECKEN, A.; Investigation on ovarian cysts in guinea pigs [Untersuchung zu Ovarialzysten beim Meerschweinchen]. Inaugural-Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, 2008, 148 p. [In German]
- 6) SISMAN, A. R.; SIS, B.; CANDA, T.; ONVURAL, B.: Electrolytes and trace elements in human breast cyst fluid. *Biological Trace Element Research*. 2009, 128, 18–30.
- 7) WASHINGTON, I. M., VAN HOOSIER, G.: Clinical Biochemistry and Hematology, in: Suckow, M.A., Stevens, K.A., Wilson, R.P. (Eds.), *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. Academic Press, 2012, pp. 57–116.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 112/2021/FVL

Sledování dynamiky hodnot aktivity proteinu C u psů s portosystémovým zkratem

Andrea Nečasová¹, Jana Lorenzová¹, Klaudia Mičková²

1 - Oddělení chirurgie a ortopedie, Klinika chorob psů a koček, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno

2 - Magisterský studijní program – 5. ročník, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a univerzita Brno

Úvod

Portosystémový zkrat (PSS) je cévní onemocnění, které způsobuje patologická komunikace mezi portálním a systémovým krevním oběhem. Portální venózní systém přináší do jater až 80 % krevního objemu. Krev přiváděná ze splachnické oblasti s sebou nese nejen metabolity trávicího traktu, které jsou v játrech zpracovávány, ale také hepatotropní látky, které napomáhají správnému růstu a funkci jaterní tkáně.^{1,2} U pacientů s PSS jsou tyto mechanismy narušeny.

Protein C (PC) je jeden z proteinů koagulační kaskády s antikoagulačním účinkem, který je syntetizován v játrech.³ Ve veterinární medicíně se jedná o doposud málo sledovaný a známý parametr. Bylo zjištěno jeho snížení u psů s diseminovanou intravaskulární koagulopatií a u psů v sepsi,⁴⁻⁶ jeho role byla sledována také u pacientů s dilatací a torzí žaludku.⁷ U pacientů s PSS byla prokázána snížená funkce jater reprezentovaná zvýšenou koncentrací žlučových kyselin a amoniaku, zvýšenou aktivitou jaterních enzymů se sníženými koncentracemi celkové bílkoviny a albuminu v krvi těchto pacientů.^{1,8,9} Studie Toulza a kol. (2006) prokázala sníženou aktivitu PC u pacientů s PSS.¹⁰ Snížená aktivita PC u pacientů s PSS dokazuje sníženou jaterní funkci následkem hypoperfuze jaterního parenchymu. Toto potvrzují i údaje z humánní medicíny, kdy Mack a kol. (2003) popisují úpravu aktivity PC po obnovení portální cirkulace u pacientů po ošetření trombózy portální žíly.¹¹

Na základě těchto údajů předpokládáme v naší práci úpravu aktivity PC u pacientů s PSS po chirurgické terapii, po jejíž úspěšném provedení by mělo docházet k obnovení fyziologického průtoku krve portální cévou. Sledování aktivity PC po chirurgické terapii PSS ameroidním konstriktorem nebylo dle námi dostupných informací doposud prováděno.

Materiál a metodika

Do studie byli zahrnuti pacienti ošetření na oddělení Chirurgie a ortopedie, Kliniky chorob psů a koček, Fakulty veterinárního lékařství Veterinární univerzity Brno, kteří byli diagnostikováni s onemocněním PSS, které u nich bylo léčeno chirurgicky s použitím ameroidního konstriktoru. Diagnostika byla prováděna na základě klinického vyšetření, biochemického a hematologického vyšetření krve, sonografického vyšetření a případně i vyšetření výpočetní tomografií. U pacientů s potvrzenou diagnózou PSS a následnou chirurgickou terapií metodou atenuace PSS ameroidním konstriktorem byla současně sledována dynamika změn aktivity PC v krvi. Stanovení aktivity PC bylo prováděno při vyšetření krevních vzorků v rámci standardního předoperačního a pooperačního vyšetření pacientů s PSS. Odběry krve probíhaly v časech: před operací (v čase diagnostiky) (T1), 2 dny po operaci (T2) a 8 týdnů po operaci (T3). Krev určená ke stanovení aktivity PC byla odebrána do zkumavek s citrátem. Tato krev byla do 1 hodiny od odběru stočena při 5100 otáčkách po dobu 15 minut. Vzorky byly následně zamrazeny při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, s tím, že jejich stanovení probíhalo po nashromáždění dostatečného množství vzorků pro využití analyzační soupravy, nejpozději však do 6 měsíců od jejich zamražení. Aktivita PC byla hodnocena jako snížená při stanovení hodnot $<75\%$ (referenční rozmezí 75-135 %). Bylo provedeno statistické hodnocení nashromážděných dat, ke statistickému hodnocení byla použita ANOVA a t-test. Hladina statistické významnosti byla 1 % ($p \leq 0,01$).

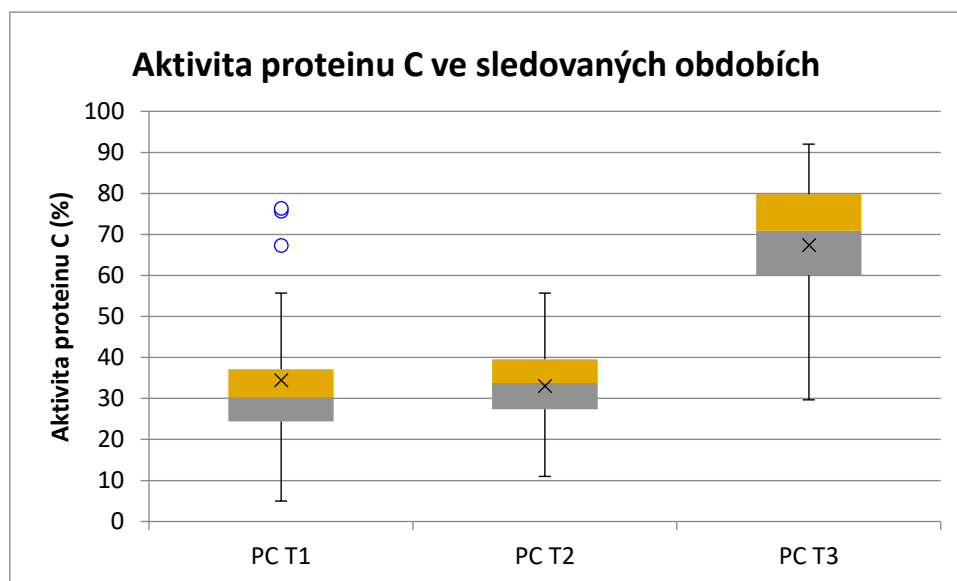
Výsledky

Do studie bylo zahrnuto celkem 27 psů s PSS léčených chirurgicky ameroidním konstriktorem. U 5 pacientů (18,52 %) se jednalo o PSS intrahepatální a 22 pacientů (81,48 %) o PSS extrahepatální. Z plemen byli zastoupeni jorkširský teriér (n=12), bišonek (n=3), jezevčík (n=3), papilon (n=1), trpasličí pudl (n=1), labradorský retriever (n=1), skotský teriér (n=1), maltézský psík (n=1), zlatý retriever (n=1), německý špic (n=1), beauceron (n=1) a kříženec (n=1). Průměrná hmotnost pacienta byla 3,6 kg (SD $\pm 3,07$), průměrný věk 10,63 měsíců (SD $\pm 13,35$).

Ve sledovaném souboru pacientů uhynul pouze 1 pacient (3,7 %) s extrahepatálním PSS, který uhynul druhý den po operaci. Aktivita PC byla v čase T1 stanovena u všech 27 pacientů, v čase T2 u 26 pacientů a v čase T3 u 23 pacientů. Průměrná hodnota aktivity PC v čase T1 byla 34,44 %, v čase T2 33,08 % a v čase T3 67,44 %. Aktivita PC byla před operací v referenčním rozmezí pouze u 2 pacientů, u obou se však pohybovala na spodní hranici referenčního rozmezí (konkrétně 75,65 a 76,41 %). U 11 pacientů (47,82 %) došlo v čase 8 týdnů po operaci k úpravě hodnot aktivity PC do referenčního rozmezí. Hodnoty aktivity PC ve sledovaných obdobích udává Graf č. 1. Byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi sledovanými obdobími ($p < 0,01$) – v čase 8 týdnů po operaci PSS

ameroidním konstriktorem dochází ke statisticky významnému vzrůstu aktivity PC oproti jeho aktivitě před operací ($p < 0,01$) a 2 dny po operaci ($p < 0,01$).

Graf č. 1: Aktivita proteinu C ve sledovaných obdobích.



(PC = protein C; T1 = období před operací; T2 = 2 dny po operaci; T3 = 8 týdnů po operaci)

Závěr

Bylo zjištěno, že dochází ke statisticky významnému zvýšení aktivity PC v čase 8 týdnů po operaci PSS ameroidním konstriktorem. Během 8 týdnů po implantaci ameroidního konstriktoru dochází k jeho nejvýraznější expanzi a k postupnému uzávěru aberantní cévy.^{12,13} I přesto, že nejsme schopni diagnostikovat úplný uzávěr PSS, může být aktivita PC novým neinvazivním markerem, který by mohl sloužit k hodnocení úspěšnosti provedené operace. Autoři mají v plánu v budoucnosti provádět další studie zabývající se tímto parametrem a zjistit, jak velký přínos by mohl mít pro dlouhodobou prognózu pacientů s PSS.

Seznam literatury

1. BERENT, A.C., TOBIAS, K.M. Hepatic Vascular Anomalies. In: JOHNSTON, S.A. and TOBIAS, K.M. *Veterinary Surgery: Small Animal*. 2nd ed. St. Louis: Elsevier, 2018, s. 1852-1886. ISBN 978-0-323-32065-8.
2. BERENT, A.C., TOBIAS, K.M. Portosystemic vascular anomalies. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2009, 39(3), 513–541.
3. YAN, S.B., DHAINAUT, J-F. Activated protein C versus protein C in severe sepsis. *Critical Care Medicine*. 2001, 29(7), 69–74.

4. MADDEN, R.M., WARD, M., MARLAR, R.A. Protein C activity levels in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in a dog model. *Thrombosis Research*. 1989, 55(3), 297-307.
5. De LAFORCADE, A.M., FREEMAN, L.M., SHAW, S.P., BROOKS, M.B., ROZANSKI, E.A., RUSH, J.E. Hemostatic changes in dogs with naturally occurring sepsis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2003, 17(5), 674-679.
6. De LAFORCADE, A.M., ROZANSKI, E.A., FREEMAN, L.M., LI, W. Serial evaluation of protein C and antithrombin in dogs with severe sepsis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2008, 22(1), 26-30.
7. VERSCHOOF, J., MORITZ, A., KRAMER, M., BAUER, N. Hemostatic variables, plasma lactate concentration, and inflammatory biomarkers in dogs with gastric dilatation-volvulus. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K Kleintiere Heimtiere*. 2015, 43(6), 389-398.
8. BRISTOW, P., TIVERS, M., PACKER, R., BROCKMAN, D., ORTIZ, V., NEWSON, K., LIPSCOMB, V. Long-term serum bile acid concentrations in 51 dogs after complete congenital portosystemic shunt ligation. *Journal of Small Animal Practice*. 2017, 58(8), 454-460.
9. SCHLESINGER, D.P., RUBIN, S.I. Serum bile acid assessment of hepatic function in dogs and cats. *The Canadian Veterinary Journal*. 1993, 34(4), 215-220.
10. TOULZA, O., CENTER, S.A., BROOKS, M.B., ERB, H.N., WARNER, K.L., DEAL W. Evaluation of plasma protein C activity for detection of hepatobiliary disease and portosystemic shunting in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2006, 229(11), 1761-1771.
11. MACK, C.L., SUPERINA, R.A., WHITINGTON, P.F. Surgical restoration of portal flow corrects procoagulant and anticoagulant deficiencies associated with extrahepatic portal vein thrombosis. *The Journal of Pediatrics*. 2003, 142(2), 197-199.
12. VOGT, J.C., KRAHWINKEL, D.J., BRIGHT, R.M., DANIEL, G.B., TOAL, R.L., ROHRBACH, B. Gradual occlusion of extrahepatic portosystemic shunts in dogs and cats using the ameroid constrictor. *Veterinary Surgery*. 1996, 25(6), 495-502.
13. HUNT, G.B., CULP, W.T.N., MAYHEW, K.N., MAYHEW, P., STEFFEY, M.A., ZWINGENBERGER, A. Evaluation of in vivo behavior ameroid ring constrictors in dogs with congenital extrahepatic portosystemic shunts using computed tomography. *Veterinary Surgery*. 2014, 43(7), 834-842.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 104/2021/FVL

Testování antivirových účinků fytofarmak na replikaci parvovirů masožravců

Lucie Janíček Hrubá, Vladimír Celer, Dagmar Břínek Kolařová, Zuzana Úlehlová,
*Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství,
Veterinární univerzita Brno*

Úvod

Parvoviry jsou malé ssDNA viry z čeledi *Parvoviridae*, rodu *Protoparvovirus*, které jsou schopny infikovat širokou škálu živočichů, včetně řádu šelem (*Carnivora*). Onemocnění způsobená parvoviry jsou charakterizována rychlým a závažným klinickým průběhem s vysokou morbiditou a mortalitou (Ros et al., 2017). Parvoviróza postihuje hostitele různého věku, více jsou však k nemoci vnímaví mladší jedinci v důsledku nedostatku mateřských protilátek nebo absence vakcinace. Klinické příznaky zahrnují hemoragickou gastroenteritidu, silný průjem, zvracení, horečku, anorexii, apatii. Přenos infekce je zprostředkován přímým kontaktem s nakaženým jedincem, fekálně-orálním kontaktem, slinami, zvratky nebo močí. Virus perzistuje v prostředí až po dobu jednoho roku v organickém prostředí (Ogbu et al., 2017). Terapie parvovirózy je především podpůrná a symptomatická. Zahrnuje rehydrataci, podání antibiotik, imunoglobulinů a antiemetik. Specifická antivirová terapie v současné době není známa, proto je testování látek s potenciálně antivirovým účinkem ke snížení zátěže parvovirózy na postižený organismus aktuálním tématem soudobé veterinární virologie (Zhou et al., 2019). Nadějným řešením je využití rostlinných hormonů - cytokininů a jejich derivátů a dále kanabinoidů a terpenů, které jsou obsaženy v konopí indickém (*Cannabis indica*) nebo konopí setém (*Canabis sativa*) a které vykazují antivirotické účinky. V humánní medicíně našly využití například k potlačení replikace herpes simplex viru (HSV-1), viru hepatitidy C nebo jako doplněk terapie HIV (Lowe et al., 2017).

Materiál a metodika

Studium antivirotické aktivity testovaných látek bylo provedeno na modelu protoparvoviru koček (dříve virus panleukopenie koček) izolovaného na území ČR, kultivovaného na buněčné kultuře Crandell-Rees Feline Kidney (CRFK – BVD Ag Negative, Sigma-Aldrich, USA) v minimálním esenciálním médiu (DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Biotech, ČR). V experimentu byl testován vliv fytofarmak kanabinoidů (vzorky kanabinoidů byly dodány Katedrou chemické biologie, Univerzita Palackého v Olomouci) a antiparazitika Closantelu (Sigma-Aldrich, USA). Vyšetřované substance byly testovány v několika různých koncentracích (1 – 1000 μM) z důvodu

stanovení úrovně cytotoxicity pro použitou buněčnou linii a následně pak bezpečná koncentrace látky byla aplikována na buněčný monolayer. Po jednohodinové inkubaci buněk s testovanou látkou byly buňky infikovány virem. Po uplynutí 48hodinové kultivace byl na buněčném monolayeru pozorován cytopatický efekt, který byl porovnán s pozitivní a negativní kontrolou.

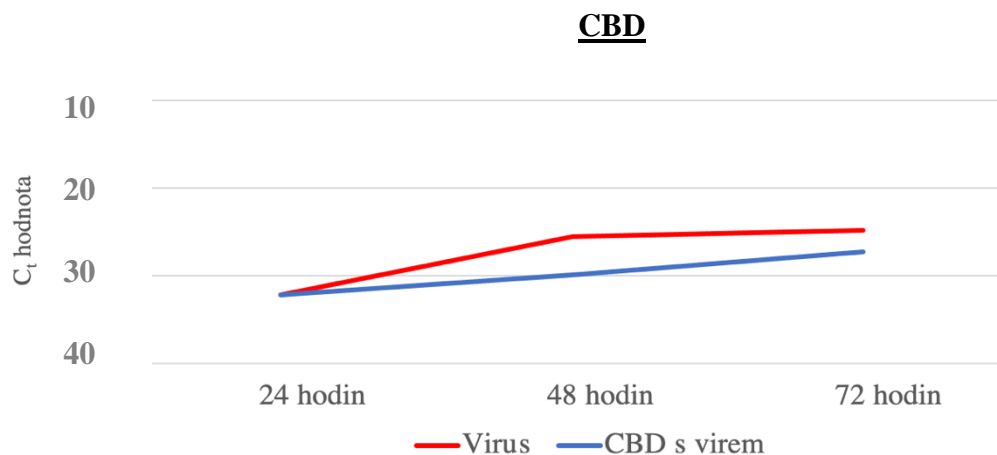
Pro kvantifikaci antivirotického účinku látky byl proveden odběr media z každého zkoumaného vzorku v intervalu 24 hodin a následně byl vzorek podroben kvantitativnímu PCR testu (qPCR). Složení reakční směsi pro 1 vzorek obsahovalo: 10 μ l mastermixu (Xceed qPCR Probe 2x Mix, IAB, ČR), 1 μ l FPVF/FPVR primerů, 0,5 μ l sondy, 5,5 μ l vody a 2 μ l DNA. Použité primery a sonda byly navrhnuty na Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie a dodány firmou Generi-Biotech (ČR).

Výsledky

V experimentu testování antivirotických látek byly otestovány tyto substance – kanabidiol (CBD) a kanabigerol (CBG) jako zástupci kanabinoidů a antiparazitikum Closantel, které další studie označují jako látku s možným antivirotickým působením. Oba zástupci kanabinoidů nedokázali plně inhibovat replikaci viru. Při ošetření buněčného monolayeru kanabinoidy docházelo k replikaci viru a tvorbě cytopatického efektu. Navíc oba testovaní zástupci vykazovali značnou cytotoxicitu i při použití nízkých koncentrací. Zvolená koncentrace pro ošetření buněk byla u CBD 8 μ M a u CBG 10 μ M.

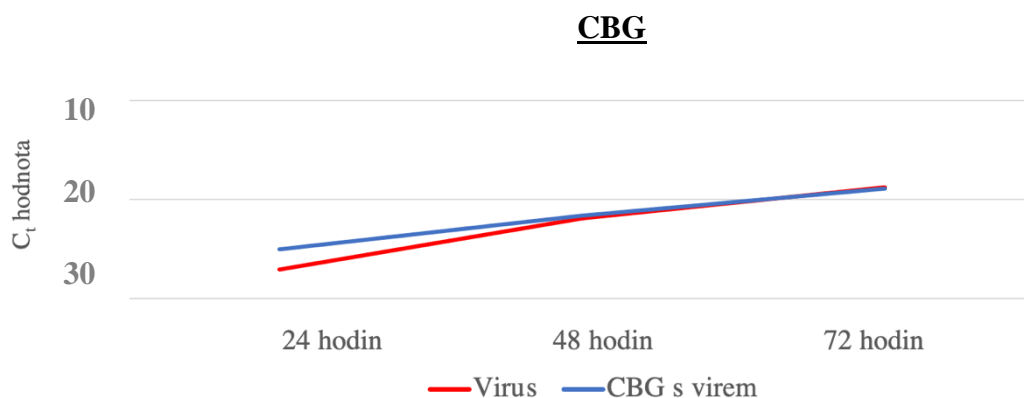
V případě CBD došlo k mírnému zpomalení množení viru ve srovnání s kontrolou, které prokázal test qPCR. C_t hodnoty vzorku s CBD byly vyšší než kontrolní C_t hodnoty vzorku pouze s virem. V případě CBD je tedy možné předpokládat jeho využití jako podpůrný doplněk parvovirové terapie.

Graf č. 1: Porovnání C_t hodnot kanabidiolu (CBD) s pozitivní kontrolou



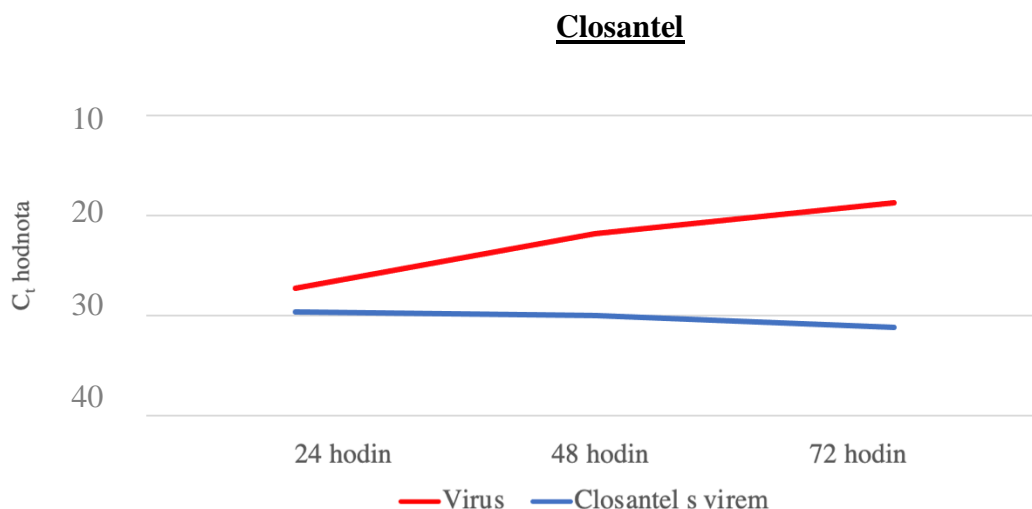
Na rozdíl od CBD nedokázal druhý zástupce kanabinoidů inhibovat ani zpomalit množení viru a použití CBG jako antivirotika je tedy bezvýznamné.

Graf č. 2: Porovnání C_t hodnot kanabigerolu (CBG) s pozitivní kontrolou



Antiparazitikum Closantel nevykazovalo tak výraznou toxicitu jako kanabinoidy. Pro experiment byla použita koncentrace 10 μ M. Closantel dokázal potlačit replikaci viru v buňkách kultury prakticky okamžitě po infekci. C_t hodnota vzorku s Closantelem se téměř vůbec neměnila ve všech odebraných časových intervalech. Látka byla poté používána jako kontrola inhibice viru při dalších pokusech.

Graf č. 3: Porovnání C_t hodnot Closantelu s pozitivní kontrolou



Závěr

Testované fytofarmakum kanabidiol (CBD) je možné využít pro případnou doplňkovou terapii parvovirových infekcí u masožravců především v případech, kde vakcinace není dostatečně účinná. Dalším přínosem projektu bylo potvrzení antivirových účinků antiparazitika Closantelu.

Seznam literatury:

- 1) CHENG, N., ZHAO, Y., HAN, Q.: Development of a reverse genetics system for a feline panleukopenia virus. *Virus Genes*. 2019, 55(1), 95-103. DOI: 10.1007/s11262-018-1621-9. ISSN 0920-8569.
- 2) OGBU, K.I., ANENE, B.M A NWEZE, N.E.: Canine parvovirus: a review. *International journal of science and applied research*. 2017, 2 (2), 74-95. ISSN 2504-9070.
- 3) ROS, C., BAYAT, N., WOLFISBERG, R., ALMENDRAL, J. M.: Protoparvovirus Cell Entry. *Viruses*. 2017, 9(11). DOI: 10.3390/v9110313. ISSN 1999- 4915.
- 4) ZHOU, H., SU, X., LIN, L., ZHANG, J., QI, Q., GUO, F., XU, F., YANG, B.: Inhibitory Effects of Antiviral Drug Candidates on Canine Parvovirus in F81 cells. *Viruses*. 2019, 11(8). ISSN 1999-4915.
- 5) LOWE, H. I., TOYANG, N. J., MCLAUGHLIN, W.: Potential of Cannabidiol for the Treatment of Viral Hepatitis. *Pharmacognosy research*. 2017, 9(1), 116–118. DOI: [10.4103/0974-8490.199780](https://doi.org/10.4103/0974-8490.199780)

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 120/2021/FVL

Detekce tkáňových parazitů volně žijících velkých šelem střední Evropy

Lucia Frgelecová¹, Ondřej Daněk¹, Paulina Maria Lesiczka¹

¹Ústav patologické morfologie a parazitologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno

Úvod

V současnosti je ve střední Evropě včetně České republiky zaznamenáván návrat a nárůst populací dříve vyhubených vrcholných predátorů, vlka obecného (*Canis lupus*), rysa ostrovida (*Lynx lynx*) a v některých oblastech také medvěda hnědého (*Ursus arctos*) (Kutal et al. 2017). Děje se tak díky přirozené migraci těchto zvířat do volných teritorií a zároveň jejich ochraně, v menší míře však také díky reintrodukci. V antropogenních podmínkách střední Evropy při relativně hustším zalidnění to v čím dál větší míře také znamená kontakt těchto zvířat s civilizací a možnost prolínání sylvatických a domestikálních cyklů parazitů. Velké šelmy tvoří vrchol potravní pyramidy a jsou zároveň i definitivní hostitelé řady parazitů využívajících predaci ve svých životních cyklech. Návrat velkých šelem tak představuje změnu ekosystému včetně potenciálního návratu parazitů, kteří v posledních 100-200 letech z našeho území vymizeli. V důsledku migrace velkých šelem, především vlků, lze očekávat i výskyt parazitů, kteří dosud na našem území nebyli v přírodě zaznamenáni. Z významných parazitóz, které představují riziko pro domácí psy a kočky jsou to zejména zástupci metastrongylidních hlístic postihující respirační trakt těchto zvířat. Nejvýznamnějším je *Angiostrongylus vasorum*, parazit především psovíťých šelem, který se vyskytuje např. v sousedním Slovensku (Cabanova et al. 2018). V ČR byl zatím sporadicky pozorován u volně žijících psovíťých šelem, včetně vlků (nepublikovaná data z předchozího projektu). Další důležitou skupinou jsou krevní parazité z kmene Apicomplexa, kam se řadí původce psí babesiózy *Babesia canis*, přenášená vektorem *Dermacentor reticulatus*. Volně žijící psovíťé šelmy mohou díky migraci napomoci k rozšíření tohoto parazita z okolních států, kde se toto onemocnění běžněji vyskytuje, např. Slovensko nebo Polsko (Welc-Faleciak et al. 2009). Významnou parazitární zoonózou jsou infekce způsobené zástupci rodu *Trichinella*, v jejichž vývojových cyklech mohou výše zmíněné šelmy figurovat jako hostitelé. Cílem projektu byla detekce tkáňových a krevních parazitů u velkých šelem a posouzení role těchto hostitelů v šíření parazitů v ekosystémech střední Evropy s ohledem na možné přenosy parazitů mezi volně žijícími a domácími zvířaty včetně zhodnocení rizika vybraných zoonóz.

Materiál a metodika

Odebírané vzorky

V rámci projektu byly na Ústavu patologické morfologie a parazitologie prováděny pitvy vlků obecných a rysů ostrovidů získaných ve spolupráci s Agenturou ochrany přírody a krajiny ČR. Byly odebírány vzorky trusu, dospělci parazitů lokalizovaných v GIT a v respiračním traktu/srdci, ektoparazitě, vzorky svaloviny a sleziny. Pro další projekty byly odebrány také vzorky dalších orgánů a tuku. Využity byly vzorky i z předchozích pitev, které proběhly na Ústavu patologické morfologie a parazitologie a také vzorky trusu získané při monitoringu velkých šelem.

Koprologické vyšetření

U vzorků trusu získaných z pitev nebo při monitoringu velkých šelem bylo provedeno larvoskopické vyšetření pomocí Baermannovy metody. V případě pozitivních vzorků byli nalezené larvy odebrány pro molekulární analýzy.

Izolace DNA

Izolace DNA metastrongylidních hlístic (jak dospělců, tak L1 larev) byla provedena pomocí komerčního kitu NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel, Germany) standartním protokolem. V případě L1 larev byly využity 1-10 larev (podle dostupnosti) a v případě dospělých parazitů malá část jejich těla. V případě krevních parazitů byla DNA izolována ze vzorků sleziny za využití komerčního kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany).

Molekulární analýza

Molekulární analýzy zaměřené na rodové a druhové určení metastrongylidních hlístic byly zacíleny na 2 markery – mitochondriální podjednotku 1 cytochrom c oxidázy (COI) a internal transcribed spacer 2 (ITS2). Zhruba 510 bp dlouhý úsek DNA obsahující celý ITS2 byl amplifikována za využití primerů NC1 a NC2 (Gasser et al, 1993). V případě COI byly námi navrženy primery amplifikující až 1462 bp zmíněného genu, využitelné pro klasické nebo semi-nested PCR. Detekce krevních klíšťat přenášených patogenů se zaměřila na marker 18S (*Babesia* sp., *Hepatozoon* sp. a *Cytauxzoon* sp.) (Bartley et al. 2016), groESL (*Anaplasma phagocytophilum*) (Alberti et al., 2005) a ospC, flagellin a P66 (*Borrelia burgdorferi* s.l.) (Bunikis et al., 2004). Výsledné produkty byly vizualizovány pomocí elektroforézy na 2% agarózovém gelu obarveném Midori Green Advance (Elisabeth Pharmacon, Czech Republic). Následně byly produkty přečištěné z gelu za použití kitu Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech, Taiwan) a odeslány na komerční sekvenaci (Macrogen Europe, Nizozemí). Získané sekvence byly zpracovány v programu Geneious

Prime a porovnány se sekvencemi z databáze GenBank za použití BLAST analýzy (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Vyšetření na přítomnost *Trichinella* sp.

Vzorky svaloviny bránice a mezižeberních svalů byly vyšetřeny podle metodiky popsané v nařízení EU 2015/1375. Vzorky byly vyšetřovány jednotlivě. Vzhledem k jejich dlouhodobému uchovávání při -18 °C bylo použito vždy 5 g svaloviny. Sediment vzniklý při trávení každého vzorku byl uchován pro izolaci DNA a následné PCR vyšetření.

Výsledky

Za dobu projektu byla provedena pitva u celkem 6 volně žijících divokých šelem (3x vlk obecný a 3x rys ostrovid) a při nich získány vzorky trusu, parazitů a orgánů. Tento soubor byl doplněn o vzorky získané z pitev volně žijících šelem, které na Ústavu patologické morfologie a parazitologie proběhly v minulosti. Projekt se zaměřil na a) určení vývojových stádií metastrongylidních hlístic nalezených při pitvě nebo v trusu b) screening vybraných krevních patogenů ze vzorků sleziny různých druhů volně žijících šelem a c) vyšetření vzorků svaloviny vybraných druhů šelem na přítomnost hlístic rodu *Trichinella*.

Z celkem 335 vzorků trusu vyšetřených larvoskopickými metodami byly L1 larvy metastrongylidních hlístic nalezeny v 62 (18,5 %) z nich. Rodové určení proběhlo na základě markerů ITS2 a COI, vzhledem k absenci referenčních sekvencí v databázi Genbank však nebylo možné všechny tyto jedince určit druhově. Rodové určení však bylo dostatečné pro rozlišení parazitů šelem od parazitů jejich kořisti, jejichž larvy se mohou v nacházet v trusu predátorů (Tab. 1). Na základě sekvencí jsme však zjistili, že se v oblasti vyskytují druhy metastrongylidních hlístic volně žijících přežvýkavců, které doposud nebyly minimálně molekulárně popsány, což poukazuje na nutnost dalšího výzkumu této problematiky.

Screening krevních patogenů volně žijících šelem proběhl jednak u lišek obecných (117 jedinců) a jednak na dalších 12 druzích volně žijících šelem (celkem 96 jedinců). V případě lišek byla prováděna detekce *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* sp. *Hepatozoon* sp. a *Borrelia burgdorferi* s.l. Soubor ostatních šelem byl testován na přítomnost *A. phagocytophilum*, *Babesia* sp., *Cytauxzoon* sp. a *Hepatozoon* sp. U více než 90 % vyšetřovaných lišek obecných byla detekována DNA cílových patogenů s nejvyšším zastoupením koinfekce *B. vulpis* a *H. canis*, která byla pozorována téměř u poloviny zvířat (Tab. 2). Výsledky screeningu ostatních druhů prokázali přítomnost *B. canis* u volně žijících šelem v ČR (Tab. 3).

Vyšetření vzorků svaloviny na přítomnost parazitů rodu *Trichinella* bylo provedeno u celkem 111 vzorků svaloviny z 12 druhů volně žijících šelem. Larvy byly nalezeny pouze v případě jednoho vzorku z medvěda hnědého. Takto nízká prevalence je však pravděpodobně způsobena uchováváním vzorků v mrazu, což vede k rychlé devitalizaci L1 larev většiny druhů rodu *Trichinella*. Sedimenty získané trávící metodou tak budou v rámci dalších projektů vyšetřeny pomocí PCR, což přinese mnohem přesnější informace o prevalenci těchto parazitů v populaci volně žijících šelem.

Tabulka 1: Metastrongylidní hlístice nalezené v trusu vlka obecného a rysa ostrovida

Parazit	Definitivní hostitel parazita	<i>Canis lupus</i>	<i>Lynx lynx</i>
<i>Crenosoma vulpis</i>	Šelmy, především psovitě	13	0
<i>Angiostrongylus vasorum</i>	Šelmy, především psovitě	2	0
<i>Varestrongylus sp.</i>	Volně žijící přežvýkavci	11	6
<i>Elaphostrongylus sp.</i>	Volně žijící přežvýkavci	28	2
Celkem		54	8

Tabulka 2: Prevalence vybraných krevních patogenů u 117 lišek obecných

Pozitivní	<i>H. canis</i>	<i>B. vulpis</i>	<i>H. canis</i> i <i>B. vulpis</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>B. burgdorferi s.l.</i>
110	34	14	58	3	10

Tabulka 3: Prevalence vybraných krevních patogenů u volně žijících šelem

Druh	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>Babesia sp.</i>	<i>Hepatozoon sp.</i>	<i>Cytauxzoon sp.</i>
<i>Canis aureus</i> (3)	1	-	-	-
<i>Canis lupus</i> (10)	1	1*	10	-
<i>Lynx lynx</i> (17)	3	-	2	6
<i>Procyon lotor</i> (35)	4	2*	3	1
<i>Lutra lutra</i> (3)	-	-	-	-
<i>Martes foina</i> (2)	-	-	1	-
<i>Martes martes</i> (1)	-	-	-	-
<i>Meles meles</i> (3)	-	-	-	-
<i>Mustela erminea</i> (1)	1	-	-	-
<i>Mustela putorius</i> (1)	-	-	-	-
<i>Nyctereutes procyonides</i> (16)	-	3	-	-
<i>Ursus arctos</i> (4)	-	-	-	-
Celkem	10	6	16	7

*určena jako *B. canis*

Seznam literatury:

ALBERTI A, ZOBBA R, CHESSA B, ADDIS MF, SPARAGANO O, PINNA P ARPAGLIA ML, CUBEDDU T, PINTORI G, PITTAU M. (2005) Equine and canine *Anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States. Appl Environ Microbiol.;71(10):6418-22. doi: 10.1128/AEM.71.10.6418-6422.2005. PMID: 16204571; PMCID: PMC1265917.

- BARTLEY, P. M., HAMILTON, C., WILSON, C., INNES, E. A., KATZER, F. (2016). Detection of *Babesia annae* DNA in lung exudate samples from Red foxes (*Vulpes vulpes*) in Great Britain. *Parasites & Vectors* 9, 84
- BUNIKIS J, GARPOMO U, TSAO J, BERGLUND J, FISH D, BARBOUR AG. (2004) Sequence typing reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents *Borrelia burgdorferi* in North America and *Borrelia afzelii* in Europe. *Microbiology (Reading)*. 150(Pt 6):1741-1755. doi: 10.1099/mic.0.26944-0. PMID: 15184561.
- CABANOVA, V., HURNIKOVA, Z., MITERPAKOVA, M., DIRBAKOVA, K., BENDOVA, A., KOCAK, P. (2018): Lungworm infections in dogs from Central Europe. *Veterinární medicína*. 63. 367-372. 10.17221/24/2018-VETMED
- GASSER, R., CHILTON, N., HOSTE, H., BEVERIDGE, I. (1993). Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nucleic acids research*. 21. 2525-6. 10.1093/nar/21.10.2525.
- KUTAL, M., BELOTTI, E., VOLFOVÁ, J., MINÁRIKOVÁ, T., BUFKA, L., PLEDNIK, L., KROJEROVÁ-PROKEŠOVÁ, J., BOJDA, M., VÁŇA, M., KUTALOVÁ, L., BENEŠ, J., FLOUSEK, J., TOMÁŠEK, V., KAFKA, P., POLEDNÍKOVÁ, K., POSPÍŠKOVÁ, J., DEKÁŘ, P., MACHCINÍK, B., KOUBEK, P., DUĽA, M. (2017): Výskyt velkých šelem – rýsa ostrovida (*Lynx lynx*), vlka obecného (*Canis lupus*) a medvěda hnědého (*Ursus arctos*) – a kočky divoké (*Felis silvestris*) v České republice a na západním Slovensku v letech 2012–2016 (Carnivora). *Lynx, n.s.* (Praha), 48: 93-107.
- WELC-FALECIAK, R., RODO, A., SIŃSKI, E., & BAJER, A. (2009). *Babesia canis* and other tick-borne infections in dogs in Central Poland. *Veterinary parasitology*, 166(3-4), 191–198.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 106/2021/FVL

Sledování výskytu a distribuce *Helicobacter* spp. v trávicím traktu psů

Aneta Angelova¹, Miša Škorič¹, Miloš Vávra², Michaela Jonášiová²

¹Ústav patologické morfologie a parazitologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno,

² Oddělení vnitřních chorob, Klinika chorob psů a koček, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno

Úvod

Rod *Helicobacter* zahrnuje několik desítek druhů gram negativních spirálovitých bakterií nalézáných v trávicím traktu různých druhů zvířat a člověka. Tradičně se, podle jejich lokalizace v průběhu trávicího traktu, zástupci tohoto rodu rozdělují na tzv. „žaludeční helikobaktery“ a „enterohepatické helikobaktery“. V humánní medicíně je infekce některými druhy *Helicobacter* spp. (zejména *H. pylori*) prokazatelně spojena s akutními i chronickými gastritidami, žaludečními ulceracemi a některými proliferativními onemocněními. Stejně tak v případě enterohepatických druhů helikobakterů se zvažuje jejich potenciální podíl na rozvoji nespecifických střevních zánětů lidí (1).

U psů může být *Helicobacter* spp. součástí normální mikroflóry u zdravých jedinců, ale také může být spojen s rozvojem zánětlivých nebo proliferativních onemocnění GIT. Infekce žaludeční sliznice bakteriemi rodu *Helicobacter* spp. se zdá být u psů relativně běžná s prevalencí 61 % až 100 % (2). Ze žaludku psů byly nejčastěji izolovány *H. felis*, *H. bizzozeroni* a *H. salomonis*. Enterohepatické kmeny helikobakterů dosud izolované ze střeva, příp. jater psů zahrnují *H. bilis*, *H. canis*, *H. cinaedi* a *Flexispira rappini*. Patogenní efekt u psů a koček dosud nebyl u žaludečních ani enterohepatických kmenů *Helicobacter* spp. prokázán, nicméně některé studie uvádí vyšší frekvenci výskytu zánětlivých změn právě v souvislosti s infekcí některými druhy helikobakterů (1, 3)

Cílem tohoto projektu je sledování výskytu a distribuce jednotlivých druhů *Helicobacter* spp. v trávicím traktu psů a zhodnocení jejich možného vlivu na rozvoj patologických lézí GIT.

Materiál a metodika

Pro účely detekce přítomnosti a distribuce *Helicobacter* spp. v bioprátech sliznic GIT byly do projektu zařazeny vzorky pacientů různého věku a plemene, kteří podstoupili plánované ošetření v celkové anestézii z jiného důvodu. Vzorky od těchto pacientů byly odebrány na základě Informovaného souhlasu majitele a v souladu se stanoviskem Odborné komise pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat. Po provedení plánovaného ošetření/vyšetření, pro které byla indikována anestezie bylo přistoupeno k

endoskopickému vyšetření. Před samotným endoskopickým vyšetřením a odběrem bioptických vzorků bylo u všech pacientů provedeno základní klinické vyšetření a odebrán vzorek trusu pro parazitologické vyšetření. Po uvedení pacientů do anestézie byla endoskopicky vyšetřena sliznice žaludku a duodena s číselným zhodnocením endoskopického nálezu a stanovením endoskopického skóre, kdy hodnota 0 znamenala normální nález, hodnota 1 odpovídala mírné hyperémii, edému nebo fragilitě sliznice, hodnota 2 středně výrazné hyperémii, edému nebo fragilitě sliznice a hodnota 3 výrazné hyperémii, edému nebo fragilitě sliznice, dle dříve popsanych metod (4). Pomocí cytologického kartáčku (jednorázové cytologické kartáčky, Medigreen) byly u všech pacientů provedeny stěry sliznic žaludku a duodena. Z materiálu odebraného kartáčkem byla vždy připravena suspenze v Brucella bujónu a ta ihned dopravena do laboratoře. Izolace *Helicobacter* spp. byla provedena metodou membránové filtrace. Suspektní kolonie (drobné, okrouhlé, šedobílé barvy) byly podrobeny confirmaci pomocí PCR vyšetření.

Od každého jedince bylo dále odebráno celkem 4 až 7 bioptátů sliznice žaludku a 3 až 6 bioptátů sliznice duodena. Bioptické vzorky byly fixovány v 10 % pufrovaném roztoku formaldehydu a zpracovány parafínovou technikou. Za účelem zhodnocení přítomnosti a míry zánětlivých změn ve sliznici byly ze všech vzorků zhotoveny histologické preparáty barvené přehledným barvením, které byly následně vyšetřeny dle dříve publikované metodiky (5). V těchto preparátech byla dále orientačně zhodnocena míra kolonizace sliznice spirálovitými bakteriemi morfologicky odpovídajícími *Helicobacter* spp. Pro *in situ* detekci *Helicobacter* spp. antigenu bylo dále u všech vzorků použito imunohistochemické barvení s pomocí monoklonálních a polyklonálních protilátek proti *Helicobacter pylori*. Řezy ze všech bioptátů byly také zpracovány histochemickou metodou, stříbřením dle Warthin-Starryho, pro přesnější posouzení morfologie sledovaných bakterií. Dále bylo u každého pacienta provedeno kultivační vyšetření rektálního výtěru zaměřené na detekci přítomnosti *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* a *Campylobacter* spp. a parazitologické vyšetření trusu. Veškerá získaná data byla následně korelována s klinickým a endoskopickým nálezem a vybranými anamnestickými údaji.

Výsledky

Histopatologický nález v bioptických vzorcích žaludeční sliznice byl v rozsahu normální sliznice až středně závažná lymfoplazmocytní gastritida. Nejčastější histopatologickou diagnózou pro tuto lokalizaci byla mírná chronická gastritida charakterizovaná převážně mírnou lymfoplazmocytní zánětlivou infiltrací v *lamina propria* sliznice, mírně zvýšeným počtem intraepiteliálních lymfocytů a absencí změn ve stavbě sliznice. V případě vyšetřených bioptátů duodenální sliznice byla zjištěna mírná až středně výrazná lymfoplazmocytní duodenitida, u jednoho pacienta kombinovaná s mírnou ložiskovou neutrofilní duodenitidou. Nejčastějšími patologickými změnami zde byly lymfoplazmocytní infiltrace *lamina propria* sliznice, zvýšený počet intraepiteliálních lymfocytů, mírná dilatace střevních krypt a hyperplazie pohárkových buněk epitelu krypt.

Histopatologickým vyšetřením přehledně barvených řezů byla dále zjištěna přítomnost spirálovitých bakterií morfologicky odpovídajících *Helicobacter* spp. ve všech vzorcích sliznice žaludku, ale v žádném vzorku sliznice duodena. Ve většině případů pozitivního záchytu šlo o vysoký stupeň kolonizace těmito bakteriemi. Při imunohistochemickém vyšetření byl *Helicobacter* spp. antigen nejčastěji lokalizován v žaludečních jamkách, dále v hleny na povrchu sliznice, méně často v lumen žaludečních žlázek a v cytoplasmě parietálních buněk. Distribuce antigenu v žaludeční sliznici odpovídala distribuci spirálovitých bakterií pozorovaných v přehledně barvených preparátech. Ve všech případech masivní kolonizace povrchu sliznice (povrchový hlen + žaludeční jamky) byla pozorována také přítomnost antigenu v lumen žaludečních žlázek a uvnitř parietálních buněk, naopak při nízkém záchytu antigenu při povrchu sliznice byla pozorována žádná nebo minimální přítomnost antigenu v hlubších částech sliznice (lumen žaludečních žlázek, parietální buňky). Ojedinele byl tento antigen pozorován také v dalších buňkách a v *lamina propria mucosae*. V duodenální sliznici bylo pozorováno pouze nepatrné množství antigenu lokalizovaného převážně uvnitř pohárkových buněk. Výsledná intenzita kolonizace určená v řezech barvených přehledným barvením a imunohistochemickou reakcí se významně nelišila, imunohistochemickou metodou ale bylo možné lépe zhodnotit přítomnost bakterií také v žaludečních jamkách, žaludečních žlázkách a intracelulárně. Speciálním barvením metodou dle Warthin-Starryho bylo možné posoudit morfologii jednotlivých bakterií. Ve vyšetřovaných vzorcích bylo detekováno několik různých morfologických typů spirálovitých bakterií lišících se délkou, tloušťkou a počtem závitů. Ve většině případů byla sliznice kolonizována více typy současně. Tyto morfologicky odlišné formy pravděpodobně představují různé druhy *Helicobacter* spp.

V dosud vyšetřených vzorcích v rámci studie prozatím nebyl prokázán vliv přítomnosti a intenzity kolonizace sliznice žaludku a duodena bakteriemi *Helicobacter* spp. na přítomnost patologických změn sliznice. Případy normálního nálezu v biopsiích žaludeční sliznice byly spojeny s masivní kolonizací *Helicobacter* spp. ve všech oddílech sliznice, a zároveň ve 2 případech středně závažné duodenitidy byla zaznamenána pouze minimální míra kolonizace těmito bakteriemi. Středně závažná gastritida byla potom spojena s masivní kolonizací sliznice.

Kultivační a PCR vyšetření na přítomnost *Helicobacter* spp. ve stěrech žaludeční a duodenální sliznice byla ve všech případech negativní. Kultivačním vyšetřením rektálního výtěru byla zjištěna přítomnost bakterií *Campylobacter* spp. a *Clostridium perfringens*. Nejčastějším kultivačním nálezem byla koinfekce těmito dvěma typy mikroorganismů. Nebyl prokázán vliv infekce těmito druhy bakterií na přítomnost a intenzitu zánětlivých lézí ve sliznici.

Tab. 1 Výsledky parazitologického, kultivačního, endoskopického a histopatologického vyšetření

Pacient č.	Parazitologické vyšetření	Kultivace - rektální výtěr	Endoskopický nálezn		Histopatologický nálezn	
			Žaludek	Duodenum	Žaludek	Duodenum
1	neg.	negativní	normální sliznice	normální sliznice	mírná LP gastritida	středně závažná LP duodenitida
2	neg.	<i>Clostridium perfringens</i>	normální sliznice	normální sliznice	mírná LP gastritida	středně závažná LP duodenitida
3	neg.	<i>Campylobacter spp.</i>	normální sliznice	normální sliznice	mírná LP gastritida	středně závažná LP duodenitida
4	neg.	<i>Clostridium perfringens</i> , <i>Campylobacter spp.</i>	normální sliznice	normální sliznice	normální	mírná LP duodenitida
5	neg.	<i>Clostridium perfringens</i>	normální sliznice	normální sliznice	mírná LP gastritida	mírná LP duodenitida
6	neg.	<i>Clostridium perfringens</i> , <i>Campylobacter spp.</i>	normální sliznice	normální sliznice	středně závažná LP gastritida	mírná LP duodenitida
7	neg.	<i>Clostridium perfringens</i> , <i>Campylobacter spp.</i>	normální sliznice	normální sliznice	normální	mírná LP duodenitida + ložiskově neutrofilní duodenitida
8	neg.	<i>Campylobacter spp.</i>	normální sliznice	normální sliznice	mírná LP gastritida	mírná LP duodenitida

Tab. 2 Kolonizace sliznic trávicího traktu bakteriemi *Helicobacter spp.* zjištěná pomocí imunohistochemie ve vztahu ke stupni zánětu

	ŽALUDEK					DUODENUM		
	Povrch sliznice	Žaludeční jamky	Lumen žaludečních žlázek	Cytoplazma parietálních buněk	Intenzita gastritidy	Povrch sliznice	Střevní krypty	Intenzita duodenitidy
1	++	+++	+	+	mírná	-	-	středně intenzivní
2	-	+	-	-	mírná	-	-	středně intenzivní
3	+	+	+	+	mírná	-	-	středně intenzivní
4	+++	+++	++	++	neg.	-	-	mírná
5	++	+++	++	+	mírná	-	-	mírná
6	+++	+++	+++	+++	středně intenzivní	-	-	mírná
7	++	+++	+++	+++	neg.	-	-	mírná + ložiskově neutrofilní
8	+++	+++	+++	+++	mírná	-	-	mírná

- Absence antigenu, + antigen v <5% žaludečních jamek/ žaludečních žláz/ parietálních buněk, ++ antigen v 5 – 50% žaludečních jamek/ žaludečních žláz/ parietálních buněk, +++ antigen v 50 a více % žaludečních jamek/ žaludečních žláz/ parietálních buněk

Závěr

Kolonizace žaludeční sliznice psů nevykazujících klinické příznaky onemocnění gastrointestinálního traktu bakteriemi *Helicobacter* spp. se zdá být běžná, s hojnou přítomností bakterií nejen v povrchovém hlenu, ale také v lumen žaludečních žlázek a uvnitř parietálních buněk těchto žláz. Určitý stupeň zánětlivých změn jak v žaludeční, tak v duodenální sliznici je u těchto pacientů také zřejmě standardním nálezem, možný vliv infekce bakteriemi rodu *Helicobacter* spp. prozatím nelze jednoznačně potvrdit ani vyloučit. Zvolená metoda odběru vzorků pomocí stěru povrchu sliznice cytologickým kartáčkem se jeví jako méně vhodná pro kultivační a molekulárně biologický průkaz infekce rodem *Helicobacter*, což bude zohledněno při modifikaci metodiky odběru materiálu pro kultivační a PCR vyšetření od dalších pacientů v rámci náplně studie, která bude pokračovat i po ukončení projektu.

Seznam literatury

1. CASTIGLIONI, V., et al. Enterohepatic *Helicobacter* spp. in colonic biopsies of dogs: molecular, histopathological and immunohistochemical investigations. *Veterinary microbiology*, 2012, 159.1-2: 107-114.
2. RECORDATI, Camilla, et al. Spatial distribution of *Helicobacter* spp. in the gastrointestinal tract of dogs. *Helicobacter*, 2009, 14.3: 180-191.
3. KUBOTA-AIZAWA, Sanae, et al. Epidemiological study of gastric *Helicobacter* spp. in dogs with gastrointestinal disease in Japan and diversity of *Helicobacter heilmannii sensu stricto*. *The Veterinary Journal*, 2017, 225: 56-62.
4. ALLENSPACH, K., et al. Chronic enteropathies in dogs: evaluation of risk factors for negative outcome. *Journal of veterinary internal medicine*, 2007, 21.4: 700-708.
5. DAY, M. J., et al. Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: a report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. *Journal of Comparative Pathology*, 2008, 138: S1-S43.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 108/2021/FVL

Zoonotický potenciál *Clostridioides difficile*: izolace a charakterizace kmenů ze psů a koček

Martina Masaříková, Eliška Sýkorová, Jana Václavíková, Martin Hošek

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

Úvod

Clostridioides difficile (dříve *Clostridium difficile*), je nejvýznamnějším původcem život ohrožujících infekcí tlustého střeva člověka, které v zemích Evropské unie způsobují ročně více než 8000 úmrtí. Klostridiové kolitidy byly donedávna považovány za onemocnění převážně nozokomiálního původu. V posledních letech však došlo k neobvykle vysokému nárůstu počtu komunitních infekcí, což iniciovalo hledání alternativních zdrojů klostridií u lidí bez historie předchozí hospitalizace (Hernandez et al., 2020). *C. difficile* bývá izolováno z trávícího traktu zdravých hospodářsky i společensky chovaných zvířat a u některých druhů může sporadicky vyvolávat i průjmy. Identifikace toxinogenních kmenů *C. difficile* ve střevě hospodářských zvířat, které byly geneticky příbuzné izolátům humánní provenience, vedla k formulování hypotézy o jejich možném zoonotickém potenciálu a zavlečení do potravního řetězce člověka kontaminovanými surovinami živočišného původu (Rodriguez-Palacios et al., 2013). Kvůli nízké prevalenci *C. difficile* v mase a chybějícím důkazům o jeho přenosu alimentární cestou však byla tato možnost jako jediného vysvětlení nárůstu komunitních infekcí zpochybněna. Proto se hledání dalších zdrojů infekce následně zaměřilo také na společensky chovaná malá zvířata. Tento krok logicky vycházel z předpokladu, že lidé jsou v mnohem užším kontaktu se psy a kočkami než s hospodářskými zvířaty. A co je nejdůležitější, bylo zjištěno, že až 90 % zdravých štěňat (a pravděpodobně i koťat) do stáří deseti týdnů vylučuje trusem *C. difficile*, přičemž více než polovina těchto izolátů může být producenty toxinů (Perrin et al., 1993). V patogenezi klostridiových kolitid člověka i zvířat hraje významnou roli dysbióza střevní mikroflóry spojená s předchozí antibiotickou terapií a navíc se při léčbě onemocnění malých zvířat často používají totožné antimikrobiální substance. Proto existuje u zvířat i reálné riziko selektování rezistentních klonů *C. difficile*, které mohou kolonizovat člověka a následně u rizikových skupin vyvolávat rekurentní až fatální střevní infekce. V současnosti se tedy za hlavní zdroj komunitních klostridiových kolitid člověka zvažují kmeny kolonizující střeva společensky chovaných zvířat. K potvrzení této hypotézy však chybí dostatečné množství údajů vzešlých z podrobné molekulární charakterizace genomu psích a kočičích izolátů *C. difficile*. Cílem naší práce tedy bylo ověřit, jak velké zdravotní riziko kvůli možné kolonizaci toxinogenními kmeny *C. difficile* pro člověka pes a kočka skutečně představují. Dílčími cíli bylo stanovit prevalenci *C. difficile* u vybraných skupin psů a koček, dále mezi získanými izoláty identifikovat toxinogenní kmeny metodou PCR, stanovit u nich citlivost k antibiotikům volby a sekvenováním posoudit jejich epidemiologickou příbuznost k *C. difficile* dříve izolovaným z humánního materiálu.

Materiál a metodika

Pro účely izolace *C. difficile* byly odebrány rektální výtěry a výkaly psů a koček ze šesti definovaných skupin, které zahrnovaly jak zdravé, tak nemocné jedince různých věkových kategorií. První skupinu tvořili pacienti JIP Kliniky chorob psů a koček FVL VFU Brno, druhou skupinu psi Policie ČR, třetí skupinu psi a kočky studentů VFU Brno, čtvrtou skupinu kočky z útulku pro opuštěná zvířata, pátou skupinu pacienti vybraných brněnských veterinárních ordinací a šestou skupinu štěňata z chovné stanice Policie ČR. Před vlastním sběrem biologického materiálu byla získána anamnéza se zaměřením na onemocnění gastrointestinálního traktu zvířete a historie jejich antibiotické terapie v posledním roce. Pro kultivaci vzorků, identifikaci a charakterizaci získaných izolátů byl použit dříve zavedený postup (Masaříková et al., 2020). Kultivace vzorků sestávala z pomnožení odebraného materiálu v selektivním bujónu s taurocholátem sodným v anaerobním boxu při 37 °C po dobu 7 dnů, následovalo opracování pomnoženého vzorku etanolem a kultivace sedimentu na selektivním agaru ChromID™ *C. difficile* (BioMérieux, Francie). Suspektní kolonie jsme druhově identifikovali na MALDI Biotyperu (Bruker Daltonics, Německo). Metodou PCR byly u čistých kultur *C. difficile* zjišťovány geny kódující toxiny A (*tcdA*), B (*tcdB*) a binární toxin (*cdtA/cdtB*). U toxinogenních izolátů následovalo stanovení citlivosti k amoxicilinu, ciprofloxacinu, klindamycinu, erytromycinu, metronidazolu, moxifloxacinu, tetracyklinu a vankomycinu E-testem na Brucella agaru (Oxoid, Velká Británie) suplementovaném heminem a vitamínem K. Takto charakterizované izoláty budou na začátku roku 2022 ve spolupráci s NRL pro *C. difficile* (2. LF KU, FN Motol, Praha) podrobeny stanovení ribotypů a sekvenčních typů. Výsledky typizace animálních izolátů budou porovnány s humánními izoláty, což umožní zhodnotit jejich epidemiologickou závažnost a případně stanovit preventivní opatření k ochraně zdraví člověka.

Výsledky

V rámci plnění stanovených cílů projektu bylo nashromážděno celkem 251 vzorků rektálních výtěrů a trusu zvířat šesti definovaných skupin: 1) od pacientů JIP Kliniky chorob psů a koček FVL VETUNI Brno (n = 56), 2) psů Policie ČR (n = 56), 3) od zvířat studentů VETUNI Brno (n = 50), 4) koček chovaných v útulku pro opuštěná zvířata (n = 23), 5) od zvířat léčených v soukromé veterinární ordinaci (n = 33) a od štěňat z chovné stanice Policie ČR (n = 33). Anaerobní kultivací jsme získali 33 izolátů *C. difficile* (13,1 %), největší prevalenci (10/23; 43,5 %) vykazaly vzorky trusu koček chovaných v útulku, druhou nejvyšší prevalenci měly vzorky pacientů JIP VETUNI Brno (10/56; 17,9 %). Z rektálních výtěrů policejních štěňat jsme získali 3 izoláty (9,1 %), z rektálních výtěrů psů a koček studentů naší univerzity 4 izoláty (8,0 %), od policejních psů 4 izoláty (7,1 %) a z výtěrů pacientů soukromé veterinární ordinace 2 izoláty (6,1 %). Protože k poškození střeva

dochází až účinkem toxinů *C. difficile* (toxin A, B a binární toxin), které produkuje jen určité procento kmenů, zaměřili jsme se na identifikaci tzv. toxinogenních izolátů *C. difficile* průkazem genů, které tyto toxiny kódují, tedy *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* a *cdtB* metodou PCR. Tyto geny jsme potvrdili u 21 ze všech 33 izolátů (63,6 %), vždy šlo o geny *tcdA* a *tcdB*. Pouze u jednoho izolátu z rektálního výtěru policejního psa jsme prokázali navíc také geny kódující binární toxin *C. difficile* *cdtA* a *cdtB*. Všechny izoláty získané od koček z útulku (n = 10), od pacientů soukromé veterinární ordinace (n = 2) a z policejních štěňat (n = 3) byly nositeli genů pro toxiny, u pacientů JIP VETUNI Brno to byly 4 izoláty (40 %) a po jednom izolátu (25 %) z policejních psů a zvířat našich studentů. U 21 izolátů *C. difficile* produkujících toxiny jsme následně přikročili ke stanovení citlivosti k osmi antimikrobiálním látkám (amoxicilin, klindamycin, ciprofloxacin, erytromycin, metronidazol, moxifloxacin, tetracyklin, vankomycin) E-testem na brucella agaru (Oxoid, VB) s přidavkem heminu a vitamínu K. Rezistenci alespoň k jednomu antibiotiku vykazalo 18 izolátů (85,7 %), nejčastěji šlo o rezistenci k ciprofloxacinu (u 17 izolátů), a to buď pouze k této substanci (12 izolátů), nebo v kombinaci s rezistencí ještě k další antimikrobiální látce (4 izoláty i ke klindamycinu, 1 i k moxifloxacinu), jeden izolát byl rezistentní pouze ke klindamycinu. Významným poznatkem je, že žádný z našich izolátů neprokázal rezistenci k antibiotikům volby v léčbě humánních pseudomembranózních kolitid vyvolaných toxinogenními kmeny *C. difficile*, což jsou metronidazol a vankomycin. V rámci jednotlivých skupin jsme rezistenci zaznamenali u sta procent toxinogenních *C. difficile* izolovaných ze zvířat studentů VETUNI Brno (1/1), pacientů soukromé veterinární ordinace (2/2) a z policejních štěňat (3/3). Izoláty z trusu koček chovaných v útulku byly rezistentní v 90 procentech (9/10) a izoláty z pacientů JIP VETUNI Brno v 75 procentech (3/4). Jediný toxinogenní izolát získaný z výtěru policejního psa byl citlivý ke všem testovaným antimikrobikům. Abychom naplnili hlavní cíl předloženého projektu, tedy ověřili, zda mohou společensky chovaná malá zvířata představovat hledaný zdroj infekce figurující ve zvyšující se prevalenci komunitních klostridiových kolitid člověka, provedeme podrobnou molekulární analýzu našich izolátů metodou celogenomového sekvenování. Analýza získaných dat proběhne na spolupracujícím pracovišti Národní referenční laboratoře pro klostridia 2. LF KU, FN Motol v Praze. Definitivní výsledky budou publikovány v zahraničním vědeckém časopise s IF.

Závěr

Ze souboru 251 vzorků rektálních výtěrů a trusu psů a koček chovaných v České republice jsme vykultivovali 33 bakterií druhu *C. difficile*, nejvyšší prevalence (43,5 %) dosáhla skupina koček žijících v útulku pro opuštěná zvířata. Geny kódující toxiny *C. difficile* (*tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB*) jsme za použití metody PCR prokázali u 21 (63,6 %) izolátů. Osmnáct toxinogenních izolátů potom vykazovalo rezistenci alespoň k jednomu z osmi testovaných antibiotik. Právě toxinogenní kmeny *C. difficile* figurují v etiologii onemocnění gastrointestinálního traktu člověka a společensky chovaná zvířata by mohla za určitých okolností

představovat zdroj infekce pro své majitele. Podrobnou molekulární analýzou genomu našich izolátů a jejich porovnáním s *C. difficile* dříve izolovanými z nemocných lidí chceme přispět k objasnění role animálních izolátů *C. difficile* v etiologii klostridiových kolitid člověka.

Seznam literatury

- 1) Hernandez, BG, Vinithakumari, AA, Sponseller, B, et al. Prevalence, Colonization, Epidemiology, and Public Health Significance of *Clostridioides difficile* in Companion Animals. *Front Vet Sci*, 2020, 7:512551.
- 2) Rodriguez-Palacios, A, Borgmann, S, Kline, TR, et al. *Clostridium difficile* in foods and animals: history and measures to reduce exposure. *Anim Health Res Rev*, 2013, 14(1):11-29.
- 3) Perrin, J, Buogo, C, Gallusser, A. Intestinal carriage of *Clostridium difficile* in neonate dogs. *Zentralb Veterinarmed B*, 1993, 40(3):222-226.
- 4) Masarikova, M, Simkova, I, Plesko, M, et al. [The Colonisation of Calves in Czech Large-Scale Dairy Farms by Clonally-Related *Clostridioides difficile* of the Sequence Type 11 Represented by Ribotypes 033 and 126](#). *Microorganisms*, 2020, 8(6):901.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 105/2021/FVL

Monitorování cytofagózy lososovitých ryb kvantifikací *Flavobacterium psychrophilum* ve vodě metodou qPCR

Věra Nováková, Alois Čížek

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

Úvod

Flavobacterium psychrophilum je celosvětově rozšířeným původcem onemocnění cytofagóza lososovitých (Bacterial Cold Water Disease) a anemický syndrom plůdku pstruha duhového (Rainbow Trout Fry Syndrome) (1). Onemocnění postihuje zejména chovy ryb žijících ve studených sladkých vodách, nejčastěji pstruhy duhové, a ekonomické ztráty způsobené úhynem, sníženými přírůstky i terapií jsou vysoké. V závislosti na formě onemocnění dosahuje mortalita 50-60 % (2), v krajních případech až 90 % (3). Nemoc se mezi jedinci šíří horizontálně (4) a nejvýznamnějším zdrojem infekce jsou nemocní a uhynulí jedinci, kteří vylučují až 10^8 bakterií za hodinu do svého okolí po dobu až několika měsíců (5). Zdrojem může být i samotná voda, v níž může bakterie bez hostitele přežít a množit se i několik let (4). Protože vakcína nebyla dosud vyvinuta a alternativní metody terapie jsou prozatím pouze předmětem výzkumu (6, 7, 8) spočívá jediná účinná terapie v aplikaci antimikrobik (9).

Cílem této práce bylo ověřit metodu qPCR vzorků vody odebraných z intenzivních chovů lososovitých ryb jako účinnou metodu monitoringu cytofagózy a umožnit tak zhodnotit riziko rozvoje cytofagózy a zavést včas účinná opatření.

Materiál a metodika

Metodika byla vyzkoušena a upravena na základě vyšetření uměle kontaminovaných vzorků. Sbírkový kmen *F. psychrophilum* byl kultivován na Tryptone Yeast Extract Salts (TYES) agaru při 17 °C 72 hodin. Poté byla část kultury odebrána a rozmíchána v PBS. Desítkovým ředěním bylo vytvořeno 5 sériových ředění, které byly podle níže popsané metodiky zpracované a analyzované metodou qPCR. Současně z každého ředění bylo vyočkováno 100 µl na TYES agar a kultivováno při 17 °C 72 hodin. Výsledky qPCR byly porovnány s výsledky kvantitativní kultivace.

Terénní vzorky byly odebírány během jarního období (březen-duben 2021), kdy vzhledem k příznivým teplotním podmínkám dochází nejčastěji k vypuknutí cytofagózy v chovech. Do sterilních odběrových nádob bylo odebráno 200 ml vody z navštívených chovů lososovitých ryb. Současně při odběru byla odečtena hodnota oxygenace, teploty a pH vody. Voda byla bez zbytečného prodlení odvezena v izotermickém boxu na Ústav infekčních chorob a mikrobiologie a ihned zpracována. 100 μ l vody bylo roztěrem naočkováno na TYES agar a vzorky byly inkubovány až 5 dní při 17 °C. Kolonie podezřelé morfologie byly identifikovány metodou MALDI TOF a PCR s využitím primerů pro amplifikaci regionu v 16S rRNA, jak popsal Toyama a kol. (10). Pro monitoring cytofagózy metodou qPCR bylo 50 ml vody přefiltrováno filtračním systémem Glass Microanalysis Filter Holder s filtry o velikosti 0,2 μ m. Z filtru byla okamžitě izolována DNA kitem Nucleospin Tissue Kit (Macherey-Nagel) a zamražena při -20 °C. Dále byly v chovech odebírány vzorky čerstvě uhynulých nebo nemocných ryb, z nichž byla získána slezina, rozmělněna sterilním tloučkem a 25 mg homogenizované tkáně bylo použito pro izolaci DNA. DNA vzorků vod i slezin byla použita pro analýzu PCR a qPCR. Klasická PCR reakce byla provedena s primery navrženými dle Toyama a kol. (10). Reakční směs byla namíchána z 10 μ l PPP Master Mix (Top Bio s.r.o.), 7 μ l PCR Ultra H₂O (Top Bio s.r.o.), 1 μ l od každého primeru a 1 μ l testované DNA do celkového objemu 20 μ l. Každá reakce byla doplněna pozitivní a negativní kontrolou. Reakce probíhala v TProfessional TRIO PCR Thermocycleru (Biometra) a skládala se z úvodního přehřátí 94 °C po dobu 4 minut, načez následovalo 40 cyklů skládajících se z denaturace DNA při 94 °C po 45 sekund, nasednutí primerů při 52,5 °C po 60 sekund, elongace při 72 °C po 60 sekund a na závěr elongace při 72 °C po dobu 5 minut. Kvantitativní PCR byla prováděna systémem LightCycler® 480 (Roche). Reakční směs byla namíchána z 5 μ l SYBR Green mix (Roche), 1 μ l od každého primeru, 1 μ l PCR H₂O a 2 μ l DNA do celkového objemu 10 μ l. Primery byly navrženy dle Strepparava a kol. (11). Směs byla na úvod přehřátá na 95 °C 15 minut, následovalo 40 cyklů denaturace při 95 °C, 20 sekund, nasednutí primerů při 60 °C, 30 sekund, elongace při 72 °C, 30 sekund a na závěr proběhla elongace při 72 °C po dobu 5 minut. Každý vzorek byl testován minimálně v duplikátech a každá reakce byla doplněna negativní a pozitivní kontrolou. Kalkulace byla provedena na základě regresní křivky vytvořené ze sériově naředěných standardů o známé koncentraci, které byly měřeny souběžně s každou reakcí.

Výsledky

Při testování účinnosti metodiky byly uměle kontaminované vzorky vod současně vyšetřeny kultivační metodou a metodou qPCR. Při prvních pokusech docházelo k falešně negativním

výsledkům qPCR, ačkoli kultivačně byla přítomnost *F. psychrophilum* potvrzena. Proto byly provedeny změny v metodice, zejména ve způsobu izolace bakteriálních buněk. V tabulce jsou uvedeny hodnoty naměřené kultivační metodou a metodou qPCR.

Tabulka 1: Porovnání účinnosti kultivační metody a qPCR

vzorek	kultivační metoda (KTJ/ml)	qPCR (kopie/ml)
0	164 000	18 120 000
1	14 400	3 120 000
2	2 470	504 000
3	440	107 160
4	40	40 680

Metoda qPCR je mnohem citlivější a není závislá na přítomnosti živých bakterií, na rozdíl od kultivační metody stanovení koncentrace bakterií. *Flavobacterium psychrophilum* je na kultivaci náročnější bakterie, velké množství buněk kultivaci nepřežije. Z těchto důvodů byly analýzou qPCR zjištěny výrazně vyšší hodnoty v porovnání s metodou kultivační.

Pro projekt bylo odebráno celkem 15 terénních vzorků vod z 12 různých lokalit. Kultivačně bylo *F. psychrophilum* prokázáno ve vzorcích 1, 2, 9, 11, 15. Analýzou PCR a qPCR bylo dále zjištěno *F. psychrophilum* také ve vzorku 6.

Tabulka 2: Naměřené hodnoty terénních vzorků

vzorek	<i>F. psychrophilum</i> (kopie/ml)	Teplota (°C)	pH	oxygenace (%)
1	3840	3	7,3	115
2	6840	6,4	6,6	96,5
3	Negativní	3,2	6,8	98
4	Negativní	5	6,92	98,7
5	Negativní	5	7,5	95
6	2304	8,5	7,8	85
7	Negativní	9,5	7,1	95
8	Negativní	6,3	7,2	95
9	18000	11	7,5	85
10	Negativní	10	7,1	65
11	19200	N	N	N
12	Negativní	N	N	N
13	Negativní	12	N	90
14	Negativní	6	N	98
15	26400	N	N	N

* N = hodnota nebyla změřena

Dále byly současně se vzorky vody analyzovány sleziny ryb z daného chovu. Pouze u ryb z lokality 15 bylo prokázáno *F. psychrophilum*; v tomto chovu se také vyskytovaly klinické příznaky

cytofagózy. V tomto chovu byla zjištěna nejvyšší naměřená koncentrace *F. psychrophilum* ve vodě, toto měření potvrzuje, že koncentrace patogenu ve vodě souvisí s rozvojem cytofagózy.

Závěr

Metoda byla úspěšně ověřena měřením uměle kontaminovaných vzorků i terénních vzorků zatížených doprovodnou mikroflórou. Pro statistické vyhodnocení vztahu mezi koncentrací bakteriálních buněk ve vodě, přítomností/koncentrací bakteriálních buněk ve slezině a sledovanými vlastnostmi vody bude potřeba získat a analyzovat další vzorky.

Seznam literatury

- 1) DUCHAUD, E.; BOUSSAHA, M.; LOUX, V.; BERNARDET, J.F.; MICHEL, C.; KEROUAULT, B.; MONDOT, S.; NICOLAS, P.; BOSSY, R.; CARON, C.; BESSIERES, P.: Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(7), 763-769.
- 2) DALSGAARD, I.; BRUUN, M.S.; ANDERSEN, J.H.; MADSEN, L.: Recent knowledge of *Flavobacterium psychrophilum* in Denmark. In 2nd Conference on Members of the Genus *Flavobacterium*, 2009
- 3) WOO, P.T.; CIPRIANO, R.C.: Fish viruses and bacteria: pathobiology and protection. CABI, 2017, ISBN 978-1780647784.
- 4) BARNES, M.E.; BROWN, M.L.: A review of *Flavobacterium psychrophilum* biology, clinical signs, and bacterial cold water disease prevention and treatment. *Open Fish Science Journal*, 2011, 4, 40.
- 5) MADETOJA, J.; NYMAN, P.; WIKLUND, T.: *Flavobacterium psychrophilum*, invasion into and shedding by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 43(1), 27-38.
- 6) HOARE, R.; JUNG, S.; NGO T. P. H.; BARTIE K. L.; THOMPSON K. D.; ADAMS A.: Efficacy of polyvalent injectable vaccine against *Flavobacterium psychrophilum* administered to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). *Journal of fish diseases*, 2019, 42.2: 229-236
- 7) DONATI, V. L.; DALSGAARD, I.; SUNDELL, K.; CASTILLO, D.; ER-RAFIK, M.; CLARK, J.; WIKLUND, T.; MIDDELBOE, M.; MADSEN, L.: Phage-Mediated Control of *Flavobacterium psychrophilum* in Aquaculture: In vivo Experiments to Compare Delivery Methods. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12:438
- 8) TAKEUCHI, M.; FUJIWARA-NAGATA, E.; KATAYAMA, T.; SUETAKE, H.: Skin bacteria of rainbow trout antagonistic to the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Scientific Reports*, 2021, 11.1, 1-11.
- 9) CASTILLO, D.; HIGUERA, G.; VILLA, M.; MIDDELBOE, M.; DALSGAARD, I.; MADSEN, L.; ESPEJO, R.T.: Diversity of *Flavobacterium psychrophilum* and the potential use of its phages for protection against bacterial cold water disease in salmonids. *Journal of fish diseases*, 2012, 35(3), 193-201.

- 10) TOYAMA, T., KITA-TSUKAMOTO, K., WAKABAYASHI, H.: Identification of *Cytophaga psychrophila* by PCR targeted 16S ribosomal RNA. *Fish Pathology*, 1994, 29(4), 271-275.
- 11) STREPPARAVA, N.; WAHLI, T.; SEGNER, H.; PETRINI, O.: Detection and quantification of *Flavobacterium psychrophilum* in water and fish tissue samples by quantitative real time PCR. *BMC microbiology*, 2014, 14.1: 1-10.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 107/2021/FVL

Stanovení mykobiomu v dolních cestách dýchacích u koní s equinním astmatem

Libor Podojil, Markéta Sedlinská, Zuzana Drábková, Štěpán Bodeček,

Sabina Pospíšilová, Dára Brabcová

Klinika chorob koní, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno

Úvod

Těžká forma equiního astmatu je častou příčinou intolerance zátěže sportovních koní středního věku a je jednou z hlavních příčin ukončení sportovní kariéry koně. Mírné a střední astma postihuje koně v mladším věku a bývá příčinou snížené výkonnosti. Při astmatu dochází k rozvoji zánětu bronchiální sliznice, který je provázen bronchokonstrikcí, zvýšenou produkcí hlenu a zesílením stěny dýchacích cest. Mezi hlavní příčiny vzniku astmatu patří vysoká koncentrace prachových částic ve vzduchu v uzavřených stájích, tj. prach, endotoxin, plísňe a jejich spóry, ultramalé částice a dráždivé plyny (1). Léčba astmatu sestává z kombinace snížení prašnosti prostředí a podávání léků. Z léků jsou podávány především kortikosteroidy (2), mukolytika, bronchodilatancia a často také antibiotika. Molekulárními metodami bylo zjištěno, že bakteriální osídlení plic se liší u astmatických koní v remisi a exacerbaci, a že se jedná spíše o následek než příčinu nemoci, proto podávání antibiotik představuje nadužívání této skupiny léků. Fungální osídlení plic bylo popsáno jen u koní s mírnou formou astmatu (3), u koní s těžkou formou astmatu zatím popsáno nebylo. Patogenita plísní tj. jejich alergenní, toxické a infekční účinky, byly již popsány u lidí s astmatem a cílená protiplísňová léčba snížila klinické příznaky až u třetiny těchto pacientů (4). U koní s mírnější formou astmatu byly plísňe vykultivovány v 55 % případů (3). Na cytologickém preparátu z hlenu z průdušnice však byly pozorovány v 79 % případů (3). Cílem této práce bylo stanovit mykobiom v dolních cestách dýchacích u koní s koňským astmatem moderními laboratorními metodami, konkrétně metodou molekulární mikrobiologie - next generation sequencing.

Materiál a metodika

U 54 pacientů přijatých k ambulantnímu ošetření nebo hospitalizaci na kliniku chorob koní (KCHK) bylo provedeno následující vyšetření: 1) Anamnéza: - věk, pohlaví, plemeno, zoohygienické podmínky ustájení (kvalita ovzduší ve stáji, typ budovy, způsob krmení koní - množství a kvalita sena, máčení/napařování, krmení senáží, typ podestýlky – sláma/piliny,

režim ustájení koní a doba pobytu ve stáji/na pastvině. 2) Klinické vyš.: výživný stav, vědomí, vyšetření kardiovaskulárního a dýchacího systému, nálezy na jiných orgánových systémech. 3) Odběr krve na hematologické vyšetření a případně na stanovení parametru akutního zánětu SAA. 4) Endoskopické vyšetření horních cest dýchacích a zobrazení stupně množství a charakteru hlenu v průdušnici (stupeň 1-5) a odběr vzorku tracheálního hlenu pro mikrobiologické vyšetření v laboratoři VFU Brno a cytologické vyšetření provedené na Klinice chorob koní se zdůrazněním na procentuální zastoupení zánětlivých buněk a přítomností plísňových částic (spóry, konidie, konidiofory, hyfy a mycelia atd). 5) Odběr vzorku broncho-alveolární laváže (BAL) sterilní odběrovou soupravou a následné cytologické vyšetření části směsného vzorku. Vzorky transendoskopického tracheálního výplašku (TW) byly obarveny (Hemakolor) a sedimentační vzorek BAL obarven (May-Gruenwald/Giemsma-Romanowski). Vzorek BAL byl z poslední frakce výplachu plic odebrán do sterilní injekční dvacetimililitrové stříkačky, z níž bylo pět mililitrů přetaženo do pětimililitrové injekční stříkačky a ta byla ihned zamrazena na - 80°C, dokud nebylo nasbíráno větší množství vzorků, a ty poté společně odeslány na vyšetření polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) molekulárně mikrobiologickou metodu Next generation sequencing (NGS) a kvantitativní metodu FungiMultiPlex do laboratoře Tilia laboratories. Záchytnost PCR metodou byla porovnána s klasickou kultivační metodou. Získané výsledky byly zpracovány a statisticky vyhodnoceny.

Výsledky

Celkem bylo vyšetřeno 54 koňských pacientů předvedených s dýchacími obtížemi, z toho bylo diagnostikováno 48x koňské astma (88,9 %), 1x pneumonie (1,85 %), 2x zátěží vyvolané krvácení (EIPH) (3,7%), 1x pharyngeální lymfoidní hyperplazie (PLH) (1,85 %), 2x dorsální dislokace měkkého patra (DDSP) 3,7 %. Do Tilia laboratoře bylo odesláno 40 vzorků BAL zamrazených na - 80°C se záměrem vyšetřit tyto vzorky molekulárně mikrobiologickou metodou NGS s očekáváním stanovení mykobiomu. Bohužel při vyšetření mykobiomu v prvních šestnácti vzorcích metodou NGS došlo k sekvenování úplně prázdných produktů, takže se nelze vyjádřit k nálezům pozitivním či negativním. Mohlo to být z části i proto, že se jednalo o vzorky zamrazené na -80°C, kdy takto nařaděný materiál pravděpodobněji podlehne určité degradaci, která je posléze značným problémem pro NGS. Je to ale cenná zkušenost, která byla tímto vyšetřením získána. Proto bylo rozhodnuto dalších 24 vzorků na mykobiom metodou NGS nevyšetřovat. Při vyšetření mykobiomu metodou FungiMultiPlex, kvantitativní multiplexní Real-Time PCR bylo vyšetřeno 40 vzorků BAL a z toho 18 vzorků bylo

negativních a 22 vzorků pozitivních. Vzorky BAL byly odebírány z posledních frakcí výplašku, proto i kvantify hub, které byly naměřeny, byly nízké, ale relevantní vzhledem k charakteru materiálu (vysoké naředění). Častým nálezem (23x) je *Aspergillus spp. non-fumigatus*; blíže neurčený, dvakrát byla nalezena *Pneumocystis jiroveci*, dvakrát *Candida parapsilosis* jedenkrát *Candida spp.* Klasickou kultivační metodou bylo vyšetřeno 19 vzorků BAL: 8 vzorků bylo bez nálezu, 11 vzorků bylo pozitivních. *Aspergillus niger* byl ve vzorcích 6x, *Aspergillus fumigatus* 3x, *Aspergillus parasiticus* 5x, *Aspergillus flavus* 1x. Jedenkrát byly zjištěny kvasinky *Candida sp.* Devětkrát bylo provedeno současně vyšetření klasickou kultivační metodou a kvantitativní metodou (FungiMultiPlex): v 6ti případech se výsledek shodoval (1x bez nálezu, 5x pozitivní) a ve 3 případech se výsledek lišil (2x byl klasickou metodou bez nálezu a multiplexní Real-Time PCR byl pozitivní, 1x byl klasickou kultivací pozitivní a FungiMultiPlex metodou PCR byl negativní) viz. následující Tabulka.

Číslo vzorku	Stanovená diagnóza	klasická kultivační metoda	(FungiMultiPlex), kvantitativní multiplexní Real-Time PCR
1.	Pneumonie	<i>Mycobacterium</i> (specifikováno jako saprofytické mykobakterie)	<i>Aspergillus fumigatus</i> - pozitivní, s náloží mikroorganismu 1×10^4 / ml vzorku - výrazně, <i>Aspergillus spp.</i> - pozitivní, s náloží mikroorganismu 1×10^4 / ml vzorku - výrazně
2.	Závažné astma	<i>Aspergillus niger</i> (++++)	<i>Aspergillus spp.</i> - pozitivní, s náloží mikroorganismu 3×10^2 / ml vzorku - nenápadně
3.	Mírné astma	<i>Aspergillus fumigatus</i> (+) <i>Aspergillus parasiticus</i> (+)	<i>Aspergillus spp.</i> - pozitivní, s náloží mikroorganismu 2×10^2 / ml vzorku - nenápadně
4.	Střední astma	<i>Aspergillus fumigatus</i> (++) <i>Aspergillus niger</i> (+) <i>Aspergillus parasiticus</i> (+++)	<i>Aspergillus spp.</i> - pozitivní, s náloží mikroorganismu 3×10^2 / ml vzorku - nenápadně
5.	Mírné astma	<i>Aspergillus niger</i> (++++)	negativní
6.	Závažné astma	<i>Aspergillus flavus</i> (+), <i>Aspergillus niger</i> (+)	<i>Aspergillus spp.</i> - pozitivní, s náloží mikroorganismu 1×10^3 / ml vzorku - mírně, <i>Aspergillus</i>

			<i>fumigatus</i> - pozitivní, s náloží mikroorganismu 2×10^2 / ml vzorku - nenápadně <i>Pneumocystis jiroveci</i> - pozitivní, s náloží mikroorganismu 5×10^2 / ml vzorku - nenápadně
7.	Střední astma	bez nálezu	negativní
8.	Střední astma	<i>Aspergillus niger</i> (+)	<i>Aspergillus spp.</i> - pozitivní, s náloží mikroorganismu 2×10^2 / ml vzorku - nenápadně
9.	Závažné astma	bez nálezu	<i>Aspergillus spp.</i> - pozitivní, s náloží mikroorganismu 3×10^2 / ml vzorku - nenápadně

Závěr

Vhodným vyšetřením na přítomnost hub v bronchoalveolárních lavážích je klasická kultivační metoda a kvantitativní metoda (FungiMultiPlex) – multiplexní Real-Time PCR. Metoda PCR – NGS (18S rDNA identity) není vhodná z důvodů sekvenování úplně prázdných produktů, tudíž se nelze vyjádřit k nálezům pozitivním či negativním. Koňské astma se vyskytlo u 88,9 % pacientů předvedených na KCHK s dýchacími potížemi.

Seznam Literatury:

- 1) BOND S.L.; Workentine M.; Hundt J.; Gilkerson J.R.; Léguillette R.: Effects of nebulized dexamethasone on the respiratory microbiota and mycobiota and relative equine herpesvirus-1, 2, 4, 5 in an equine model of asthma. Journal of Veterinary Internal Medicine. (2019). (DOI: 10.1111/jvim.15671).
- 2) Bond S.L.; Timsit E.; Workentine M.; Alexander T.; Léguillette R.: Upper and lower respiratory tract microbiota in horses: bacterial communities associated with health and mild asthma (inflammatory airway disease) and effects of dexamethasone. BMC Microbiology (2017). (17) 184

- 3) Dauvillier J.; ter Woort F.; van Erck-Westergren E.: Fungi in respiratory samples of horses with inflammatory airway disease. *Journal of veterinary internal medicine* (2019). (33), 968-975.
- 4) Rick E.M.; Woolnough K.; Pashley CH.; Wardlaw AJ.: Allergic Fungal Airway Disease. *J Investig Allergol Clin Immunol* (2016); Vol. 26(6): 344-354 doi: 10.18176/jiaci.0122

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 113/2021/FVL

Monitoring akutního poškození ledvin u koní léčených suxibuzonem

Zuzana Drábková, Karolína Vorálková, Andrea Kopecká

Klinika chorob koní, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno

Úvod

Suxibuzon (registrovaný pro použití u koní v přípravku Danilon Equidos) je hojně využívané nesteroidní antiflogistikum (NSAID) sloužící k léčbě bolesti a zánětu spojených s muskuloskeletálními poruchami u koní (např. osteoartróza, burzitida, laminitida) a se zánětem měkkých tkání (např. trauma, korneální ulcerace, uveitida). Účinná látka suxibuzon se v játrech přeměňuje na fenylbutazon, oxyfenbutazon a γ -hydroxyfenylbutazon.

Tato léčiva působí na principu blokace enzymu cyklooxygenázy (COX), což zajišťuje protizánětlivé, antipyretické a analgetické účinky. Při používání nesteroidních antiflogistik hrozí ale i nežádoucí účinky mezi které patří mj. akutní poškození ledvin (AKI; acute kidney injury) (1).

Akutní poškození ledvin může vést k narušení acidobazického statusu, hospodaření s minerály a vodou a narušení homeostázy v těle pacienta. Závažné poškození může vyústit v akutní selhání ledvin, které se projevuje oligurií až anurií, anorexií, iontovou dysbalancí, azotemií, v těžkých případech až uremickým syndromem. Akutní onemocnění ledvin (AKD; acute kidney disease) může časem vést k chronickému onemocnění ledvin (CKD; chronic kidney disease), které má špatnou prognózu (2). Proto je velmi důležité stav ledvin během léčby monitorovat a těmto komplikacím předcházet.

V současné době je trendem ke sledování činnosti ledvin využít symetrický dimethylarginin (SDMA), což je parametr funkčního poškození ledvin, namísto kreatininu. SDMA je více senzitivní a jeho plasmatická hladina není tak ovlivněna vedlejšími faktory jako množstvím svalů, krměním či věkem (3,4).

Druhým velice užitečným a citlivým markerem je stanovení hodnoty gamaglutamyltransferázy (GGT) v moči. GGT se vyskytuje v kartáčovém lemu proximálního tubulu ledvin. Při poškození toho lemu se enzym uvolňuje do moči, ve které jej pak můžeme stanovovat. Z důvodu standardizace se hladina GGT stanovuje v poměru k močovému kreatininu (GGT/Cr). Tento marker ukazuje poškození ledvin, ne jejich funkci (2).

Mezi další metody používané ke zhodnocení funkce a poškození ledvin patří stanovení močoviny a kreatininu v krvi, stanovení hustoty moči, poměru proteinu a kreatininu v moči, analýza močového sedimentu a stanovení frakční exkrece iontů (2).

V současnosti je publikováno velmi málo vědeckých článků či publikací na téma působení suxibuzonu na koňské ledviny a možný vznik AKI. Zároveň je SDMA také novým markerem, o

kterém není mnoho studií. Rádi bychom proto využili těchto dvou skutečností a našli uplatnění našeho projektu v klinické praxi.

Materiál a metodika

Do projektu byli zařazeni kliničtí pacienti přijatí na Kliniku chorob koní VETUNI Brno v průběhu roku 2021. Pro zařazení pacienta do studie musela být splněna následující kritéria: 1) Pacient bez systémového onemocnění, které by mohlo narušit funkci ledvin (např. endotoxemie, systémový zánět) 2) Minimální délka medikace suxibuzonem 5 dní 3) Pacient nebyl medikován jinými nefrotoxickými léky před terapií suxibuzonem a nepředpokládalo se jejich nasazení v jejím průběhu. Pro zařazení do studie byl vyžadován písemný souhlas majitele.

Pacientům, kteří byli medikováni suxibuzonem (v léčivém přípravku Danilon Equidos), byla odebrána moč a krev před započatím léčby a po pěti dnech léčby suxibuzonem. V případě delší terapie byly vzorky odebrány i desátý den terapie (1 kůň). Dávka suxibuzonu byla stanovena ošetřujícím lékařem a odpovídala klinické indikaci.

Moč byla ve většině případů odebrána spontánní mikcí, ve 3 případech katetrizací. Moč byla vyšetřena makroskopicky (barva, zákal, zápach, příměsi), pomocí diagnostického papírku, refraktometrem pro odečtení hustoty moči a dále byl vyšetřen močový sediment. Moč byla vyšetřena v laboratoři Kliniky chorob koní nejpozději do hodiny po odběru. V laboratoři pro malá zvířata na VETUNI Brno bylo v moči stanoveno GGT, celkový protein, kreatinin (Cr), sodík a draslík. Po dodání výsledků byl spočítán poměr GGT/Cr, protein/Cr a frakční exkrece sodíku a draslíku.

Krev byla odebrána z *v. jugularis dextra* či *sinistra* pro stanovení celkové bílkoviny, kreatininu, močoviny, sodíku, draslíku (sérum či plasma), pro hematologii (plná krev) a pro SDMA (sérum). Celková bílkovina, kreatinin, močovina, ionty a hematologie byly stanoveny v laboratoři pro malá zvířata na VETUNI Brno, sérum pro SDMA bylo zamraženo a později hromadně odesláno do laboratoře IDEXX.

Výsledky

Celkem bylo do naší studie zařazeno 13 koní. Z toho 3 valaši (23%) a 10 klisen (77%). U 10 koní byly provedeny 2 odběry, u jednoho koně 3 odběry. Dva pacienti byli nakonec ze studie vyřazeni kvůli nutnému použití jiných nefrotoxických léků. U jednoho pacienta nebyla data úplná kvůli absenci druhého vzorku séra na stanovení SDMA. U šesti koní byl Danilon použit kvůli ortopedickým potížím (54,5%), u dvou při oftalmologických potížích (18,5%) u jednoho po chirurgickém ošetření (9%), u jednoho při dermatologických potížích (9%) a u jednoho z důvodu přetrvávající tachykardie neznámého původu (9%). U žádného z pacientů nedošlo k významnému zvýšení bílých krvinek v krvi a k rozvoji zánětu. U dvou pacientů došlo ke zvýšení močového enzymu GGT o 10 a více

jednotek IU/gCr, všechny výsledky byly ale stále v referenčním rozmezí. U dvou koní (27%) došlo ke zvýšení kreatininu o více než 26,5 $\mu\text{mol/l}$, přičemž u jednoho z nich hodnota přesáhla horní hranici referenčního rozmezí. Tito dva koně byli zařazeni do stupně 1 klasifikace VAKI (5). U 5 koní (45,5%) došlo ke zvýšení SDMA z toho u 3 (27%) ke zvýšení nad referenční rozmezí. V hustotách moči ani v pH moči nebyly zaznamenány velké rozdíly. U 3 koní (27%) došlo k významné změně v močovém sedimentu (přítomnost krve a válců). Největší rozdíly mezi prvním a druhým odběrem byly zaznamenány u koně výrazně staršího (27 let), u klisny ve špatném výživném stavu (BCS 3/9) a u koně který byl medikován suxibuzonem po dobu 10 dní.

Závěr

Získaná data potvrdila, že i při relativně krátkodobé medikaci suxibuzonem může dojít k poškození ledvin. Na základě projektu byl na Klinice chorob koní VETUNI Brno zaveden preventivní screening markerů poškození ledvin u pacientů predisponovaných k selhání ledvin a u pacientů na nefrotoxické medikaci v průběhu hospitalizace. Screening je rutinně doporučován i pacientům na nefrotoxické medikaci po odchodu do domácí péče. Srovnání metod detekce poškození ledvin bude ještě zhodnoceno na základě statistické analýzy dat.

Seznam literatury:

- 5) MACALLISTER, C. G.; MORGAN S. J.; BORNE A. T.; POLLET R. A.: Comparison of adverse effects of phenylbutazone, flunixin meglumine, and ketoprofen in horses. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 1993, 202(1), 71-77.
- 6) SCHOTT, H. C.; ESSER, M. M.: The Sick Adult Horse: Renal Clinical Pathologic Testing and Urinalysis. *Veterinary Clinics of North America Equine Practitioners*, 2020, 36(1), 121-134.
- 7) NABITY M. B., LEES G. E., BOGGESS M., YERRAMILLI M., OBARE E., YERRAMILLI M., RAKITIN A., AGUIAR J., RELFORD R.: Symmetric dimethylarginine assay validation, stability, and evaluation as a marker for early detection of chronic kidney disease in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2015, 29(4), 1036-1044.
- 8) SIWINSKA N., ZAK A., SLOWIKOWSKA M., NIEDZWIEDZ A., PASLAWSKA U.: Serum symmetric dimethylarginine concentration in healthy horses and horses with acute kidney injury, *BMC Veterinary Research*, 2020, 16:396.
- 9) SAVAGE, V.L.; MARR, C.M.; BAILEY, M.; SMITH, S.: Prevalence of acute kidney injury in a population of hospitalized horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2019, 33(5), 2294-2301.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 101/2021/FVL

Sledování buněčných markerů v tumorech mléčné žlázy u fen

Marie Golis¹, Aneta Angelová², Carlos Fernando Agudelo Ramírez¹, Sabína Červěňová³

¹*Klinika chorob psů a koček, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno*

²*Doktorský studijní program – 3. ročník, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita*

Brno

³*Magisterský studijní program - 6. ročník (student), Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární*

univerzita Brno

Úvod

Obdobně jako v humánní medicíně, i ve veterinární onkologii dochází k vývoji diagnostických a terapeutických metod, pro zajištění co nejlepších léčebných výsledků. Pro určení adekvátní terapie a prognózy je nezbytné správné zařazení neoplazie. Pro tuto klasifikaci lze v současné době využívat kromě histopatologických metod i metody imunohistochemické a imunofluorescenční (1).

Určení stupně malignity je jedním z nejvýznamnějších prognostických faktorů. V roce 2013 byl publikován konsensus, zaměřený na tuto problematiku (tzv. metoda Peňa) (2). Tento systém je nyní považován za zlatý standart v oblasti diagnostiky, léčby a určení prognózy. Poslední verze týkající se především benigních smíšených novotvarů, karcinomů smíšených tumorů a karcinosarkomů byl publikován v roce 2017 (3).

Fenotypizace na základě detekce povrchových znaků, tzv. markerů, umožňuje patologům tumor typizovat a klinikovi určit přesnější informace týkající se prognózy pacienta a nastavení specifické léčby dle individuálních potřeb pacienta. Neoplastické markery jsou ve většině případů standardní produkty metabolismu v buňkách, u kterých však došlo k maligní transformaci, což vede k navýšení produkce těchto povrchových znaků (4). Ve většině případů se jedná o specifické proteiny, jež jsou produkovány nádorovými buňkami (tzv. antigeny spojené s nádorem). V případě, že u onkologických pacientů lze tyto antigeny detekovat v séru, moči nebo jiných tkáních, jsou označovány jako biomarkery. V humánní medicíně, hrají nezastupitelnou roli v diagnostice a sledování neoplastického procesu (5).

Kadheriny tvoří skupinu transmembránových proteinů, důležitých pro mezibuněčné spoje v normální struktuře tkání (6). Jedním z nejčastěji vyšetřovaných je E-kadherin (epiteliální kadherin). Funkce této molekuly spočívá v buněčné adhezi v epitelu (7). Na rozdíl celé řady jiných biomarkerů, ztráta nebo snížená exprese těchto adhezivních molekul souvisí s nižší diferenciací neoplastických buněk, rozvojem metastáz v sentinelových mízních uzlinách a s celkovou invazivitou, což má pro pacienta nepříznivý efekt (4). E-kadherin je nejčastěji vázán na β -katenin, bývají tak obvykle stanovovány společně (8).

Materiál a metodika

Pro histologickou, imunohistochemickou a imunofluorescenční analýzu byly použity vzorky tumorů mléčné žlázy. Pro retrospektivní část byly použity vzorky ve formě parafinových bloků ze sbírky Ústavu anatomie, histologie a embryologie VETUNI získané v letech 2016-2020. V rámci prospektivní části studie byly vzorky získány v podobě čerstvých bioptátů tkáně mléčné žlázy, které byly následně označeny a fixovány. Byla stanovena histopatologická diagnóza dle klasifikačního schématu navrženého Goldschmidtem (9). U každého vzorku byl stanoven stupeň malignity dle systému dle Peña et al. (2013) a Karayannopoulou et al. (2005). Rovněž byla sledována angioinvasivita, lymfangioinvasivita a perineurální invazivita.

U vzorků byla následně imunohistochemicky stanovena exprese molekuly calretininu vazbou specifické anti-calretinin protilátky na hledaný antigen ve tkáni. Byl zhodnocen jednak „vzor barvení“, kde lineárnímu vzoru byla přiřazena hodnota 1, rozptýlený vzor měl hodnotu 3 a smíšený vzor hodnotu 2, a dále byl zhodnocen „stupeň positivity“ dle systému: 0 – 10% pozitivních buněk = 1, 10 – 50% pozitivních buněk = 2 a 50% a více pozitivních buněk = 3.

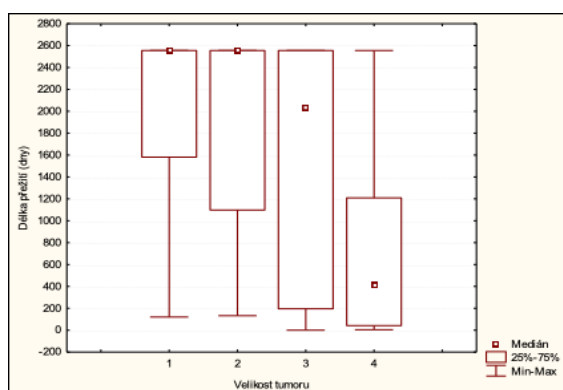
Pro statistickou analýzu byl softwarový systém pro analýzu dat STATISTICA CZ, verze 6.

Pro imunofluorescenci bylo zpracováno 12 vzorků a byla použita metoda dvojitého značení. Jako primární protilátky byly použity β -catenin v koncentraci 1:100 (Cell Signaling Technology, USA, č. 9582), E-cadherin v koncentraci 1:100 (ThermoFisher Scientific, USA, č. CF800671), jako sekundární protilátka Alexa Fluor 488 v koncentraci 1:200 (ThermoFisher Scientific, USA, č. A11008) a Alexa Fluor 565 v koncentraci 1:200 (ThermoFisher Scientific, USA, č. A11004). Jádra byla kontrastně obarvena Draq5™ (ThermoFisher Scientific, USA, č. 65-0880-92). Získání antigenu bylo provedeno v citrátovém pufru, pH 6 (20 min, horká lázeň 90 °C). Sklíčka byla pozorována pod konfokálním mikroskopem Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Německo). Obrázky byly upraveny v Adobe Photoshop 2021 (Adobe, USA).

Výsledky

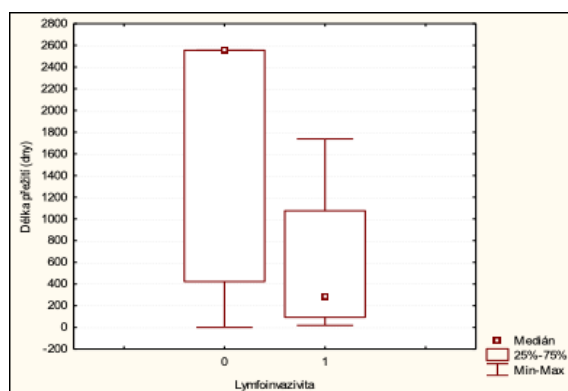
Do studie bylo zařazeno 85 vzorků tumoru mléčné žlázy. Během statistické analýzy jsme porovnávali vliv velikosti tumoru na délku přežití, tumory byly rozděleny dle jejich velikosti - kategorie 1 (do 1 cm), kategorie 2 (1 -5 cm), kategorie 3 (5 -10 cm), kategorie 4 (větší než 10 cm), u mnohočetných byl brán v potaz největší, délka přežití je udávána ve dnech. Pro žijící zvířata byla do analýzy

doplněna hodnota 2555 dní (= 7 let). Z výsledku plyne, že jedinci s větším tumorem přežívají statisticky průkazně kratší dobu ($p=0,0316$) než zvířata kterým byl odstraněn tumor menších rozměrů.



Graf 1. vliv velikosti tumoru délku přežití pacientů ($p=0,0316$)

Dalším sledovaným parametrem bylo srovnání vlivu přítomnosti lymfangioinvazivity na délku přežití. Statisticky průkazně kratší délka přežití u zvířat s prokázanou lymfoinvazivitou oproti skupině bez lymfoinvazivity ($p = 0,0496$).



Graf 2. vliv lymfangioinvazivity na délku přežití pacientů ($p = 0,0496$).

Dalšími sledovanými parametry bylo porovnání mitotického indexu s absencí nebo přítomností angioinvazivity, dále srovnání mitotického indexu se stupněm malignity dle systému Peňa et al. (2013).

V případě imunofluorescenční analýzy tumorů mléčné žlázy jsme u maligních nádorů pozorovali sníženou expresi E-cadherinu. Ztráta E-cadherinu není generalizovaná, nejmarkantnější změny jsme pozorovali v oblastech „pučení tumoru“ a v invazivním okraji tumoru. Změny v expresi β -kateninu jsou spojeny se ztrátou signálu E-cadherinu. Pozorovali jsme částečnou ztrátu signálu β -kateninu na membránách maligní formy karcinomu mléčné žlázy psů, ale nejmarkantnější změny byly ve vzorci exprese, který se mění z lineárního membránového na shlukovaný a nerovnoměrný vzorec. V některých případech nádorů mléčné žlázy psů jsme pozorovali jadernou expresi tohoto proteinu, která, jak se zdá, nesouvisí s biologickým chováním nádoru.

Závěr

Z předběžných výsledků byla zjištěna statisticky významná souvislost mezi velikostí tumoru a celkovou délkou přežití pacientů ($p=0,0316$). Zjištěná lymfangioin vazity měla také statisticky významný vliv na délku přežití ($p = 0,0496$). Dále byla zjištěna statisticky významná souvislost mezi stupněm angioin vazivity a rostoucí hodnotou mitotického indexu, stejně tak jako vyšší hodnota mitotického indexu s stupněm malignity dle systému Peña et al. (2013).

V rámci využití imunofluorescenční metody byla pozorována snížená exprese adhezivních molekul u maligních tumorů mléčné žlázy. Tato skutečnost by mohla být prognosticky významným faktorem pro pacienty trpící tumory mléčné žlázy. Vzhledem k nízkému počtu vzorků se bude v analýze pokračovat i v roce 2022.

Seznam literatury:

- 10) WITHROW, STEPHEN J., DAVID M. VAIL A RODNEY L. PAGE, ed. Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology. 5th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, c2013. ISBN 978-1-4377-2362-5.
- 11) L. PEÑA, P. J. D. ANDRÉS, M. CLEMENTE, P. CUESTA, a M. D. PÉREZ-ALENZA, „Prognostic Value of Histological Grading in Noninflammatory Canine Mammary Carcinomas in a Prospective Study With Two-Year Follow-Up: Relationship With Clinical and Histological Characteristics", *Vet. Pathol.*, roč. 50, č. 1, s. 94–105, led. 2013.
- 12) D. J. MEUTEN *et al.*, *Tumors in Domestic Animals*, Fifth edition. Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc., 2017, 2017.
- 13) G. D. CASSALI *et al.*, „Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors - 2013.", *Braz. J. Vet. Pathol.*, roč. 7, č. 2, s. 38–69, 2014.
- 14) KASZAK, A. RUSZCZAK, S. KANAFKA, K. KACPRZAK, M. KRÓL, a P. JURKA, „Current biomarkers of canine mammary tumors", *Acta Vet. Scand.*, roč. 60, říj. 2018
- 15) MAÎTRE, JEAN-LÉON A CARL-PHILIPP HEISENBERG. Three Functions of Cadherins in Cell Adhesion. *Current Biology* [online]. 2013, **23**(14), R626-R633 [cit. 2021-11-25]. ISSN 09609822.
- 16) A. J. F. MATOS, C. LOPES, J. CARVALHEIRA, M. SANTOS, G. R. RUTTEMAN, A F. GÄRTNER, „E-cadherin expression in canine malignant mammary tumours: relationship to other clinico-pathological variables", *J. Comp. Pathol.*, roč. 134, č. 2–3, s. 182–189, dub. 2006.
- 17) TIAN, XINRUI, ZHUOLA LIU, BO NIU, et al. E-Cadherin/ β -Catenin Complex and the Epithelial Barrier. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [online]. 2011, **2011**, 1-6 [cit. 2021-11-25]. ISSN 1110-7243.
- 18) M. GOLDSCHMIDT, L. PEÑA, R. RASOTTO, A V. ZAPPULLI, „Classification and Grading of Canine Mammary Tumors", *Vet. Pathol.*, roč. 48, č. 1, s. 117–131, led. 2011.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 122/2021/FVL

Vliv použité dávky medetomidinu na množství ejakulátu u kocourů a porovnání dvou metod odběru ejakulátu u kocourů – uretrální katetrizace a elektroejakulace

Klára Jelínková, Roman Vitásek

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

Úvod

V současné době je nejpoužívanější metodou odběru ejakulátu u kocourů elektroejakulace provedená v celkové anestezii. Mezi nejběžněji používaná anestetika patří kombinace ketaminu (v dávce 5 mg/kg tělesné hmotnosti) s medetomidinem (v dávce 80 µg/kg tělesné hmotnosti) aplikovaná intramuskulárně (1). Uretrální katetrizace po anestezii navozené medetomidinem je novou, neinvazivní metodou odběru ejakulátu u kocourů s příznivými výsledky (2; 4). Ve studii, provedené na oddělení reprodukce, KCHPK, VETUNI Brno v roce 2018, byly vzorky ejakulátu odebrané prostřednictvím uretrální katetrizace charakterizovány nižším objemem, motilitou, životností spermií, procentem morfologicky nezměněných spermií a nižším celkovým počtem spermií v ejakulátu v porovnání s elektroejakulací a výplachem nadvarlat (3). V dalších vědeckých studiích byly taktéž vzorky ejakulátu z uretrální katetrizace charakterizovány nižším objemem či motilitou v porovnání se vzorky ejakulátu z elektroejakulace nebo výplachu nadvarlat (2; 4). Nicméně zde nebyly shledány rozdíly v celkovém počtu spermií v ejakulátu odebraném uretrální katetrizací oproti ejakulátu pocházejícím z elektroejakulace nebo výplachu nadvarlat (2; 4). Otázkou zůstává, zda uvedené rozdíly ve zmíněných studiích mohly být způsobeny použitím rozdílných anestetických protokolů. V naší práci byla použita nižší dávka medetomidinu (80 µg/kg tělesné hmotnosti) (3) v porovnání s citovanými studiemi (100–140 µg/kg tělesné hmotnosti) (2; 4).

Cílem projektu bylo vyhodnotit vliv použití dvou rozdílných dávek medetomidinu (80 µg/kg tělesné hmotnosti a 150 µg/kg tělesné hmotnosti) na objem ejakulátu a celkové množství spermií v ejakulátu u kocourů při použití metody uretrální katetrizace. Dalším cílem bylo porovnat kvalitativní výsledky vyšetření parametrů ejakulátu z uretrální katetrizace a elektroejakulace.

Materiál a metodika

Do projektu bylo zařazeno 31 pohlavně dospělých kocourů ve věku 1–5 let, u nichž majitelé žádali chirurgickou kastraci zvířat. Zvířata byla rozdělena do dvou skupin.

1. skupina zvířat byla uvedena do celkové anestezie kombinací nízké dávky medetomidinu (80 µg/kg, přípravek Cepetor, CP-Pharma, Burgdorf, Německo) s ketaminem (5 mg/kg, přípravek Narkamon, Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané, ČR), aplikované intramuskulárně. Poté byl proveden odběr

ejakulátu uretrální katetrizací a následně elektroejakulací u každého zvířete. K elektroejakulaci byl použit elektroejakulační protokol podle Howarda a kol. (1). Po ukončení elektroejakulace byla provedena chirurgická kastrace zvířat.

2. skupina zvířat byla uvedena do anestezie za použití vysoké dávky medetomidinu. Medetomidin byl aplikován v dávce 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ intramuskulárně (přípravek Cepetor, CP-Pharma, Burgdorf, Německo). Následně byl proveden odběr ejakulátu uretrální katetrizací a elektroejakulací u každého zvířete. Při elektroejakulaci byla v případě potřeby prohloubena anestezie za použití propofolu v dávce 0,5 – 4 mg/kg , intravenózně (přípravek Norfol, Norbrook Laboratories Ltd., Newry, Severní Irsko). Po ukončení elektroejakulace byla provedena chirurgická kastrace zvířat.

Následně bylo provedeno laboratorní vyšetření všech vzorků ejakulátu, přičemž byl stanoven celkový objem, motilita, životnost a koncentrace spermií. Bylo provedeno morfologické vyšetření spermií a z určených hodnot celkového objemu a koncentrace byl vypočten celkový počet spermií v ejakulátu. Výsledky z obou skupin byly statisticky porovnány za použití programu GraphPad Prism (verze 9, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Pro testování statistických rozdílů mezi získanými daty byl použit dle závislosti výběrů Mann-Whitney test nebo Wilcoxon test. Jako statisticky významné byly v obou případech stanoveny rozdíly na hladině významnosti $P < 0,05$.

Výsledky

Při statistickém porovnání výsledků objemu a celkového počtu spermií ejakulátu získaného uretrální katetrizací v rámci dvou různých metod anestezie, nebyly shledány statisticky významné rozdíly ve vyšetřovaných parametrech mezi metodou anestezie s nízkou dávkou medetomidinu a metodou anestezie s vysokou dávkou medetomidinu.

Dále byl stanoven celkový objem ejakulátu a celkový počet spermií v ejakulátu získaný od každého kocoura (sečtením příslušných hodnot z uretrální katetrizace a elektroejakulace) v rámci dílčích metod anestezie. Následně bylo stanoveno, kolik procent z těchto celkových hodnot zahrnuje ejakulát z uretrální katetrizace. Výsledné hodnoty z dvou různých metod anestezie byly mezi sebou statisticky porovnány. Výsledné rozdíly byly ve všech případech zhodnoceny jako statisticky nevýznamné. Tudiž ani tímto způsobem výpočtu nebyl prokázán rozdíl v celkovém objemu a v celkovém počtu spermií v ejakulátu mezi metodami s použitím nízké a vysoké dávky medetomidinu.

Jak podle mediánu hodnot z deskriptivní statistiky, tak podle statistického srovnání jednotlivých testovaných parametrů ejakulátu, bylo prokázáno, že ve většině parametrů (objem, motilita, životnost, počet morfologických změn spermií a celkový počet spermií) bylo dosaženo lepších výsledků při použití elektroejakulace oproti uretrální katetrizaci. Jediným parametrem, který nevykazoval statisticky významné rozdíly byla koncentrace. Výsledky tohoto statistického porovnání byly shodné

v rámci obou použitých metod anestezie. Výsledky deskriptivní statistiky vybraných kvalitativních parametrů ejakulátu jsou uvedeny v tabulkách č. 1. a 2.

Tabulka č.1. Deskriptivní statistika vybraných vyšetřovaných parametrů ejakulátu při použití nízké dávky medetomidinu (počet zvířat = 20). EE – elektroejakulace, CT – uretrální katetrizace

		Průměr	S.D.	Medián	Minimum	Maximum
Objem [μl]	CT	25,08	40,22	12,50	2,50	185,00
	EE	113,00	190,40	45,00	23,00	735,00
Motilita [%]	CT	48,95	28,26	70,00	0,00	80,00
	EE	65,26	21,18	70,00	10,00	80,00
Celkový počet spermií [x 10 ⁶]	CT	4,47	6,90	1,80	0,01	26,80
	EE	17,45	14,77	15,65	0,72	69,36
Morfologické změny spermií [%]	CT	44,33	21,20	38,00	19,00	99,00
	EE	35,05	16,30	29,50	16,00	76,00
Celkový počet spermií EE+CT [x 10 ⁶]		21,91	18,93	18,12	2,24	87,85
Celkový objem ejakulátu EE+CT [μl]		138,10	219,40	65,00	25,50	920,00
Poměr CT z celkového počtu spermií [%]		19,08	20,97	12,20	0,06	79,55
Poměr CT z celkového objemu ejakulátu [%]		23,52	16,86	20,05	0,87	61,53

Tabulka č.2. Deskriptivní statistika vybraných vyšetřovaných parametrů ejakulátu při použití vysoké dávky medetomidinu (počet zvířat = 11). EE – elektroejakulace, CT – uretrální katetrizace

		Průměr	S.D.	Medián	Minimum	Maximum
Objem [μl]	CT	18,64	6,36	20,00	10,00	30,00
	EE	47,73	18,08	40,00	30,00	85,00
Motilita [%]	CT	60,00	14,83	60,00	40,00	80,00
	EE	68,18	9,80	70,00	50,00	80,00
Celkový počet spermií [x 10 ⁶]	CT	3,47	2,60	3,07	0,65	9,90
	EE	13,41	11,90	9,10	3,75	38,68
Morfologické změny spermií [%]	CT	31,18	7,40	31,00	20,00	45,00
	EE	24,64	5,60	24,00	19,00	34,00
Celkový počet spermií EE+CT [x 10 ⁶]		16,88	12,83	10,46	5,72	44,17
Celkový objem ejakulátu EE+CT [μl]		66,36	16,29	60,00	50,00	100,00
Poměr CT z celkového počtu spermií [%]		24,63	15,87	15,09	7,05	46,32
Poměr CT z celkového objemu ejakulátu [%]		29,50	11,96	30,00	13,33	50,00

Závěr

Předpoklad, že použití vysoké dávky medetomidinu, bude mít pozitivní vliv na kvalitu ejakulátu získaného uretrální katetrizací, se nám v rámci studie nepodařilo statisticky prokázat. K odběru ejakulátu u kocourů prostřednictvím uretrální katetrizace by tedy měla být dostačující nižší dávka medetomidinu (80 µg/kg tělesné hmotnosti). Nicméně střední mediánové hodnoty jak objemu, tak celkového počtu spermií, z metody uretrální katetrizace v rámci deskriptivní statistiky se zvýšily při použití metody s vysokou dávkou medetomidinu oproti metodě s nízkou dávkou medetomidinu. Efekt však nebyl natolik výrazný, aby se projevil ve statistickém srovnání.

Vzhledem k tomu, že při použití elektroejakulace, bylo dosaženo lepších výsledků v naprosté většině sledovaných kvalitativních parametrů ejakulátu v rámci obou metod anestezie, lze říci, že tato studie potvrdila vhodnost elektroejakulace jakožto metody první volby při odběru ejakulátu u kocourů.

Seznam literatury

- 1) Howard, J.G.; Brown, J.L.; Bush, M.; Wildt, D.E.: Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoa motility and morphology after swim-up processing. *J Androl.* 1990, 11, 204–215.
- 2) Zambelli, D.; Prati, F.; Cunto, M.; Iacono, E.; Merlo, B.: Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. *Theriogenology.* 2008, 69, 485–490.
- 3) Jelinkova, K.; Vitasek, R.; Novotny, R.; Bartoskova, A.: A comparison of quality parameters of fresh feline ejaculates collected by three different collection techniques. *Reprod Domest Anim.* 2018, 53(5):1068–1074.
- 4) Prochovska, S.; Niżański, W.; Ochota, M.; Partyka, A.: Characteristics of urethral and epididymal semen collected from domestic cats – A retrospective study of 214 cases. *Theriogenology.* 2015, 84, 1565–1571.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 110/2021/FVL

Vliv metadonu na nitrooční tlak, velikost zornice a produkci slz u psů

Petr Raušer, Laura Staňková, Matěj Pavlík

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

Úvod

Tlumení bolesti je při řešení patologických procesů většinou nezbytné. Pro adekvátní analgezii se využívají především mí-opioidní agonisté, mezi které patří i metadon. Ten navíc působí i jako N-methyl-D-aspartát (NMDA) antagonist a slabý inhibitor zpětného vychytávání serotoninu (SRI). Svojí analgetickou potencií je metadon srovnatelný s morfinem. Metadon se u psů často využívá pro perioperační analgezii (1). Snižuje srdeční frekvenci a krevní tlak (2). Metadon tlumí bolest lépe než např. buprenorfin (3).

Pro udržení homeostázy oka je nutný stabilní nitrooční tlak a dostatečná produkce slz. Velikost zornice ovlivňuje nitrooční tlak (4). Samostatně aplikovaní mí-opioidní agonisté (fentanyl) zvyšují nitrooční tlak (5). Produkci slz buď neovlivňují (morfin)(6) nebo ji snižují (petidin)(7). Vliv metadonu na nitrooční tlak a velikost zornice byl popsán pouze při současném podání s medetomidinem. K významnému ovlivnění nitroočního tlaku nedošlo, zmenšila se však velikost zornice (8). Vliv metadonu na produkci slz je zmiňován pouze při jeho aplikaci společně s acepromazinem (9,10), kdy došlo ke snížení produkce slz.

Informace o účincích samostatně podaného metadonu na nitrooční tlak a produkci slz však dosud publikovány nebyly. Cílem této studie bylo analyzovat změny nitroočního tlaku, velikosti zornice a produkce slz po intravenózním a intramuskulárním podání metadonu u zdravých psů. Předpokládali jsme vzestup nitroočního tlaku, zmenšení velikosti zornice a snížení produkce slz.

Materiál a metodika

Do studie bylo zařazeno 40 zdravých psů – klinických pacientů o tělesné hmotnosti 5–20 kg, kteří podstoupili stomatologické ošetření. Psi byli rozděleni do 3 skupin – skupina MetIV (n = 15), skupina MetIM (n = 15) a kontrolní skupina Kon (n = 10). Projekt byl proveden formou randomizované "dvojitě slepé" studie. Svým rozsahem nepřekračoval běžně prováděné výkony a měření, proto nebyl vyžadován projekt pokusu.

Všem psům byl do *v. cephalica antebrachii* zaveden intravenózní katétr. Na levém oku byl změřen nitrooční tlak a velikost zornice, na pravém oku pak produkce slz. U všech psů byla také změřena tepová frekvence a systolický a diastolický krevní tlak. Následně byl psům skupiny MetIV intravenózně do *v. cephalica antebrachii* aplikován metadon v dávce 0,3 mg/kg (Synthadon 10 mg/ml inj., Le Vet Beheer B.V.). Psům skupiny MetIM byl intramuskulárně do *m. longissimus dorsi*

injikován metadon v dávce 0,3 mg/kg. Psům kontrolní skupiny byl intravenózně aplikován 0,9% roztok NaCl v množství 0,03 ml/kg. Za 2, 5, 10, 20 a 30 minut po aplikaci byl na levém oku měřen nitrooční tlak a velikost zornice, tepová frekvence a systolický a diastolický krevní tlak. Za 30 minut po aplikaci byla na pravém oku změřena produkce slz.

Psi byli při měření v tiché místnosti se standardním osvětlením. Všichni psi byli v průběhu měření při plném vědomí vsedě nebo ve sternální poloze bez jakékoliv další medikace nebo fixace. Nitrooční tlak byl měřen aplanačním tonometrem (Tono-Pen XL, Medtronic) a zaznamenáván v mm Hg. Velikost zornice byla měřena milimetrovým pravítkem přiloženým na rohovku a zaznamenávána v milimetrech. Produkce slz byla měřena Schirmerovým slzným testem (Tear Touch, Madhu Instruments Pvt. Ltd.) a zaznamenávána v mm za minutu. Tepová frekvence byla měřena monitorem pro měření krevního tlaku (Cardel 9401, Midmark) s palpační kontrolou pulzu na *a. femoralis* a zaznamenávána v počtu tepů za minutu. Systolický a diastolický krevní tlak byly měřeny neinvazivně oscilometricky stejným monitorem, manžeta byla přiložena na levé předloktí psa. Střední arteriální tlak byl vypočítán ze systolického a diastolického tlaku. Šířka tlakové manžety odpovídala 40 % obvodu předloktí psa. Krevní tlak byl zaznamenáván v mm Hg.

Metadon byl podán jako preemptivní analgezie, ihned po skončení měření byli všichni psi uvedeni do celkové anestezie ve které podstoupili stomatologické ošetření. V tomto období již žádná měření prováděna nebyla.

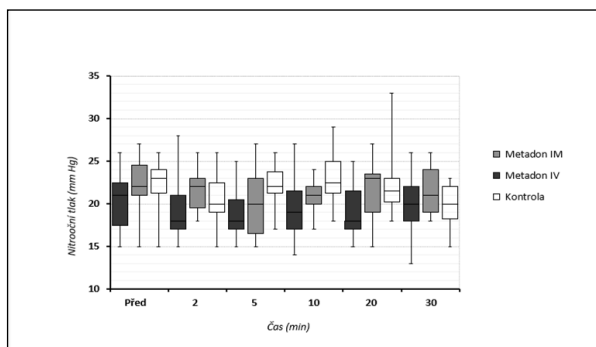
Statistické vyhodnocení bylo provedeno programy GraphPad InStat 3.06 (GraphPad Software Inc.), KyPlot 2.0 beta 15 (Koichi Yoshioka) a MS Excel (Microsoft). Pro srovnání hodnot v jednotlivých časech oproti hodnotám výchozím uvnitř každé skupiny byl použit Dunnettův nebo Steelův test. Pro porovnání produkce slz ve 30. minutě oproti hodnotám výchozím uvnitř každé skupiny byl použit Wilcoxonův test. Pro srovnání hodnot mezi jednotlivými skupinami ve stejném čase byl použit Tukey-Kramerův nebo Steel-Dwassův test. Za klinicky významný pokles produkce slz jsme považovali hodnoty Schirmerova slzného testu pod 10 mm za minutu.

Výsledky

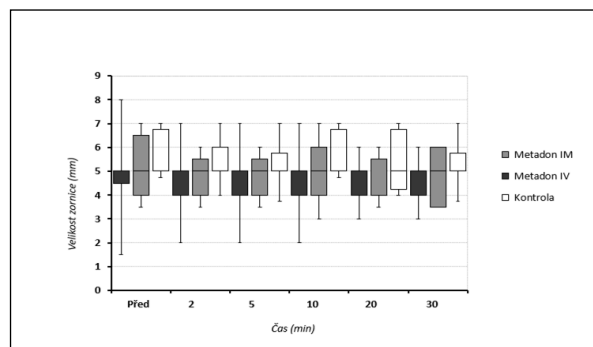
Nitrooční tlak ani velikost zornice se u žádné ze skupin v průběhu našeho sledování signifikantně nezměnil oproti stavu před aplikací ani při vzájemném porovnání jednotlivých skupin mezi sebou. Produkce slz se za 30 minut signifikantně snížila u psů skupiny MetIV ($p = 0,0259$), ve 30. minutě však rozdíl mezi skupinami zaznamenán nebyl. U ostatních skupin signifikantní změny v produkci slz zaznamenány nebyly.

Tepová frekvence se signifikantně snížila v 5. ($p = 0,0165$), 10. ($p = 0,0026$), 20. ($p = 0,0029$) a 30. ($p = 0,0059$) minutě ve skupině psů skupiny MetIV.

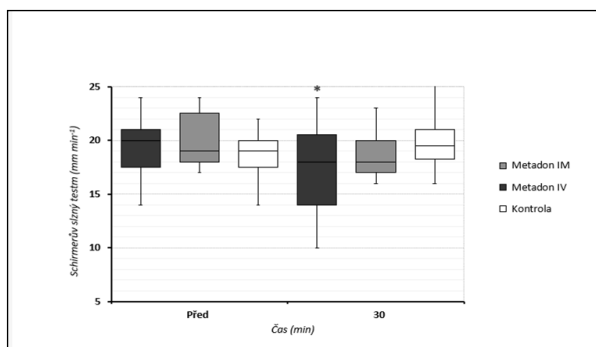
Ostatní sledované hodnoty se uvnitř skupin ani mezi skupinami signifikantně nelišily.



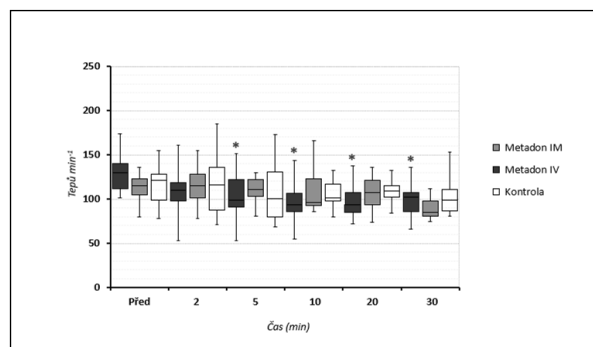
Obrázek 1. Boxový graf zobrazuje hodnoty nitroočního tlaku po aplikaci metadonu (obdélníky znázorňují 25–75 % hodnot, úsečky zbývající hodnoty, horizontální linie v obdélníku medián)



Obrázek 2. Boxový graf zobrazuje změny hodnot velikosti zornice v mm po aplikaci metadonu (obdélníky znázorňují 25–75 % hodnot, úsečky zbývající hodnoty, horizontální linie v obdélníku medián)



Obrázek 3. Boxový graf zobrazuje hodnoty produkce slz po aplikaci metadonu (obdélníky znázorňují 25–75 % hodnot, úsečky zbývající hodnoty, horizontální linie v obdélníku medián; * statisticky významně nižší ve srovnání s výchozí hodnotou)



Obrázek 4. Boxový graf zobrazuje změny hodnot tepové frekvence po aplikaci metadonu (obdélníky znázorňují 25–75 % hodnot, úsečky zbývající hodnoty, horizontální linie v obdélníku medián; * statisticky významně nižší ve srovnání s výchozí hodnotou)

Závěr

Metadon podaný intravenózně nebo intramuskulárně během 30 minut významně neovlivňuje nitrooční tlak ani velikost zornice. Po intravenózním podání sice signifikantně snižuje produkci slz, avšak toto snížení není klinicky významné. Metadon podaný intravenózně signifikantně snižuje během 30 minut i tepovou frekvenci.

Intravenózně i intramuskulárně podaný metadon má během 30 minut minimální vliv na sledované oční parametry, je proto vhodný pro analgezii i u pacientů s rizikem kolísání nitroočního tlaku, velikosti zornice nebo s nedostatečnou produkcí slz.

Seznam literatury:

- (1) Sinclair M 2018: Pharmacologic and clinical application of opioid analgesics. In: Mathews KA, Sinclair M, Steele AM, Grubb T: Analgesia and anesthesia for the ill or injured dog and cat. 1st ed., Wiley Blackwell, Hoboken, 119–133.
- (2) Vieira BHB, Nishimura LT, Carvalho LL, Auckburally A, Mattos-Junior E (2017) Cardiopulmonary and sedative effects of intravenous or epidural methadone in conscious dogs. J Vet Pharmacol Ther 40, 65–68.
- (3) Shah MD, Yates D, Hunt J, Murrell JC (2018) A comparison between methadone and buprenorphine for perioperative analgesia in dogs undergoing ovariohysterectomy. J Small Anim Pract 59, 539–546.
- (4) Gelatt KN, MacKay EO 1998: Distribution of intraocular pressure in dogs. Veterinary Ophthalmology 1, 109–114.
- (5) Mrazova M, Rauser P, Burova J, Georgiou M, Fichtel T (2018) Influence of medetomidine, acepromazine, fentanyl and butorphanol on intraocular pressure and pupil size in health dogs. Vet Med 63, 413–419.
- (6) Mouney MC, Accola PJ, Cremer J, et al. (2011) Effects of acepromazine maleate or morphine on tear production before, during, and after sevoflurane anesthesia in dogs. Am J Vet Res 72, 1427–1430.
- (7) Biricik HS, Ceylan C, Sakar M (2004) Effects of pethidine and fentanyl on tear production in dogs. Vet Rec 155, 564–565.
- (8) Gomez-Martinez MI, Varela-Lopez O, Fontalba-Navas JL, González-Cantalapiedra A (2020) Effects of fentanyl on intraocular pressure and pupil size in medetomidine-methadone premedicated dogs: a pilot study. Vet Rec Open 28, 1–5.
- (9) Volk HA, West E, Linn-Pearl RN, et al. (2018) Effect of methadone and acepromazine premedication on tear production in dogs. Vet Rec Open 5, 1–7.
- (10) Ganz S (2019): Auswirkungen einer Prämedikation mit Methadon und Acepromazin auf die Tränenproduktion bei Hunden. Tierarz Praxis 47: 220–220

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 102/2021/FVL

Účinnost a bezpečnost vyšších perorálních dávek azaperonu pro dosažení sedace u prasat

Martin Svoboda, Patrik Predný, Jan Vašek, Jakub Netolický

Veterinární univerzita Brno, Klinika chorob přežvýkavců a prasat

Úvod

Stresové podmínky, se kterými se prasata setkávají v podmínkách intenzivního chovu, jako je odstav, přeprava, slučování prasat a následné boje, vyžadují použití sedativ. Nejčastěji používaným sedativem u prasat je azaperon. Jedná se o butyrophenonové neuroleptikum, které se používá u prasat k redukci stresu, ale také ke snižování agresivity (Porter et Slusser, 1985). Sedace prasat je obvykle prováděna i.m. injekcí azaperonu v dávce 2 mg/kg tělesné hmotnosti. Nevýhodou i.m. aplikace je, že azaperon zanechává vysoké a přetrvávající koncentrace v místě injekce (Mestorino et al. 2013). Tato skutečnost vylučuje možnost jejího použití při přepravě prasat na jatka. Možným řešením by mohlo být použití perorální aplikace. Autoři Mestorino et al. (2013) prokázali, že po perorální aplikaci azaperonu nepřekročila koncentrace azaperonu v analyzovaných tkáních maximální reziduální limit stanovený EU. Další nevýhodou i.m. aplikace je krátká doba působení účinné látky. Jones (1972) uvádí, že azaperon (i. m.) dosahuje svého maximálního účinku po 15 minutách u mladých prasat, po 30 minutách u dospělých prasat a trvání účinku je od 2 do 4 hodin. Případná opakovaná injekční aplikace je pracná a pro prasata stresující. Krátkodobý účinek může být limitující např. při déletrvajícím transportu nebo při jeho použití ke snížení agresivity a bojů mezi selaty po jejich sloučení po odstavu (Tan et Shackleton 1990). V již řešeném projektu IGA 2019, kde jsme zjistili, že perorální podání azaperonu v dávce 2 mg/kg per os indukuje sedaci u selat, ale k získání klinicky srovnatelné sedace s injekční aplikací (2 mg/kg i. m.) je nutné použít dávku 4 mg/kg per os. Dále jsme zjistili, že se zvýšením dávky perorálně podaného azaperonu lze učinit následující závěry: nástup sedace je rychlejší, konec sedace je pozdější, doba sedace je delší (Svoboda et al. 2021). Výhodou perorální aplikace azaperonu z hlediska welfare je možnost jeho hromadné aplikace bez nutnosti fixace prasat v napájecí vodě nebo krmivu. Při tomto způsobu aplikace však existuje riziko, některá prasata přijmou vyšší dávky účinné látky. V literatuře nejsou doposud k dispozici údaje o tom, jakým způsobem působí zvýšené dávky azaperonu na organismus selat. Jsou dostupné pouze údaje získané při akutních testech toxicity na laboratorních zvířatech (aplikace per os, myš LD50 385 mg/kg, potkan LD50 245 mg/kg, morče LD50 202 mg/kg (Niemegeers et al. 1974). Uvedené skutečnosti nás vedli k formování cíle studie, tj. zhodnotit možnost dosažení účinnější a déletrvající sedace u prasat pomocí perorální aplikace zvýšených dávek azaperonu, včetně zhodnocení vlivu těchto dávek na celkový stav organismu.

Materiál a metodika

Celkem bylo použito 32 selat po odstavu, rozdělených do 4 skupin po 8 kusech. Selata byla dovezena do stájí KCHPP (1680) a izolována v karanténě po dobu dvou týdnů. Selata byla krmena standardními granulovanými směsmi. Skupině A (kontrolní) byl aplikován per os 1ml fyziologického roztoku. Skupině B byl aplikován azaperon per os v dávce 4 mg/kg ž.h. Skupině C byl aplikován azaperon per os v dávce 8 mg/kg ž.h. Skupině D byl aplikován azaperon per os v dávce 12 mg/kg ž.h. U všech skupin byla sledována úroveň sedace na základě reakce na hlasitou stimulaci tupým úderem kovu do kovového hrazení. Tento parametr byl sledován každých 15 minut a hodnocen v následujících stupních. 0 - reakce vysokého stupně (poskok, útěk), 1 - reakce středního stupně (žádné poskoky, ale reakce – úkrok stranou, pohyb hlavy, svalové chvění, zvednutí uší), 2 - žádná reakce. Dále byly hodnoceny fyziologické funkce prasat (0, 30, 90, 240 a 360 minut po aplikaci). Jednalo se o pohyb (stupně 0-1-2), stupeň salivace (0-1-2), dechovou frekvenci a tělesnou teplotu. Krev byla selatům odebrána před zahájením pokusu (před aplikací azaperonu) a v intervalech 0, 30, 90, 240 a 360 minut po aplikaci. Vzorek krve byl odebrán z *vena cava cranialis*. Hematologické vyšetření zahrnovalo tyto parametry: koncentrace hemoglobinu, MCV, MCH, MCHC, počet erytrocytů, hematokrit, počet bílých krvinek, diferenciální počet bílých krvinek.

Výsledky

Intenzita reakce na hlasitou stimulaci tupým úderem kovu do kovového hrazení se odvíjela od podané dávky. Selata kontrolní skupiny, kterým byl aplikován pouze fyziologický roztok reagovala vysokými reakcemi takřka po celou dobu pozorování. Naproti tomu velká část selat skupiny D, které byla aplikována nejvyšší dávka (12 mg/kg ž.h.) vykazovala po většinu času pokusu pouze mírné či žádné reakce na podmět. U ostatních skupin (skupiny B a C) byla zjištěna jasná posloupnost intenzity odezvy na podmět podle výše dávky aplikovaného azaperonu.

Dále byly hodnoceny fyziologické funkce prasat. Parametr intenzity salivace nebyl nikterak významný a slinění se projevilo pouze v krátkém časovém intervalu u malého množství pozorovaných zvířat.

Intenzita pohybu byla u kontrolní skupiny po celou dobu pozorování normální. Naproti tomu u skupiny D, kde byla aplikována nejvyšší dávka azaperonu bylo pozorováno v 90 a 240 minutě velké množství ležících zvířat.

Po celou dobu pozorování nebyla zaznamenána v žádné skupině respirační frekvence bradypnoe. Frekvence dýchání se u skupiny A a B pohybovala povětšinou ve fyziologickém rozmezí pouze s jednorázovými výkyvy. Naproti tomu u skupin C a D ve kterých byla aplikována vyšší dávka, bylo u značného množství selat po celou dobu pokusu pozorováno zvýšení respirační frekvence (tachypnoe).

Toto zvýšení bylo nejintenzivnější u skupiny D, ve které byla aplikována nejvyšší dávka azaperonu (12 mg/kg ž.h.).

Během pokusu jsme též prováděli měření tělesné teploty. Z výsledku je zřejmé, že vyšší dávky azaperonu (skupiny C a D) měly významný vliv na pokles teploty. Čím vyšší dávka azaperonu byla aplikována, tím větší byl pokles teploty.

V průběhu pokusu byla odebírána krev na hematologické vyšetření od všech skupin selat. Mezi jednotlivými experimentálními skupinami nebyly zjištěny významné rozdíly v hematologických parametrech. U všech selat se sice v průběhu experimentu snižovaly hodnoty červené krevní řady, to lze však vysvětlit jako následek opakovaných odběrů krve.

Závěr

Zvýšením dávky perorálně podaného azaperonu je nástup sedace rychlejší, konec sedace nastupuje později a doba sedace je delší. Používání vyšších dávek azaperonu (skupiny C a D) však není pro selata vhodné, protože negativně ovlivňují některé fyziologické parametry, tj. způsobují významné zvýšení respirační frekvence a pokles rektální teploty.

Seznam literatury

JONES, R. S.: A review of tranquilization and sedation in large animals. Vet Rec. 1972,90, 613-617.

MESTORINO, N.; MARCHETTI, M. L.; MARTINEZ, M. A.; ANADON, A.: Tissue depletion of azaperone and its metabolite azaperol after oral administration of azaperone in food-producing pigs. Rev Toxicol. 2013, 30, 209-213.

NIEMEGEREERS, C. J. E.; Van NUETEN, J. M.; JANSSEN, P. A. J.: Azaperone, a sedative neuroleptic of the butyrophenone series with pronounced anti-aggressive and anti-shock activity in animals. Arzneim.-Forsch. 1974, 24, 1798-1806.

PORTER, D. B.; SLUSSER, C. A.: Azaperon – a review of a new neuroleptic agent for swine. Vet Med. 1980, 80, 88-92.

TAN, S. S. L.; SHACKLETON, D. M.: Effects of mixing unfamiliar individuals and of azaperone on the social behaviour of finishing pigs. Appl Anim Behav Sci. 1990, 26, 157-168.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI. 117/2021/FVL

Vliv vyhřívání dýchacího okruhu na tělesnou teplotu psů při umělé ventilaci

Lukáš Novák, Tereza Pipišová, Laura Staňková

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

Úvod

V humánní i veterinární praxi patří hypotermie mezi nejčastější komplikace anestezie (1). Hypotermie je spojována s celou řadou komplikací vyskytujících se v průběhu anestezie nebo po ní (2). Ve veterinární medicíně se vyskytne až u 83 % pacientů podstupujících celkovou anestezii (3).

Rozlišujeme 3 základní techniky k minimalizaci teplotních ztrát v průběhu anestezie - metabolické, pasivní a aktivní (4). Metabolické metody zvyšují teplotní produkci organismu, zejména aplikací aminokyselin (5). Jejich využití ve veterinární medicíně je zatím velmi omezené. Pasivní metody zahrnují zejména použití dek, ručníků, bublinové fólie případně izotermické fólie a jejich aplikace pod, respektive okolo pacienta (4). Samy o sobě jsou pasivní metody méně účinné než metody aktivní. Mezi aktivní metody vyhřívání pacienta patří zejména použití generátorů tepla ve formě vyhříváných dek nebo podložek (4). Další možností je využití vyhřívání inhalačního okruhu. Řada studií se věnuje srovnáním nejrůznějších forem ohřívadel umístěných vně pacienta (6).

Cílem této studie je zjistit jaký vliv má samotné použití vyhřívání inhalačního okruhu na rozvoj hypotermie při umělé ventilaci. Předpokládáme, že při použití vyhřívání dýchacího okruhu nedojde k tak výraznému poklesu tělesné teploty.

Materiál a metodika

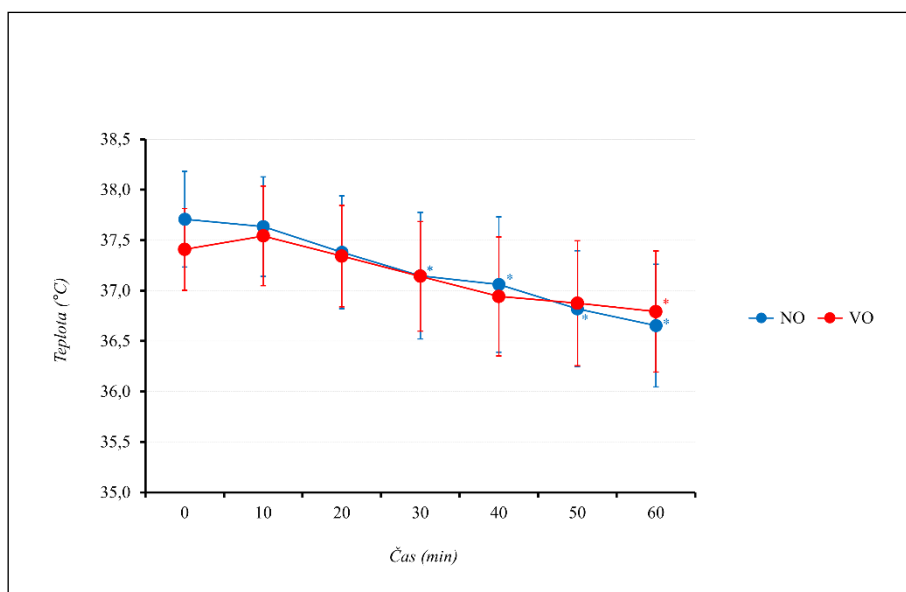
Do studie bylo zařazeno 40 zdravých psů podstupujících stomatologické ošetření v celkové anestezii. Všichni psi byli ve věku 1 – 10 let a o tělesné hmotnosti 10 – 30 kg. Studie svým rozsahem nepřekračovala běžně prováděné výkony, proto nebyl vyžadován projekt pokusu. Všichni psi byli před premedikací klinicky vyšetřeni, byla jim změřena tepová a dechová frekvence, systolický a diastolický krevní tlak a rektální teplota. Premedikace celkové anestezie probíhala pomocí 0,01 mg kg⁻¹ medetomidinu (Domitor, Orion Pharma, Finsko) a 0,2 mg kg⁻¹ butorfanolu (Butomidol, Vetoquinol, Francie), které byly podávány společně v jedné injekci intravenózně. Pro úvod do celkové anestezie byl použit propofol (Propofol, Vetoquinol, Francie) v dávce 1 – 2 mg kg⁻¹. Psi byli následně zaintubováni a připojeni na okruhový, polouzavřený dýchací systém. Anestezie byla vedena s využitím izofluranu (Aerrane, Baxter S.A., Belgie) ve směsi kyslíku a vzduchu. Psi byli po celou dobu anestezie ve hřbetní poloze. Psi byli náhodně rozděleni do dvou skupin - skupina NO (n = 20) a skupina VO (n = 20). Psi ve skupině NO byli připojeni na dýchací okruh bez vyhřívání hadic. Psi ve skupině VO byli připojeni na dýchací okruh s využitím

vyhříváče spojovacích hadic. Teplota vyhřívání byla nastavena na 45,0 °C. Pacienti obou skupin byli po celou dobu ventilováni uměle (DF 15 dechů/min, PIP 12 cmH₂O, PEEP 2 cmH₂O). Pacientům obou skupin byla měřena tracheální (T-TRA), jícnová (T-ESO) a rektální (T-REK) teplota, tepová (SF) a dechová frekvence (f_R), systolický a diastolický krevní tlak (oscilometricky), ze kterých byl poté vypočítán střední arteriální tlak (TK-stř) a parciální tlak oxidu uhličitého ve vydechovaném vzduchu (EtCO₂). Zároveň byla měřena teplota inspiračních plynů (T-INS) a okolní teplota (T-OKO). Hodnoty byly zaznamenávány v momentu připojení na dýchací systém (T0) a poté v desetiminutových intervalech po dobu 60 minut (T10 – T60). Data byla statisticky zhodnocena analýzou rozptylu (ANOVA) a Dunnettovým testem ($p < 0,05$)

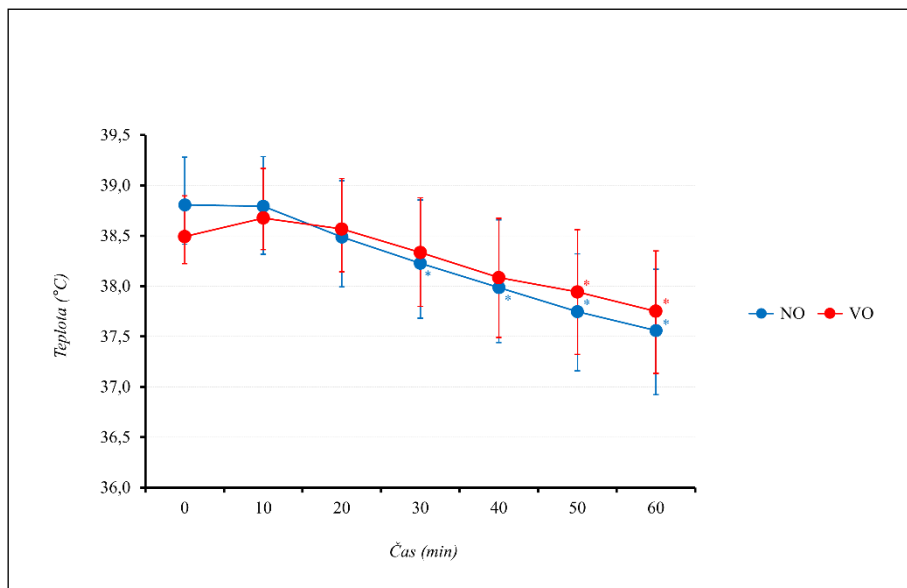
Výsledky

Kolísání hodnot T-TRA je znázorněno v grafu č. 1, T-ESO v grafu č. 2 a T-REK v grafu č. 3. Ve skupině NO byla T-TRA a T-ESO signifikantně nižší v porovnání s T0 v časech T30, T40, T50 a T60. Významně nižší T-REK byla zjištěna v porovnání s T0 v časech T40, T50 a T60. Ve skupině VO byla T-TRA významně snížena oproti T0 v čase T60. Hodnoty T-ESO a T-REK byly významně sníženy oproti T0 v časech T50 a T60. Mezi oběma skupinami nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly sledovaných teplot v jednotlivých časech.

Graf č. 1: **Kolísání hodnot tracheální teploty psů bez vyhřívání okruhu (NO) a s vyhříváním okruhu (VO)** (body znázorňují průměr, úsečky směrodatnou odchylku, * označuje statisticky významné snížení v porovnání s T0)

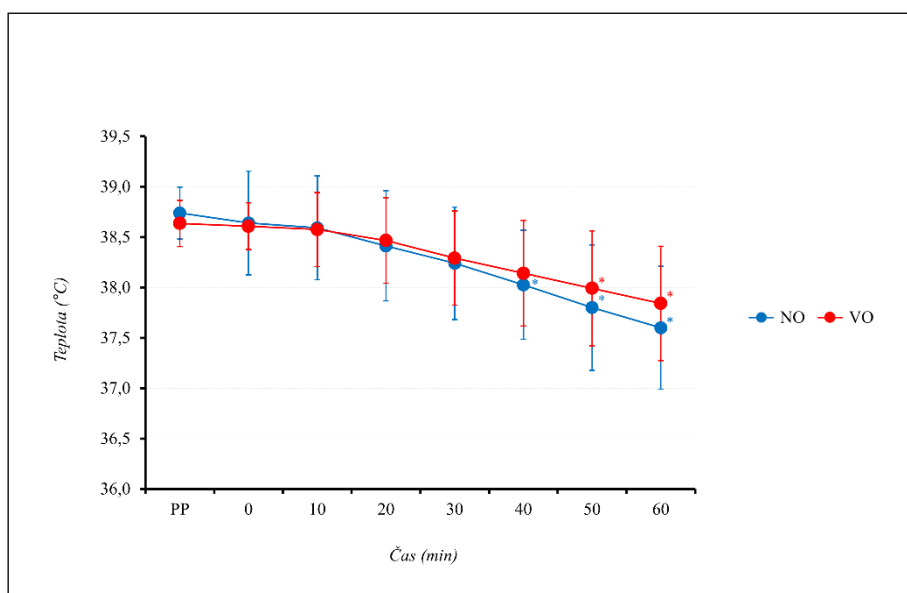


Graf č. 2: Kolísání hodnot jícnové teploty psů bez vyhřívání okruhu (NO) a s vyhříváním okruhu (VO) (body znázorňují průměr, úsečky směrodatnou odchylku, * označuje statisticky významné snížení v porovnání s T0)



Hodnoty SF byly u skupiny NO významně vyšší oproti T0 v časech T50 a T60. U skupiny VO byla SF významně vyšší oproti T0 v časech T40, T50 a T60. Mezi oběma skupinami jsme nezaznamenali statisticky významné rozdíly srdeční frekvence v jednotlivých sledovaných časech.

Graf č. 3: Kolísání hodnot rektální teploty psů bez vyhřívání okruhu (NO) a s vyhříváním okruhu (VO) (PP = hodnota před premedikací, body znázorňují průměr, úsečky směrodatnou odchylku, * označuje statisticky významné snížení v porovnání s T0)



Hodnoty TK-stř byly ve skupině NO statisticky významně nižší ve srovnání s T0 v časech T40, T50 a T60. U skupiny VO jsme významné změny TK-stř oproti T0 nezjistili. Mezi jednotlivými skupinami nebyl zjištěn významný rozdíl v hodnotách TK-stř v jednotlivých sledovaných časech. Rozdíly dalších měřených hodnot uvnitř nebo mezi skupinami nebyly zjištěny.

Závěr

V průběhu anestezie s použitím medetomidinu, butorfanolu, propofolu a izofluranu dochází k významnému poklesu tělesné teploty již po 30 minutách anestezie. Pokles teploty je srovnatelný bez ohledu na to, zda jsou psi napojeni na vyhříváný nebo nevyhříváný dýchací okruh.

Seznam literatury:

- (1) Armstrong SR, Roberts BK, Aronsohn M 2005: Perioperative hypothermia. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 15: 32-37.
- (2) Brandt S, Oguz R, Hüttner H, Waglechner G, Chiari A, Greif R, Kurz A, Kimberger O 2010: Resistive-Polymer Versus Forced-Air Warming: Comparable Efficacy in Orthopedic Patients. 110: 834-838.
- (3) Redondo JJ, Suesta P, Serra I, Soler C, Soler G, Gil L, Gómez-Villamandos RJ 2012: Retrospective study of the prevalence of postanaesthetic hypothermia in dogs. *Veterinary Record* 171: 374-374.
- (4) Clark-Price S 2015: Inadvertent Perianesthetic Hypothermia in Small Animal Patients. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 45: 983-994.
- (5) Takashima S, Shibata S, Yamada K, Ogawa M, Nishii N, Kitagawa H 2016: Intravenous infusion of amino acids in dogs attenuates hypothermia during anaesthesia and stimulates insulin secretion. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 43: 379-387.
- (6) Clark-Price SC, Dossin O, Jones KR, Otto AN, Weng H-Y 2013: Comparison of three different methods to prevent heat loss in healthy dogs undergoing 90 minutes of general anesthesia. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 40: 280-284.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 109/2021/FVL

Vyhledání optimálního ředidla pro mrazení epididymálních spermií hřebců

Petra Andrlová, Miroslava Mráčková, Michaela Kabešová, Hana Novotná, Markéta Sedlinská
*Oddělení reprodukce, Klinika chorob koní, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a
farmaceutická univerzita Brno*

Úvod

Kryokonzervace epididymálních spermií je metoda, která umožňuje záchranu genetického materiálu cenných zvířat při krizových situacích, neboť je známo, že spermie dokážou v kastrováných, správně uchovávaných nadvarlatech přežít až 96 hodin (Vieira et al. 2013). A protože se jedná právě o finální kolekci spermií, je důležité používat optimální protokol pro jejich zpracování a mrazení. Úspěch kryokonzervace hřebčích epididymálních spermií závisí na teplotě skladování biologického materiálu, rychlosti ochlazování, hygienické kontrole a chemickém složení ředidla (Barbas et al. 2009). V předchozích letech se týmu andrologické laboratoře Kliniky chorob koní podařilo již stanovit precizní metodiku pro zpracování epididymálních spermií hřebců. Z minulé studie podporované interní grantovou agenturou IGA 115/2020/FVL, vyplynula ideální koncentrace spermií pro mrazení (1000×10^6 v ml) a koncentrace glycerolu (4 %), ale ani u této nejlepší kombinace nebyla motilita spermií po rozmrazení uspokojivá. Spermie byly mrazeny pouze v jednom typu ředidla (Gent) a bylo by tedy vhodné pokusit se najít vhodnější ředidlo právě pro mrazení epididymálních spermií. Předkládaný projekt je zaměřený na porovnání 4 běžně dostupných a nejčastěji používaných ředidel pro koňské spermie (INRA 96, Gent, francouzské ředidlo a BotuSemen GOLD), které jsme doplnili na námi zjištěnou nejlepší koncentraci glycerolu 4 % a vyhledali tak optimální ředidlo pro mrazení epididymálních spermií hřebců. I když na toto téma již podobné studie publikovány byly (Neuhauser et al. 2018, Neuhauser et al. 2019), ve všech studiích je při mrazení použita nižší koncentrace spermií a různé koncentrace glycerolu, dalším nezanedbatelným rozdílem je také to, že motilita spermií po rozmrazení není ve studiích pozorována po dobu 3 hodin, které jsou rozhodující, proto aby spermie dosáhly vejcovodu, kde dochází k oplození vajíčka.

Materiál a metodika

V projektu byla použita varlata s nadvarlaty získaná při kastraci zdravých hřebců na Klinice chorob koní a při kastracích v terénních podmínkách, kdy ke zpracování spermií došlo nejdéle do 12 hodin po kastraci, aby prodleva mezi kastrací a zpracováním epididymálních spermií neovlivnila výsledky studie.

Postup získání spermií

Po kastraci byl peánem uzavřen *ductus deferens*, varlata byla omyta sterilním fyziologickým roztokem a transportována do laboratoře. Zde byla znovu omyta sterilním fyziologickým roztokem. V průběhu další preparace bylo od varlete odděleno nadvarle, ze kterého byly odstraněny povázky a oddělen ocas nadvarlete s *ductus deferens*, neboť tyto části nadvarlete obsahují zralé spermie použitelné pro přípravu inseminačních dávek. Ocas nadvarlete a *ductus deferens* z každého varlete byli samostatně propláchnuty retrográdním směrem pomocí roztoku pro centrifugaci spermií, čímž byl získán směsný vzorek spermií.

Po získání spermií došlo k orientačnímu posouzení motility spermií ve světelném mikroskopu (Motilita 0). V případě, že motilita získaných spermií byla zhodnocena jako nižší než 10 %, vzorek byl z pokusu vyloučen. Dále byla motilita spermií objektivně posouzena pomocí CASA systému (Motilita I), vzorky byly zcentrifugovány, supernatant odsát a spermie resuspendovány v ředidlech tak, abychom získali 4 vzorky o koncentraci spermií 1000×10^6 v ml s různými ředidly: INRA 96, francouzské ředidlo, BotuSemen GOLD a Gent, které budou obsahovat 4 % glycerolu. Motilita u každého vzorku byla následně vyhodnocena na přístroji CASA (Motilita II₁₋₄).

Všechny vzorky byly rozplněny do označených pejet (*Minitübe International*) a zamrazeny v tekutém dusíku běžným postupem pro mrazení hřebčího ejakulátu v andrologické laboratoři Kliniky chorob koní: po dvouhodinové ekvilibraci pejet při chladničkové teplotě, byly pejety zamrazeny za použití poloautomatického systému od firmy *Minitübe International*, kdy pejety jsou ve speciálním zařízení umístěny nejprve do par tekutého dusíku a postupně klesají směrem k hladině tekutého dusíku, do kterého klesnou cca po 20 minutách od umístění pejet do mrazicího boxu.

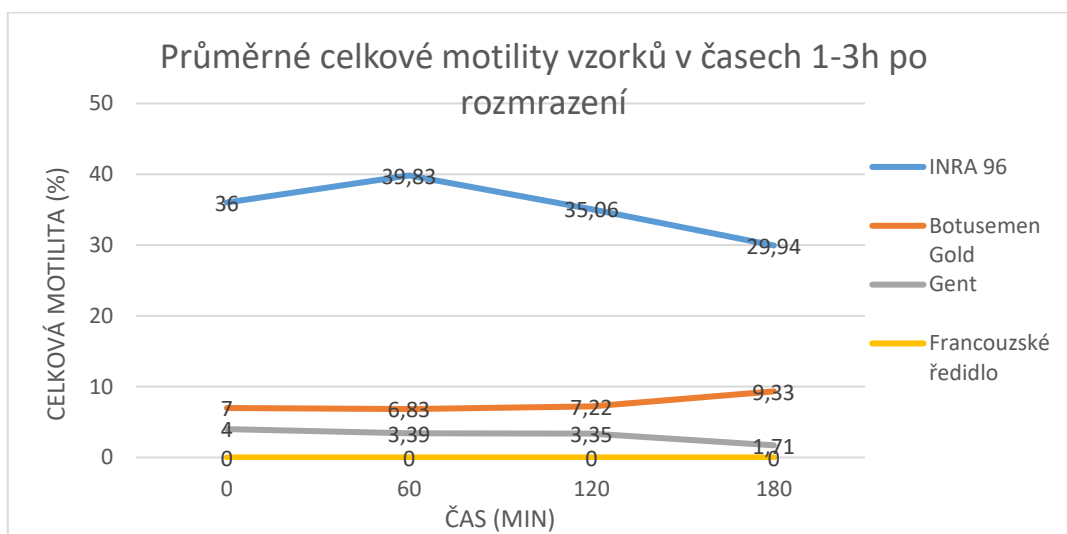
Nejdříve po pěti dnech od zamrazení byly pejety rozmrazeny při teplotě 38 °C po dobu 30 vteřin a na přístroji CASA byla posouzena motilita spermií bezprostředně po rozmrazení vzorku (Motilita III₁₋₄). Dále byly všechny vzorky ponechány ve vodní lázni při teplotě 38 °C a motilita spermií byla posouzena za 60; 120 a 180 minut po rozmrazení (motilita IV₁₋₄, V₁₋₄, VI₁₋₄).

Výsledky

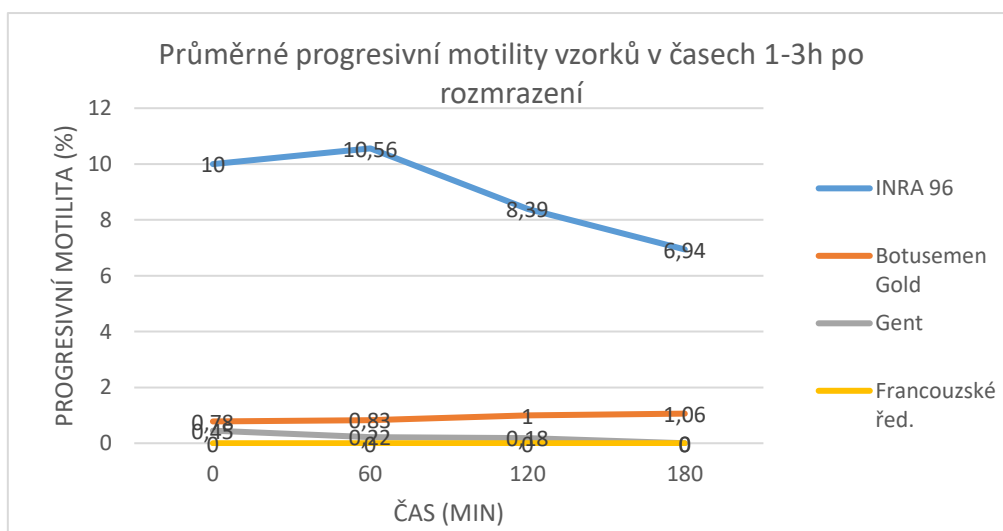
Hlavním cílem projektu bylo ověřit teorii, že motilita epididymálních spermií po rozmrazení je rozdílná v závislosti na použitém ředidle a vyhledat optimální kryokonzervační ředidlo. Vycházeli jsme z předchozích poznatků studie podporované interní grantovou agenturou IGA 115/2020/FVL, ze které vyplynula ideální koncentrace spermií 1000×10^6 v ml, s přídavkem glycerolu 4 %. Z výsledků celkové a progresivní motility, uvedené v Grafech č. 1. a 2., je jasně zřetelné, že motilita epididymálních spermií je silně ovlivněna použitým kryokonzervačním ředidlem. Nejlepší motilitu

vykazovaly vzorky naředěné ředidlem INRA 96, u těchto vzorků byla i po 180 min inkubace zaznamenána téměř 30% motilita, což je motilita dostačující k praktickému využití. Proces kryokonzervace je často devastující pro téměř polovinu motilních spermií, nicméně u vzorků, u kterých byla použita ředidla Botusemen Gold a Gent byl tento pokles ještě vyšší (z 40-45% na 4-7% po rozmrazení). Vzorky naředěné francouzským ředidlem vykazovaly ve většině případech nulovou motilitu již před mrazením, domníváme se, že došlo k chybné přípravě tohoto diluenciu, které není komerčně dostupné.

Graf č. 1. Průměrné hodnoty (%) celkové motility vzorků v jednotlivých časech po rozmrazení



Graf č. 2. Průměrné hodnoty (%) progresivní motility vzorků v jednotlivých časech po rozmrazení



Do celkového vyhodnocení bylo zařazeno celkem 18 vzorků. Několik vzorků bylo ze studie vyřazeno kvůli nízkým motilitám již po preparaci a výplachu z nadvarlat, při výplachu některých varlat nebylo získáno dostatečné množství spermií, aby mohly být připraveny vzorky se všemi koncentracemi.

Závěr

Velkým přínosem projektu je zisk pro praxi využitelné laboratorní metodiky na zpracování epididymálních spermií hřebců. V naší praxi se jako nejideálnější ukázalo použití ředidla INRA 96, s koncentrací spermií 1000×10^6 v ml a přídatkem kryoprotektiva glycerol 4 %. Protože jsme výzkum provedli u relativně malého množství vzorků, je třeba ve výzkumu dále pokračovat a doposud získané výsledky ověřit. Nicméně právě díky této studii nám bylo umožněno získat první výsledky a vytvořit precizní metodiku, která je použitelná nejen pro další výzkum, ale i pro praktické použití v kritických situacích.

Seznam literatury:

1. Vieira L. A., Gadea J., García-Vázquez F. A., Avilés-López K., Matás C., Equine spermatozoa stored in the epididymis for up to 96 h at 4 °C can be successfully cryopreserved and maintain their fertilization capacity, *Animal Reproduction Science*, 2013(136), 280-288.
2. Barbas, J. P., Mascarenhas, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells, *Cell Tissue Bank*, 2009 (10), 49–62.
3. Neuhauser, S., Gösele, P., Handler, J., The effect of four different commercial semen extenders on the motility of stallion epididymal sperm, *Journal of Equine Veterinary Science*, 2018 (62), 8-12.
4. Neuhauser, S., Bollwein, H., Siuda, M., Handler, J., Comparison of the Effects of Five Semen Extenders on the Quality of Frozen-Thawed Equine Epididymal Sperm, *Journal of Equine Veterinary Science*, 2019 (79), 1-8.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 111/2021/FVL

Využití imunokoncepcie v regulaci pohlavní aktivity prepubertálních kozlů

Eva Indrová¹, Adriena Hochmanová¹, Jakub Urban², Vladimír Sládek²

Klinika chorob přežvýkavců a prasat, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno¹, student 5. ročníku, Fakulta veterinárního lékařství²

Úvod

Tzv. imunologická kastrace neboli vakcinace, je založena na principu injekčně aplikované látky, která navodí produkci protilátek proti gonadoreleasing hormonu (GnRH). GnRH je zodpovědný za stimulaci tvorby gonadotropních hormonů LH a FSH. Zatím jedinou registrovanou vakcínou v ČR, kterou lze používat k imunologické kastraci, je přípravek Improvac (syntetický peptidový analog GnRH spojený s Diphtheria Toxoidem, výrobce Zoetis) určený pro prasata. Účinky imunokastrace na pohlavní aktivitu kanců jsou zdokumentovány velmi dobře¹. U malých přežvýkavců je provedených studií velmi málo². V minulém roce jsme díky získání financí z projektu IGA VFU Brno (IGA 108/2020/FVL) měli možnost zkoumat vliv přípravku Improvac na pohlavní aktivitu pohlavně dospělých kozlů. Z výsledků pokusu vyplývá, že preparát Improvac má významný imunokonceptivní účinek. Měl by však být primárně určen pro jedince pohlavně nedospělé, jež jsou chováni pro výkrm a následnou porážku. Nikde však není udáváno, po jakou dobu bude preparát u těchto věkových kategorií působit. V našem pokusu jsme se zaměřili na kontinuální sledování nástupu účinku preparátu Improvac na pohlavní aktivitu prepubertálních kozlů, kterou jsme zjišťovali pomocí měření koncentrací testosteronu, měření velikosti plochy varlat, vyšetření ejakulátu a histologického vyšetření tkáně varlat u kozlů z průběžných bioptických odběrů.

Materiál a metodika

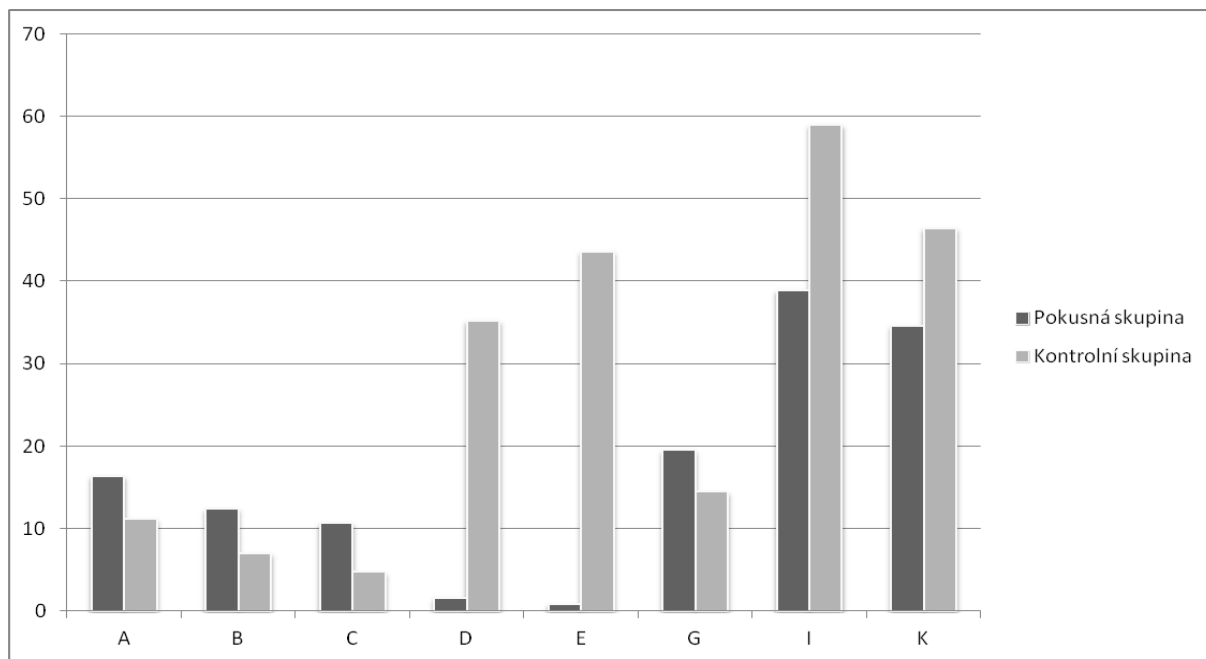
Kozli (celkem 20 ks) byli nakoupeni již jako 14 denní a jsou ustájeni na Klinice chorob přežvýkavců a prasat. Pokusy byly zahájeny u kozlů ve věku 3 měsíců (polovina června) a ukončení je plánované na konci prosince. Pokusné skupině (10ks) byl aplikován preparát Improvac (s.c., 2 ml pro toto), aplikace byla zopakována za 4 týdny. Kozlíkům je v intervalu 14 dní odebírána krev venepunkcí v. *jugularis*. Sérum je odesíláno do laboratoře Synlab ke stanovení koncentrace testosteronu. Současně je měřena velikost varlat pomocí posuvného měřítka (délka a šířka), z nichž je následně vypočítána plocha. Zároveň je od počátku října (věk kozlíků 6 měsíců) prováděna elektroejakulace ve 14 denních intervalech. Ejakulát je vyšetřován na analyzátoru spermatu (CASA), současně je sledována integrita membrán (barvení eosin/nigrosin) a jsou zhotoveny preparáty pro následné morfologické vyšetření. Koncentrace spermií je počítána v Burkerově komůrce. Doposud je provedeno 5 odběrů vzorků a jsou plánovány ještě dva odběry. První biopsie varlat je vždy provedena u kozlíka při zvětšení plochy

varlat na úroveň $\frac{3}{4}$ průměrné plochy v kontrolní skupině. Excizní biopsie jednorázovou bioptickou jehlou je prováděna v krátkodobé celkové anestezii izofluranem pomocí inhalační masky, v premedikaci xylazin 0,2 mg/kg i.m. a butomidol 0,02 mg/kg i.m. Biopsie následně probíhají 1x měsíčně, maximálně 4x. Biopáty jsou fixovány v 10% formaldehydu a dále zpracovány obvyklým způsobem v histologické laboratoři Ústavu histologie a embryologie VETUNI Brno. Histologické vyšetření spermatogenního epitelu semenotvorných kanálků varlat je prováděno na Klinice chorob přežvýkavců. Kontrolní skupině (10ks) nebyl podán preparát Improvac, ale pouze fyziologický roztok 2 ml pro toto s.c. Odběr krve a měření varlat probíhá dle stejného schématu jako u pokusné skupiny. Elektroejakulace byla započata současně s pokusnou skupinou, zároveň u 4 kozlíků byly započaty bioptické odběry varletní tkáně. Oba zákroky probíhají 1x měsíčně. V kontrolní skupině došlo v průběhu pokusu k úhynu jednoho jedince na respirační onemocnění a jeden jedinec byl vyřazen z důvodů nevhodnosti (kolaps po elektroejakulaci). Celkem tedy zůstalo 8 kontrolních kozlů.

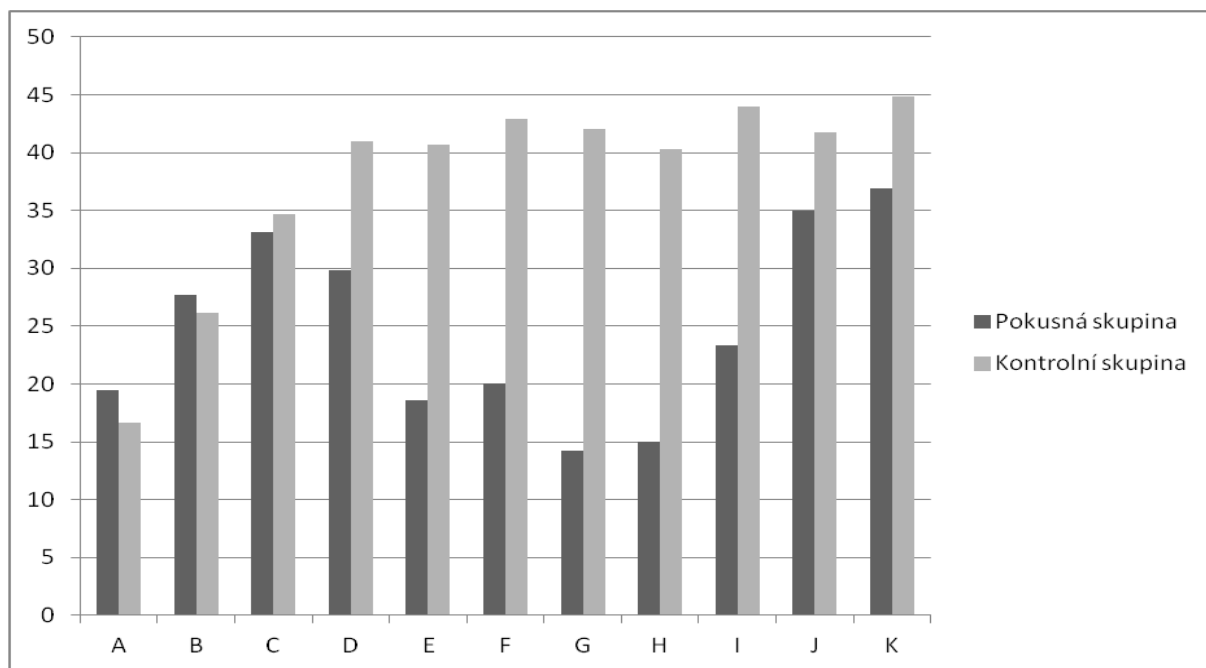
Výsledky

Z výsledků je jasně patrné, že po první aplikaci preparátu dochází ke zvýšení ($p < 0,05$) koncentrace testosteronu ve srovnání s kontrolní skupinou, naopak 14 dní po druhé aplikaci je v pokusné skupině pozorován výrazný pokles testosteronu ($p < 0,0001$), hladina testosteronu se však již po třech měsících po první aplikaci vrací do hodnot shodných s kontrolní skupinou. (Graf 1). Velikost varlat se měnila v závislosti na hodnotách testosteronu, statisticky signifikantní ($p < 0,05$) zmenšení plochy obou varlat bylo zaznamenáno 14 dní po druhé aplikaci. Za dalších 14 dní již byl tento rozdíl vysoce signifikantní ($p < 0,0001$) a přetrval až do 4 měsíců od 1. aplikace preparátu. Následně byla obě varlata bez signifikantních rozdílů ve srovnání s kontrolní skupinou (Graf 2). Odběry ejakulátů byly započaty po 4 měsících od první aplikace preparátu. V pokusné skupině byl získán ejakulát pouze od 4 kozlíků s počtem spermií v průměru kolem 200 tis. spermií/ml a motilitou 65%. Koncentrace spermií v kontrolní skupině byla přes 1 mil spermií/ml a motilita 72%. Za 14 dní byla prováděna elektroejakulace pouze v pokusné skupině a byl získán ejakulát od 7 kozlů, avšak 4 jedinci měli azospermii. Za měsíc již byl získán ejakulát od 9 jedinců, avšak šest jedinců se pohybovalo s koncentrací pod 100 tisíc spermií/ml a motilitou pod 50%. Koncentrace v kontrolní skupině se pohybovala v průměru okolo 700 tis. spermií/ml a motilitou 66%. U pokusné skupiny je pozorována tendence ke zvyšování motility i koncentrace spermií. Při posledním odběru (6 měs. po první aplikaci preparátu) byla však stále koncentrace jen u 4 kozlů nad 500 tis. (min. 5 tis., max. 1,5 mil.), avšak motilita se již pohybuje u většiny nad 70%. Kontrolní skupina má průměrnou koncentraci okolo 900 tis. (min. 110 tis., max. 2 mil.) a motilita se pohybuje stále v průměru okolo 66%. Vyšetření integrity membrán vykazuje postupný nárůst procenta živých spermií v pokusné skupině, v posledních odběrech se pohybuje v průměru okolo 43% (s minimem 7% a maximem 66%). V kontrolní skupině

je procento živých spermií v průměru 66%. Velmi překvapivé jsou výsledky morfologií spermií. Pokud se již povede odběr ejakulátu s přítomností spermií je minimálně 60% normospermických. Prozatím se v průměru všechny ejakuláty pohybovaly nad 80% normospermie. U kontrolní skupiny se hladina normospermie pohybuje nad 90%. Histologické vzorky zatím nebyly zpracovány.



Graf 1: Průměrné hodnoty koncentrace testosteronu měřených v rozestupu 14 dnů (A-E) a následně jedenkrát měsíčně (E –K) u pokusné a kontrolní skupiny.



Graf 2: Průměrné hodnoty plochy varlat v jednotlivých odběrech (A-K) prováděných v rozestupu 14 dnů u pokusné a kontrolní skupiny.

Diskuse a závěr

V tomto experimentu byl jasně prokázán vliv preparátu Improvac na varletní tkáň prepubertálních kozlíků. Došlo k poklesu testosteronu, ke zmenšení plochy varlat a ke zpožděnému nástupu spermiogeneze ve srovnání s kontrolní skupinou. Délka trvání účinku preparátu je u všech kozlů 2,5 měsíce po 2. aplikaci Improvacu, což je délka deklarovaná výrobcem u kanců. Následně je nástup spermiogenezy velmi závislý na jednici. Někteří kozli mají i 5 měsíců po 2. aplikaci velmi nízkou koncentraci spermií s nízkou či nulovou motilitou.

Seznam literatury:

1. Wicks N., Crouch S., Pearl CA. : Effects of Improvac and Bopriva on the testicular function of boars ten weeks after immunization. Anim Reprod Sci. 2013; 142: 149-59.
2. Needham T., Lambrechts H. and Hoffman L.: Influence of immunocastration vaccine administration interval on serum androgen concentrations and testis activity in ram lambs. Small Ruminant Research 2019; 170: 82–90.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 103/2021/FVL

Příspěvky

Fakulty veterinární hygieny a ekologie

Hodnocení sensorických, fyzikálních a chemických vlastností vybraných analogů masa a analogů masných výrobků

Fouad Ali Abdullah, Eliška Kabourková, Markéta Šinková, Miriam Danihlíková

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

Úvod

Na trhu jsou dostupné masové analogové produkty různých druhů. Například rostlinné maso, jehož struktura a chuť je podobná jako u běžného masa (1). Nároky na vývoj nového potravinářského produktu, který uspokojí poptávku spotřebitelů, jsou však velmi náročné. Kvalita, výživa a sensorické vlastnosti jsou prvními parametry, které je třeba vzít v úvahu před vytvořením stravy založené na rostlinných bílkovinách (2, 3). Úspěšné kombinace funkčních přísad a metod zpracování vedou ke generování sensorických atributů podobných masu, které jsou nezbytné k vzbuzení pozornosti u nevegetariánských spotřebitelů (4). Analogy masa jsou přijímány vegetariány a veganskými spotřebiteli, kteří se vyhýbají konzumaci masa z etických, ekologických nebo zdravotních důvodů (5). Takové výrobky však nejsou tak populární mezi konzumenty masa a flexitaristy kvůli jejich nízké smyslové přitažlivosti (6).

Sensorické hodnocení kombinované s instrumentálními opatřeními, jako je struktura a barva, může být výhodné a může pomoci zlepšit konečný produkt. Budoucí aplikace těchto metod mohou zahrnovat integraci sensorických testů během vývoje produktu k lepšímu přímému zpracování a formulaci produktu. Provedením sensorického hodnocení se společností a výzkumní pracovníci dozví cenné informace týkající se atributů produktů a celkových sympatií, které pomáhají poskytovat obecněji přijímané a udržitelné potraviny (4).

Cílem této práce bylo hodnocení sensorických vlastností (v syrovém stavu a po tepelném zpracování) a vybraných parametrů (barva, struktura, atmosféra) ve vybraných analogích masa a analogích masných výrobků a porovnat je se stejnými výrobky z konvenční produkce.

Materiál a metodika

V této práci byly použity masné výrobky a jejich veganské alternativy, které jsou běžně dostupné v tržní síti v ČR. Konkrétně se jednalo o mleté maso (MM) Bidfood Kralupy s.r.o., alternativu Veganské mleté (MV) Garden Gourment, hovězí burger (BM), Chovservis a.s.; veganskou alternativu burgeru (BV) Garden Gourment; vepřový řízek (RM) Matušák Agrion s.r.o. Dále veganskou alternativu řízku (RV) Garden Gourment. Maďarskou klobásu Mives hot (KM) Pick Szeged a její alternativu Maďarská klobaňa smoked classic – vegan (KV) Good Nature s.r.o. Vepřový

párek (PM) Tesco Stores CZ a.s.; veganskou alternativu soya frankfurtes classic (PV) Well Well potraviny s.r.o. Salám junior (SM), Kostelecké uzeniny a.s. a jeho alternativu soy salami (SV) od společnosti KALMA, k.s. Dále veganské nudličky (VN) a veganské filety (VF) Garden Gourment.

Senzorické hodnocení

Každý z následujících výrobků: MV, MM, BV, BM, RV, RM, KV, KM, PV, PM, SV a SM byl hodnotiteli hodnocen před a po tepelné úpravě; anonymně. Tepelná úprava byla provedena dle pokynů uváděných výrobcem daného produktu. Hodnocení probíhalo ve zkušební místnosti vybavené hodnotitelskými kójiemi dle ČSN ISO 8589. Výsledky byly statisticky zpracovány jednofaktorovým testem ANOVA, v MS Office Excel.

Fyzikální vlastnosti

Barva

U těchto vzorků: MV, MM, BV, BM, RV, RM, KV, KM, PV, PM, SV a SM byla měřena barva pomocí spektrofotometru CM-5 (Konica Minolta Sensing, Inc., Japan) dle the CIE L*a*b* systému. Naměřené hodnoty byly zpracovány pomocí SpectraMagic NX Color Data Software s tím, že každý vzorek byl změřen 5x, z čehož byla spočítána směrodatná odchylka pro každý vzorek.

Textura

Za pomoci přístroje Instron Universal Testing Machine (model 5544) (Instron Corporation, United Kingdom) a softwaru Merlin, Series IX byla měřena textura. Jednalo se o měření tvrdosti a soudržnosti těchto vzorků: MV, MM, BV, BM, KV, KM, PV, PM, SV a SM. Tyto vzorky byly upraveny do válcového tvaru o výšce 1 cm a průměru 1,25 cm a poté dvakrát stlačeny kompresní deskou do dosažení 50 % jejich původní výšky při rychlosti 50mm/min. U zbylých vzorků, RM a RV, byl použit Warner-Bratzlertest test k měření smykové síly v Newtonech a tuhost v kPa. Tyto vzorky byly upraveny tak, aby každý vzorek byl 1 cm široký, 1 cm vysoký a 2 cm dlouhý. Rychlost měření byla 80 mm/min. Pro každý vzorek byl spočítán průměr z 5 měření a směrodatná odchylka.

Chemické vlastnosti

U alternativních veganských výrobků balených v ochranné atmosféře: RV, NV, FV, BV, MV, byla měřena atmosféra za pomoci stolního analyzátoru Check Mate 3 (PBI Dansensor, Ametek Mocon). Konkrétně byl měřen obsah kyslíku, oxidu uhličitého a dusíku. Každý ze vzorků byl změřen 2x a byl spočítán průměr a směrodatná odchylka.

Výsledky

Tabulka 1. Senzorické hodnocení produktů před a po tepelné úpravě – vybrané parametry alternativ – rozdílná písmena ^{a,b} označují statisticky průkazný rozdíl mezi produkty *p < 0,05

Produkt	Celkový vzhled – před tepelnou úpravou	Dojem po ochutnání – po tepelné úpravě
MV	73,7±24,8 ^a	57±21,8
MM	32,9±31,7 ^b	48,9±24,6
BV	71,5±26,6 ^a	55±35 ^a
BM	78,5±24,8 ^b	60,1±26,7 ^b
RV	90,3±18 ^a	66,3±31,2
RM	70,2±26,1 ^b	82±19,8
KV	75,3±26,38 ^a	33,8±34,2 ^a
KM	92,8±10,9 ^b	83,5±19,4 ^b
PV	75±25,3 ^a	38,5±26,2 ^a
PM	89,4±15,6 ^b	76±21,7 ^b
SV	49,2±24,1 ^a	34±20,8 ^a
SM	87,4±13,3 ^b	71,8±17,4 ^b

Tabulka 2. Barva masných výrobků a jejich veganských alternativ – rozdílná písmena ^{a,b} označují statisticky průkazný rozdíl mezi produkty *p < 0,05

	L*	a*	b*	C*	h°
MV	51.84±0.85 ^a	12.96±0.40 ^b	16.31±0.48 ^a	20.84±0.59	51.52±0.58 ^a
MM	43.90±1.62 ^b	15.39±1.19 ^a	13.05±1.02 ^b	20.19±1.40	40.30±1.96 ^b
BV	53.92±1.04 ^a	10.58±0.47 ^a	12.98±0.53 ^a	16.75±0.66 ^a	50.83±0.91 ^b
BM	47.27±3.08 ^b	7.33±0.96 ^b	10.91±0.92 ^b	13.16±1.20 ^b	56.16±2.55 ^a
RV	58.06±1.19 ^a	15.64±1.58 ^a	30.18±2.57 ^a	34.00±2.92 ^a	62.62±1.29
RM	51.88±3.07 ^b	10.61±0.65 ^b	20.56±2.09 ^b	23.15±1.98 ^b	62.59±2.16
KV	29.75±3.06 ^b	23.32±2.53	10.54±0.89 ^b	25.59±2.66	24.40±0.82 ^b
KM	34.05±0.77 ^a	21.70±0.79	15.38±0.96 ^a	26.60±1.16	35.31±1.02 ^a
PV	57.63±1.10 ^b	15.30±0.31	25.13±0.42 ^b	29.42±0.50	58.67±0.24
PM	64.63±1.75 ^a	14.94±0.96	32.90±1.35 ^a	36.14±1.55	65.60±0.90
SV	45,12±0,32 ^b	21,93±0,48 ^a	21,71±0,27 ^a	30,86±0,51 ^a	44,72±0,39 ^b
SM	57,61±0,27 ^a	12,54±0,29 ^b	14,09±0,18 ^b	18,86±0,31 ^b	48,34±0,37 ^a

Tabulka 3. Textura masných výrobků a jejich veganských alternativ – rozdílná písmena ^{a,b} označují statisticky průkazný rozdíl mezi produkty *p < 0,05

	Tvrdość (N)	Soudržnost (N)
KV	7.36±1.07 ^b	1,05±0,01 ^b
KM	25.22±3.70 ^a	1,28±0,02 ^a
PV	8.70±0.59	1,19±0,01
PM	13.89±1.92	1,19±0,03
BV	1.25±0.15 ^b	0,96±0,06
BM	2.98±0.33 ^a	1,12±0,02 ^a
MV	2.05±0.18	1,00±0,04 ^b
MM	2.04±0.22	1,11±0,04 ^a

	Smyková síla (N)	Tuhost (kPa)
RV	13,12±2,35 ^b	61,79±13,33 ^b
RM	21,09±2,70 ^a	72,55±6,57 ^a

*S.S. statistická průkaznost

Tabulka 4. Atmosféra veganských alternativ masných výrobků balených v ochranné atmosféře – rozdílná písmena ^{a,b} označují statisticky průkazný rozdíl mezi produkty *p < 0,05

VZOREK:	Atmosféra		
	O ₂	CO ₂	N ₂
RV	0,30±0,19	35,27±1,06 ^a	64,43±0,94 ^b
NV	0,07±0,01	37,70±0,26 ^{ab}	62,24±0,25 ^c
FV	0,45±0,19	35,23±1,36 ^a	64,34±1,22 ^b
BV	0,22±0,07	34,63±0,63 ^{ac}	65,14±0,59 ^b
MV	0,08±0,06	33,97±0,74 ^c	65,97±0,70 ^a

Závěr

Přestože výrobci používají stále lepší technologie pro výrobu analogů masných produktů, je z výše získaných výsledků zřejmé, že mezi masnými výrobky a jejich veganskými alternativami existují statisticky průkazné rozdíly jak v jejich senzoryckých vlastnostech, tak i v barvě a textuře.

Seznam literatury:

- 1) ISHAMRI, I.; HWANG, Y-H.; JOO, S-T. 2020. Meat analog as future food: a review. J Anim Sci Technol 62(2):111-120
- 2) FREWER, L.J. 2017. Consumer acceptance and rejection of emerging agrifood technologies and their applications. Eur Rev Agric Econ. 44:683-704
- 3) MANCINI, M.C; ANTONIOLI, F. Exploring consumers' attitude towards cultured meat in Italy. Meat Sci. 2019; 150:101-10
- 4) FIORENTINI, M.; KINCHLA, A.J.; NOLDEN, A.A. 2020. Role of Sensory Evaluation in Consumer Acceptance of Plant-Based Meat Analogs and Meat Extenders: A Scoping Review. Foods 9: 1334
- 5) ELZERMAN, J.E.; VAN BOEKEL, M.A.; LUNING, P.A. 2013. Exploring meat substitutes: Consumer experiences and contextual factors. Br. Food J. 115: 700–710
- 6) HOEK, A.C.; LUNING, P.A.; WEIJZEN, P.; ENGELS, W.; KOK, F.J.; DE GRAAF, K. 2011. Replacement of meat by meat substitutes. A survey on person—And product-related factors in consumer acceptance. Appetite 56: 662–673

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 221/2021/FVHE

Kultivace plísně *Pseudogymnoascus destructans*, která způsobuje syndrom bílého nosu u netopýrů

Šárka Bednaříková¹, Veronika Seidlová¹, Jan Zuka², Vladimír Piaček¹, Tomáš Heger¹, Monika Němcová¹, Miroslav Kolařík³, Kateřina Zuka¹, Jiří Pikula¹

¹Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, ²Ústav biologie obratlovců, Akademie Věd České republiky,

³Laboratoř genetiky a metabolismu hub, Ústav mikrobiologie, Akademie Věd České republiky

Úvod

Pseudogymnoascus destructans je pomalu rostoucí, psychrofilní plíseň, která roste saprofytický v podzemí (1) nebo patogenně na létací membráně a aurikulární či nosní a obličejové oblasti zimujících netopýrů (2). Jako původce kožního onemocnění zvaného syndrom bílého nosu (white-nose syndrome, WNS), je patogen *P. destructans* zodpovědný za výrazný pokles počtů netopýrů v severoamerických populacích. V minulosti identifikace WNS vyžadovala histopatologickou analýzu (3). V poslední době je ovšem využívána neinvazivní diagnostická metoda se srovnatelnou citlivostí, kdy jsou léze na netopýřích křídlech detekovány pomocí UV lampy (4). Tato neletální a v terénu aplikovatelná metoda je užitečná nejen pro screening hibernujících netopýrů na onemocnění WNS, ale také pro cílenou biopsii specificky žlutooranžově fluoreskujících kožních lézí na křídlech. Pro epidemiologické a fylogeografické studie WNS je důležité mít k dispozici životaschopné plísňové izoláty (5, 6).

V zásadě existují dva přístupy shromažďování vzorků pro kultivaci plísní v terénu. Prvním jsou stěry povrchu kůže v místě viditelného růstu plísně. Druhým pak biopsie membrány křídel s kožní lézí způsobenou plísní. Tyto dva přístupy lze také kombinovat, aby se maximalizovala pravděpodobnost získání životaschopné plísně vhodné pro kultivaci v laboratoři. Doposud ovšem nebyly provedeny žádné studie srovnávající účinnost těchto metod pro získání kultur *P. destructans*. Zde uvádíme experimentální studii porovnávající výtěžnost získání izolátů ze stěrů kůže a biopsií membrány pomocí UV záření.

Předpokládali jsme, že bioptické vzorky obsahující hustou síť hyf poskytnou vyšší počet kultivovatelných jednotek (hyfy i konidie) ve srovnání se stěry z povrchu kůže. Tkáňové biopsie mohou také poskytovat určitou ochranu a dodávat živiny, což umožňuje přežití plísně během transportu vzorku do laboratoře. O některých mikroorganismech je známo, že inhibují růst *P. destructans* (7, 8), a proto bakteriální kontaminace vzorků může také ovlivnit výtěžnost/získání izolátu. Proto jsme také zkoumali stupeň interference mezi kultivovatelnou mikroflórou přítomnou na kůži a získáním životaschopných plísňových kultur.

Materiál a metodika

Sběr vzorků

Zkoumali jsme mikrobiom kůže tří druhů netopýrů, tj. netopýra velkého (*Myotis myotis*), netopýra východního (*Myotis blythii*) a vrápence velkého (*Rhinolophus ferrumequinum*), v jeskyních a umělých podzemní úkrytech kontaminovaných *P. destructans* v České republice, Polsku a Arménii ve dvou hibernačních obdobích. Ve všech případech bylo s netopýry zacházeno tak, aby se minimalizoval stres a doba trvání odběru vzorků. Po dokončení odběrů byly netopýři na místě vypuštěni zpět do volné přírody. Ještě před manipulací byla zvířatům měřena povrchová tělesná teplota pomocí bezkontaktního infračerveného teploměru Raynger MX2 (Raytek Corporation, Santa Cruz, USA). Ve studii byly odebrány vzorky celkem od 82 netopýrů, přičemž z každého netopýra byly odebrány dva nebo tři typy vzorků. Nejprve byly odebrány stěry kůže pro kultivaci bakterií a plísně. Potom pomocí UV lampy byly lokalizovány fluoreskující léze na kůži netopýrů a následně byly odebrány bioptáty. Současně byla pořízena fotografie křídla, což umožnilo spočítat léze v laboratoři s pomocí nástroje pro počítání v softwaru ImageJ (9).

Laboratorní izolace a kultivace vzorků odebraných v terénu

Kožní bakteriální stěry: Proveden byl stěr z povrchu létací blány sterilním bavlněným odběrovým tampónem a vzorek byl transportován do laboratoře v Amies médiu (Copan Italia S.p.A, Brescia, Itálie). K izolaci bakterií byly použity Petriho misky s krevním agarem (Columbia Agar Base, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) a MacConkey agarem (MCA; Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) doplněné 5% ovčí krví. První charakterizace proběhla pomocí hmotnostní spektroskopie MALDI-TOF. Poté byla bakteriální DNA extrahována pomocí komerčního kitu (NucleoSpin® Microbial DNA Extraction Kit, Macherey-Nagel, Německo). Pro PCR amplifikaci byly použity univerzální bakteriální primery genu 16S rRNA 27F a 1492R. V objemu 25 µl obsahovala reakce cca 50 ng genomové DNA; 12,5 µl Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (New England BioLabs, UK), 2 µl vody pro molekulární biologii (Bioron, Německo) a 2 µl 10 mM forward a reverse primerů. Reakční podmínky zahrnovaly počáteční denaturační cyklus při 95 °C po dobu 15 minut; následovalo 35 cyklů 1 minuta 95 °C, 1 minuta 58 °C a 2 minuty 72 °C, a nakonec 10 minut 72 °C. Produkty PCR byly komerčně sekvenovány pomocí Sangerova sekvenování v SEQme Inc. (Česká republika) s použitím univerzálních primerů 800R a 1492R. Sekvence byly upraveny pomocí editoru BioEdit Sequence Alignment Editor v.5.0.9 (10) a porovnány se známými sekvencemi v databázi NCBI pomocí BLAST (GenBank).

Kožní plísňové stěry: Pro získání plísní byly odběrové tampony s plastovým aplikátorem vloženy do transportních zkumavek, skladovány při 5–8 °C a zpracovány do 5–10 dnů (v závislosti

na geografické oblasti odběru vzorku a vzdálenosti laboratoře). V laboratoři byl tampon navlhčen v 0,1% sterilní vodě a vetřen do agaru s kvasničným extraktem, glukózou a chloramfenikolem. Kultivace probíhala při 10 °C po dobu 14–30 dnů a následovala analýza pomocí mikroskopie.

Kožní bioptáty: Biopsie tkáně létací blány byly umístěny do sterilních zkumavek s 15 μ l NaCl 0,9 % (pro zvlhčování), skladovány při 5–8 °C a během 5–10 dnů (v závislosti na zemi odběru) umístěny na agar se sladovým extraktem s antibiotiky a kultivovány při 10 °C po dobu 14–30 dnů. Poté byly vzorky mikroskopicky vyhodnoceny.

Statistická analýza

Teplota povrchu těla, počet ultrafialových lézí a počet bakteriálních druhů izolovaných z každého netopýra a velikost kolonií byly testovány na normální rozdělení pravděpodobnosti pomocí testů Kolmogorov-Smirnov a Shapiro-Wilkův. Protože všechny parametry s výjimkou velikosti kolonií nevykazovaly normální distribuci, byly poté testovány pomocí neparametrického Mann-Whitneyova testu. Účinnost obou metod odběru vzorků, pokud jde o úspěšný výtěžek izolátu kultury *P. destructans*, byla hodnocena pomocí testu rozdílu dvou poměrů. Vzhledem k nízkému počtu některých případů byly rozdíly v úspěšnosti kultivace mezi druhy netopýrů testovány pomocí chí-kvadrát testu s Yatesovou korekcí v programu Statistica for Windows® 13.2 (StatSoft, Inc., USA). Rozdíl ve vhodnosti kultivačního média pro růst *P. destructans* (velikost kolonie) byl testován pomocí jednofaktorové ANOVY.

Výsledky

Celkem jsme získali 12 životaschopných izolátů plísně *P. destructans*, přičemž účinnost zisku kultur byla výrazně vyšší u kultivace vzorků získaných na základě cílené biopsie membrány křídel (test rozdílu dvou poměrů; $p = 0,001$). Mikrobiální přerůstání bylo způsobeno sedmi druhy hub a kvasinek. Plíseň *Chaetomium* spp. byla nalezena pouze ve stěrech z *M. myotis*. V počtu pozitivních kultur *P. destructans* získaných z *M. myotis* a *M. blythii* pomocí dvou metod odběru vzorků nebyl statisticky významný rozdíl (chí-kvadrát test pro výtěry = 0,08; $p = 0,778$ a chí-kvadrát test pro biopsie = 0,3; $p = 0,583$). Podobně nebyl žádný významný rozdíl v počtu pozitivních nálezů z kožních stěrů mezi *Myotis* sp. a *R. ferrumequinum* (chí-kvadrát test = 0,35; $p = 0,553$). I další statistické analýzy vyšly jako nevýznamné i navzdory tomu, že se podařilo vícekrát vykultivovat plíseň z bioptátů z netopýrů s nižší teplotou povrchu těla, vyšším počtem lézí viditelných pomocí UV lampy a rozmanitější bakteriální komunitou (teplota povrchu těla $Z = -1,151$; $p = 0,250$; počet UV-vizualizovaných kožních lézí na netopýra $Z = 0,735$; $p = 0,462$; počet bakteriálních druhů izolovaných z každého netopýra $Z = 0,170$; $p = 0,865$). Zjistilo se také, že na úspěšnost kultivace *P. destructans* z bioptátu neměla

statisticky vliv přítomnost bakterií *Serratia* spp. a/nebo *Pseudomonas* spp. Analýza genu 16S rRNA identifikovala sedm bakteriálních čeledí na kůži *M. blythii* a *R. ferrumequinum*. Celkově mikrobiom *R. ferrumequinum* vykazoval větší rozmanitost bakteriálních druhů.

Závěr

K identifikaci, izolaci a charakterizaci *P. destructans*, jakožto původce závažného infekčního onemocnění WNS, jsou zapotřebí spolehlivé techniky odběru vzorků. V této studii jsme dokázali, že schopnost získat životaschopný izolát zmíněné patogenní plísně z netopýrů se lišila v závislosti na použité technice odběru vzorků. Dle našich zkušeností, výtěžnost životaschopných kultur *P. destructans* lze výrazně zlepšit pomocí adekvátních podmínek transportu vzorku, včetně nepřerušného chlazení, ochrany vzorků tkání před vysycháním a použitím vhodného kultivačního média. Pro pochopení biologie, patogeneze a epidemiologie *P. destructans* je nezbytné získat životaschopné plísňové izoláty. Existuje totiž skutečná potřeba plně porozumět novým patogenům, které mohou vážně ohrozit divoká zvířata. Zatímco pro monitorování a sledování *P. destructans* v populacích netopýrů lze použít kultury založené jak na výtěrech z kůže, tak na biopsiích létací blány křídla, vyšší účinnost prokázaly biopsie cílené na kožní léze pomocí UV záření.

Seznam literatury:

- 1) VERANT, M. L. et al. Temperature-dependent growth of *Geomyces destructans*, the fungus that causes bat white-nose syndrome. *PLoS One*. 2012, 7(9), e46280.
- 2) BLEHERT, D. S. et al. Bat white-nose syndrome: An emerging fungal pathogen? *Science*. 2009, 323(5911), 227-227.
- 3) METEYER, C. U. et al. Histopathologic criteria to confirm white-nose syndrome in bats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2009, 21(4), 411-414.
- 4) TURNER, G. G. et al. Nonlethal screening of bat-wing skin with the use of ultraviolet fluorescence to detect lesions indicative of white-nose syndrome. *Journal of Wildlife Diseases*. 2014, 50(3), 566-573.
- 5) MAKIMURA, K. et al. Detection of a wide range of medically important fungi by polymerase chain reaction, *Journal of Medical Microbiology*. 1994, 40(5), 358-64.
- 6) BRANDT, M. E.; PARK, B. J. Think fungus - prevention and control of fungal infections. *Emerging Infectious Diseases*. 2013, 19 1688-1689.
- 7) MYERS, J. M. et al. Synergistic inhibition of the lethal fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*: the combined effect of symbiotic bacterial metabolites and antimicrobial peptides of the frog *Rana muscosa*. *Journal of chemical ecology*. 2012, 38(8), 958-965.
- 8) HOYT, J. R. et al. Bacteria isolated from bats inhibit the growth of *Pseudogymnoascus destructans*, the causative agent of white-nose syndrome. *PLoS One*. 2015, 10:e0121329.
- 9) SCHINDELIN, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*. 2012, 9(7), 676-682.
- 10) HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*. 1999, Series 41: 95-98.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 217/2021/FVHE

Detekce a kvantifikace vybraných včelích virů v různých materiálech ze včelích úlů

Eliška Čukanová^{1,2}, Kristýna Kováčová¹, Ivana Papežíková¹, Miroslava Palíková¹

¹*Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, Oddělení infekčních chorob a preventivní medicíny, Výzkumný ústav veterinárního lékařství Brno*

Úvod

Včela medonosná (*Apis mellifera* L.) je významný, téměř celosvětově rozšířený hmyzí opylovatel. Představují nejvíce komerčně využívaný druh opylovatele. Zároveň jsou však napadány širokou škálou parazitů a patogenů, mezi které patří i řada klinicky významných včelích virů. Ty jsou ve včelstvech v malých dávkách běžně přítomny bez pozorovatelného dopadu na své hostitele (1). Infekce včelími viry je jedním z faktorů podílejících se na syndromu kolapsu včelstev, při kterém dochází k rychlému úbytku včel dělnic. Tyto ztráty nelze spojit s jednou konkrétní příčinou (2). Včela medonosná je eusociálním druhem hmyzu, což ji dělá potenciálně velmi náchylnou k přenosu patogenů. Úzký fyzický kontakt velkého počtu včel a silně organizovaná sociální struktura včelstva mohou vést k rychlému šíření virů v populaci. Včela se může infikovat přímo kontaminovanou potravou a virus pak dále šířit výměšky, se kterými přichází další včely do styku při úklidu úlu (3). Vysoké dávky virů detekované v pylu a medu jsou asociovány se zvýšenou mortalitou včel (4). Cílem práce bylo srovnání virové nálože vybraných včelích virů u včel a různých materiálů získaných z včelích úlů (medové a pylové zásoby, měl, stěr) a zjištění, zda lze tyto neinvazivně odebrané materiály využít k detekci včelích virů jako alternativu k vyšetření.

Materiál a metodika

Odběr vzorků proběhl během května a června roku 2021. Vzorky byly odebírány ze čtyř různých stanovišť na jižní Moravě (tab 1), celkem z 24 včelstev. Z každého včelstva bylo odebíráno 50 jedinců dospělých včel (létavek), medové a pylové zásoby, měl a stěr z kovové mřížky, umístěné nad dnem úlu. Vzorek 50 včel byl před extrakcí DNA homogenizován v 30 ml fyziologického roztoku třepáním s porcelánovými kuličkami. 100 μ l vzniklého homogenátu bylo použito k extrakci pomocí roztoku TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Podobným způsobem byly homogenizovány i tampony použité k odběru stěru, homogenizace však proběhla přímo v 1 ml extrakčního činidla. Krok homogenizace byl přeskočen u medu, pylu a měli. Extrakce nukleových kyselin byla provedena podle standardního protokolu výrobce. Vzorky měly být vzhledem k velkému množství nečistot dodatečně přečištěny na magnetických kuličkách za použití sady Chemagic™ Viral DNA/RNA Kit (PerkinElmer, Inc. MA, USA) podle standardního protokolu. Detekce vybraných včelích virů byla

provedena metodami qPCR a RT-PCR. Pomocí qPCR byly detekovány viry DWV, BQCV a SBV za použití sady Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kit (NEB, MA, USA). V reakci byly použity dříve publikované primery a sondy (5, 6, 7) i vlastního designu. Reakce proběhla dle standardního protokolu s 40 amplifikačními cykly, množství jednotlivých komponent v reakci bylo upraveno pro celkové množství 15 μ l. Počet kopií viru byl stanoven na základě standardní křivky. Extrahované nukleové kyseliny byly dále použity jako templát pro syntézu cDNA reverzní transkripcí pomocí sady ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB, MA, USA) dle standardního protokolu. Se vzniklou cDNA byla provedena PCR reakce za použití činidla OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer (NEB, MA, USA) dle návodu výrobce. PCR proběhla s 5 dříve publikovanými páry primerů (8, 9, 10), sloužícími k detekci virů ABPV, BQCV a SBV. Pro vizualizaci vzniklých PCR produktů byla využita gelová elektroforéza.

Výsledky

U všech vzorků včel byly úspěšně detekovány viry DWV, BQCV a SBV. DWV byl přítomen téměř u všech včelstev v nízkých titrech ($1,13 \times 10$ až $1,31 \times 10^2$ virových kopií/ μ l RNA – dále jen k/ μ l), v jediném včelstvu byla zjištěna vyšší koncentrace, čítající $1,86 \times 10^7$ k/ μ l. Zjištěné koncentrace virů BQCV a SBV byly naopak poměrně vysoké. Počet kopií BQCV se konzistentně pohyboval mezi 10^5 až 10^7 k/ μ l. Zvýšené, ale méně konzistentní výsledky byly zjištěny u SBV, kde naměřené titry dosahovaly hodnot od 10^3 do 10^8 k/ μ l. Přítomnost ABPV byla zjištěna u 54,17% vyšetřených vzorků, což zároveň představuje veškeré vzorky ze stanoviště Kývalka. U ostatních včelstev nebyl virus přítomen v detekovatelném množství. Překvapivě dobrých výsledků v detekci virů SBV a BQCV bylo dosaženo při vyšetření medu. Přítomnost virů byla zjištěna u všech odebraných vzorků, což odpovídá výsledkům vyšetření včel, a to dokonce v relativně vysokých koncentracích. Virus DWV se podařilo detekovat u 15 (62,5 %) vyšetřených vzorků medu a ABPV pouze u 3 (12,5 %) z nich. DWV se podařilo detekovat v 18 (75 %) vzorcích. Ve vzorcích pylu byla také zjištěna vyšší koncentrace virových částic DWV, než u vzorků včel – od 10^4 do 10^6 k/ μ l. Velmi úspěšná byla i detekce virových částic BQCV a SBV v pylu. Na BQCV bylo pozitivních 21 (87,5 %) vzorků pylu, přítomnost částic SBV byla potvrzena u 22 (91,67 %) vzorků. Stejně jako ve vzorcích medu byl u 18 (75 %) ze vzorků pylu detekován DWV, a to ve stejném rozpětí koncentrací, jako tomu bylo u medu. Počet vzorků pylu, ve kterých byla zjištěna přítomnost ABPV, byl stejný, jako u vzorků včel (13 – 54,16 % vzorků pylu), ovšem rozložení ABPV-pozitivních vzorků na jednotlivých odběrových stanovštích bylo odlišné. V případě měli se prokázalo být BQCV i SBV pozitivních 17 (70,83 %) vzorků. DWV byl přítomen u 11 (45,83 %) z vyšetřených vzorků měli. ABPV se detekovat nepodařilo. Nejméně často byly včelí viry detekovány ve stěrech z úlové mřížky. DWV byl detekován

u 5 (20,83 %), BQCV u 13 (54,17 %), SBV u 12 (50 %) a ABPV u 3 (12,5 %) vyšetřených vzorků. Dva z ABPV pozitivních vzorků pocházely ze včelstev, u kterých ve vzorcích včel nebyla přítomnost viru prokázána. Výsledky detekcí jsou shrnuty v Tabulce 1. Srovnání stanovených koncentrací k/μl je uvedeno v Tabulce 2.

Tabulka 1. Souhrn výsledků vyšetření pro přítomnost virů v různých materiálech.

Vzorek	Lokalita	DWV					BQCV					SBV					ABPV				
		Včel y	Me d	Py l	Mě l	Stě r	Včel y	Me d	Py l	Mě l	Stě r	Včel y	Me d	Py l	Mě l	Stě r	Včel y	Me d	Py l	Mě l	Stě r
V1	Brno	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
V2		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
V3		+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
V4		+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	
1	Bukovina	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
2		+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3		+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
4		+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
5		+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
6		+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
7	Bukovinka	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
21	Kývalka	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
30		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
32		+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
34		+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
54		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
55		+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
57		+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
59		+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
61		+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
64		+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
117		+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
119		+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
134		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Tabulka 2. Minimální (min), maximální (max) a průměrné hodnoty koncentrace virových částic u virus-positivních vzorků („/“ - koncentraci se nepodařilo stanovit).

	DWV [k/μl]			BQCV [k/μl]			SBV [k/μl]		
	min	max	průměr	min	max	průměr	min	max	průměr
Včely	1,13E+01	1,86E+08	9,30E+06	3,14E+06	5,05E+08	9,77E+07	1,76E+04	8,45E+09	5,74E+08
Py l	2,67E+05	1,03E+07	2,69E+06	2,85E+05	8,35E+07	1,96E+07	4,53E+04	2,19E+07	4,88E+06
Med	/			7,64E+04	1,16E+07	2,45E+06	1,58E+04	4,43E+06	1,11E+06
Mě l	1,80E+02	4,98E+06	8,78E+03	/			1,08E+06	2,94E+09	3,17E+08
Stě r	1,01E+05	5,35E+05	3,18E+05	6,87E+04	7,99E+05	4,00E+05	8,41E+03	1,19E+08	1,04E+07

Závěr

Včelí viry byly úspěšně detekovány v různých typech materiálů, které běžně nejsou k diagnostice včelích virů využívány. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u detekcí virových částic v pylu a v medu, které jsou zároveň méně náročné k extrakci nukleových kyselin. Zjištěné koncentrace virů BQCV a SBV u medu a pylu byly poměrně vysoké a odpovídaly titrům těchto virů u vzorků včel. Tyto materiály jsou tak vhodnými kandidáty na zjištění virové zátěže včelstva.

Seznam literatury:

- 1) Genersch E., Aubert M. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Vet. Res.*, 2010, 41(6): 54.
- 2) vanEngelsdorp D., Evans J. E., Saegerman C., Mullin C., Haubruge E., Nguyen B. K., Frazier M., Frazier J., Cox-Foster D. Chen Y., Underwood R., Tarpay D. R., Pettis J. S: (2009) Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE*, 2009, 4(8): e6481.
- 3) Chen Y., Evans J., Feldlaufer M. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.*, 2006, 92(3): 152-159.
- 4) Schittny D., Yanez O., Neumann P. Honey Bee Virus Transmission via Hive Products. *Vet. Sci.*, 2020, 7(3): 96.
- 5) Bradford E. L., Christie C. R., Campbell E. M., Bowman A. S. A real-time PCR method for quantification of the total and major variant strains of the deformed wing virus. *PLoS One*, 2017, 12(12): e0190017.
- 6) Forsgren E., de Miranda J. R., Isaksson M., Wei S., Fries I. Deformed wing virus associated with *Tropilaelaps mercedesae* infesting European honey bees (*Apis mellifera*). *Exp. Appl. Acarol.*, 2009, 47:87-97.
- 7) Kukielka D., Esperón F., Higes M., Sánchez-Vizcaíno J. M. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. *J. Virol. Methods*, 2008, 147:275-281.
- 8) Grabensteiner E., Bakonyi T., Ritter W. Pechhacker H., Nowotny N. Development of a multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of three viruses of the honeybee (*Apis mellifera* L.): acute bee paralysis virus, Black queen cell virus and Sacbrood virus. *J. Invert. Pathol.*, 2007, 94(3): 222-225.
- 9) Tapasztó Z., Forgách P., Kővágyó C., Topolska G., Nowotny N., Rusvai M., Bakonyi T. Genetic analysis and phylogenetic comparison of Black queen cell virus genotypes. *Vet. Microbiol.*, 2009, 139 (3-4): 227-234.
- 10) Siede R., König M., Büchler R., Failing K., Thiel H. J. A real-time PCR based survey on acute bee paralysis virus in German bee colonies. *Apidologie*, 2008, 39: 650-661.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 220/2021/FVHE

Změna texturních vlastností jedlých obalů při skladování v prostředí s rozdílnou vlhkostí

Simona Dordevic, Dani Dordevic, Karolína Těšíková, Johana Zemancová, Lucie Jurková,

Bohuslava Tremlová

Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,

Veterinární univerzita Brno

Úvod

Obaly jsou v posledních letech ve velkém zájmu jak odborníků, tak i široké veřejnosti, hlavně z důvodu ekologických aspektů. Aby nedocházelo ke znečišťování přírody použitím syntetických obalů, vyvíjí se obaly na přírodní bázi, především vyrobených z polysacharidů, bílkovin a lipidů (1). U takto vzniklých obalů je důležité před samotnou aplikací na potraviny zjistit jejich odolnost vůči skladování v různých prostředích, například v prostředích s různou hodnotou vlhkosti, které mohou mít vliv například na změnu texturních vlastností obalů. Především pevnost obalů je jedním z hlavních parametrů pro zjištění kvality vyrobeného obalu, jelikož určuje schopnost obalu ochránit balenou potravinu před vnějšími vlivy (2,3).

Materiál a metodika

Výroba obalů

Nejprve bylo naváženo 0,3 g κ -karagenanu do kádinky, v případě, kdy vzorek obsahoval i trehalózu bylo naváženo odpovídající množství trehalózy (0,5; 1; 3 %). Do kádinky bylo přidáno 45 ml destilované vody (jen u vzorků obsahujících esenciální olej bylo přidání 43,65 ml destilované vody). Následně byl roztok rozmíchán a zahřát na plotýnce do ztekucení. Následovalo míchání na magnetické míchače po dobu 10 min (50°C, 350 rpm). Dále byl přidán pomerančový esenciální olej v množství 0,45 ml, následovalo míchání po dobu 5 min. Poté bylo přidáno 0,25 ml glycerolu a vzorky byly míchány dalších 5 minut. Poté u vzorků s esenciálním olejem následovalo přidání 1,3 ml Tween 20 nebo Tween 80. Vzorky byly míchány 7 min (60°C, 850 rpm) a poté vylity do Petriho misek.

Tabulka 1. Složení vzorků obalů

Vzorek	Složení
C	0.3 g κ -carrageenan + glycerol
5	0.3 g κ -carrageenan + tween 80 + orange essential oil + glycerol
17	0.3 g κ -carrageenan + tween 20 + orange essential oil + glycerol
6C	0.3 g κ -carrageenan + 0.5 % trehalose + glycerol
6	0.3 g κ -carrageenan + 0.5 % trehalose + tween 80 + orange essential oil + glycerol
18	0.3 g κ -carrageenan + 0.5 % trehalose + tween 20 + orange essential oil + glycerol
7C	0.3 g κ -carrageenan + 1 % trehalose + glycerol
7	0.3 g κ -carrageenan + 1 % trehalose + tween 80 + orange essential oil + glycerol
19	0.3 g κ -carrageenan + 1 % trehalose + tween 20 + orange essential oil + glycerol
8C	0.3 g κ -carrageenan + 3 % trehalose + glycerol
8	0.3 g κ -carrageenan + 3 % trehalose + tween 80 + orange essential oil + glycerol
20	0.3 g κ -carrageenan + 3 % trehalose + tween 20 + orange essential oil + glycerol

Skladování

Vzorky byly skladovány v prostředí o různých vlhkostech (prostředí laboratoře – 45 %; NaCl (74 %); KNO₃ (92 %); NaBr (57 %); MgCl₂ (32 %) a silikagel (0%) po dobu 4 dnů.

Měření textury

Textura byla měřena na přístroji TA.XT plus texturometru metodou ASTM D882-02, kdy byla analyzována pevnost (MPa) a pružnost (%). Pro měření byly filmy nastříhány na velikost 1x5 cm a měření bylo pro každý druh vzorku provedeno 5x.

Výsledky

V Tabulce 2 jsou shrnuty výsledky pevnosti pro 12 vzorků a 6 různých vlhkostních podmínek skladování. Když se zaměříme na změny pevnosti v rámci různých skladování, pak vzorek C nevykazoval statisticky významné rozdíly ($p > 0,05$) až na prostředí s vlhkostí 45 % a 92 %, mezi kterými byl statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) zjištěn. Když porovnáme 0% a 32% vlhkost, pak mezi těmito skladováními docházelo ke statisticky významnému ($p < 0,05$) snížení hodnot pevnosti u většiny vzorků; stejně tak u 32 % a 45 %. Když ale porovnáme 45% a 57% vlhkostní prostředí, pak byly statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) zjištěny pouze u vzorků 19, 8C, 8 a 20.

V případě pevnosti bylo v předchozích studiích zjištěno, že s rostoucí hodnotou vlhkosti prostředí docházelo ke snížení pevnosti obalů (4,5), což bylo způsobeno absorbováním vyššího množství vody do matrice vyrobených obalů, které tak ztrácely na pevnosti (6).

Tabulka 2. Výsledky pevnosti (MPa) vyrobených obalů skladovaných v různých prostředích o rozdílné vlhkosti

Vzorek	Silikagel (0%)	MgCl ₂ (32%)	Prostředí laboratoře (45%)	NaBr (57%)	NaCl (74%)	KNO ₃ (92%)
C	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,03 ^A	0,10 ± 0,01	0,13 ± 0,04	0,06 ± 0,03 ^B
5	0,08 ± 0,01 ^D	0,05 ± 0,00 ^C	0,10 ± 0,01 ^B	0,03 ± 0,01 ^A	0,05 ± 0,00 ^C	0,06 ± 0,00 ^C
17	0,06 ± 0,00 ^A	0,04 ± 0,01 ^B	0,07 ± 0,01 ^A	0,06 ± 0,01 ^A	0,05 ± 0,00 ^B	0,05 ± 0,00 ^B
6C	0,13 ± 0,02 ^A	0,08 ± 0,00 ^B	0,15 ± 0,02 ^A	0,13 ± 0,03 ^A	0,14 ± 0,01 ^A	0,12 ± 0,04
6	0,08 ± 0,00 ^C	0,06 ± 0,01 ^{AB}	0,11 ± 0,02 ^{AC}	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,00 ^{AB}	0,05 ± 0,01 ^B
18	0,09 ± 0,01 ^B	0,06 ± 0,01 ^{AC}	0,09 ± 0,02 ^B	0,07 ± 0,01 ^A	0,05 ± 0,01 ^C	0,06 ± 0,00 ^{AC}
7C	0,15 ± 0,01 ^C	0,09 ± 0,03 ^B	0,20 ± 0,02 ^A	0,16 ± 0,01 ^{AC}	0,13 ± 0,00 ^B	0,17 ± 0,04
7	0,11 ± 0,01 ^B	0,07 ± 0,00 ^{AC}	0,10 ± 0,03 ^{AB}	0,05 ± 0,02 ^{AC}	0,05 ± 0,01 ^C	0,07 ± 0,00 ^{AC}
19	0,07 ± 0,00 ^A	0,05 ± 0,01 ^{AC}	0,09 ± 0,02 ^B	0,07 ± 0,00 ^A	0,04 ± 0,01 ^C	0,05 ± 0,00 ^C
8C	0,32 ± 0,13	0,10 ± 0,04	0,10 ± 0,03 ^{BC}	0,14 ± 0,01 ^A	0,12 ± 0,01 ^{AB}	0,07 ± 0,02 ^C
8	0,24 ± 0,02 ^B	0,06 ± 0,01 ^{AC}	0,20 ± 0,04 ^B	0,07 ± 0,01 ^A	0,05 ± 0,01 ^{AC}	0,04 ± 0,01 ^C
20	0,13 ± 0,03 ^C	0,03 ± 0,01 ^A	0,08 ± 0,01 ^{BC}	0,03 ± 0,02 ^A	0,05 ± 0,01 ^{AB}	0,05 ± 0,00 ^A

*rozdílná písmena v horním indexu značí statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi sloupci

V Tabulce 3 jsou shrnuty výsledky pružnosti pro vyrobené obaly. Zde je zajímavé, že u výsledků nebylo zjištěno, dle výše zmíněných informací, že se ztrátou pevnosti by docházelo ke zvýšení hodnot pružnosti, ale když srovnáme skladování při 45% vlhkosti a 92% vlhkosti, pak u vzorků velmi často docházelo ke snížení hodnot pružnosti, avšak jen u vzorků 6C a 7C bylo toto snížení pružnosti statisticky významně rozdílné ($p < 0,05$). K těmto dějům může docházet v případech, pokud je vlhkost prostředí příliš vysoká, může tak dojít k limitaci vykazování plastifikačního účinku na obaly a tedy může docházet ke snížení pružnosti (7).

Tabulka 3. Výsledky pružnosti (%) vyrobených obalů skladovaných v různých prostředích o rozdílné vlhkosti

Vzorek	Silikagel (0 %)	MgCl ₂ (32%)	Prostředí laboratoře (45 %)	NaBr (57 %)	NaCl (74 %)	KNO ₃ (92 %)
C	66,54 ± 2,85 ^A	81,25 ± 0,84 ^B	63,01 ± 1,18 ^A	10,27 ± 3,92 ^A	69,95 ± 4,99 ^A	63,87 ± 1,00 ^A
5	102,64 ± 2,73 ^C	99,28 ± 3,26 ^C	84,22 ± 7,82 ^B	10,30 ± 8,40 ^A	74,50 ± 2,42 ^{AB}	84,45 ± 3,96 ^B
17	101,65 ± 5,51 ^C	95,78 ± 4,49 ^{AC}	92,42 ± 4,27 ^A	92,40 ± 3,42 ^A	83,38 ± 5,60 ^B	87,41 ± 1,62 ^{AB}
6C	78,71 ± 4,33 ^B	76,88 ± 3,75 ^{AB}	76,13 ± 6,43 ^{AB}	69,05 ± 7,29 ^{AC}	79,32 ± 2,31 ^B	65,39 ± 3,97 ^C
6	99,64 ± 4,71 ^A	100,24 ± 6,06 ^A	69,77 ± 4,30 ^B	103,39 ± 6,40 ^A	82,62 ± 1,57 ^C	85,63 ± 9,46 ^C
18	107,78 ± 5,75 ^B	108,67 ± 11,39 ^{AB}	108,29 ± 2,62 ^B	95,30 ± 3,81 ^A	84,21 ± 3,86 ^C	87,55 ± 2,97 ^{AC}
7C	72,03 ± 10,16	73,08 ± 3,30 ^{CD}	71,01 ± 5,42	67,40 ± 2,89 ^{AC}	77,48 ± 3,35 ^{BD}	65,77 ± 2,00 ^A
7	95,80 ± 2,95 ^{BD}	100,86 ± 5,80 ^B	72,89 ± 6,53 ^A	79,18 ± 8,83 ^{AC}	74,00 ± 5,78 ^{AC}	85,24 ± 1,90 ^{CD}
19	93,87 ± 0,85 ^A	86,43 ± 11,36 ^{AC}	111,24 ± 12,71 ^B	89,26 ± 1,45 ^{AC}	79,15 ± 6,63 ^C	86,82 ± 2,71 ^{AC}
8C	62,44 ± 1,06 ^{AC}	62,62 ± 0,37 ^A	60,87 ± 0,41 ^C	62,14 ± 0,65 ^{AC}	66,18 ± 1,08 ^B	70,24 ± 3,25 ^B
8	66,91 ± 0,95 ^{BC}	74,75 ± 4,36 ^{AC}	64,00 ± 1,65 ^B	73,83 ± 2,58 ^A	82,44 ± 5,76 ^{AC}	69,48 ± 6,27
20	73,44 ± 2,26	69,02 ± 2,77 ^B	74,91 ± 4,23	69,11 ± 9,03	73,95 ± 6,21	75,24 ± 2,32 ^A

*rozdílná písmena v horním indexu značí statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi sloupci

Závěr

V rámci výsledků příspěvku bylo zjištěno, že se zvyšující se hodnotou vlhkosti prostředí docházelo ke snížení pevnosti vyrobených filmů. Zatímco u pružnosti docházelo u velké části vzorků také ke snížení pružnosti, což může být způsobeno limitací plastifikačního účinku na obaly.

Seznam literatury:

- 1) MARSH, Kenneth a Betty BUGUSU. Food Packaging - Roles, Materials, and Environmental Issues. *Journal of Food Science* [online]. 2007, **72**(3), R39-R55 [cit. 2021-11-29]. ISSN 0022-1147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00301.x
- 2) JAVADIAN, Neda, Habibollah MIRZAI a Abdorreza MOHAMMADI NAFCHI, (2018). The effects of ribose on mechanical and physicochemical properties of cold water fish gelatin films. *Journal of Chemical Health Risks*, 4(2) [cit. 2021-11-29]. Dostupné z: doi: 10.22034/JCHR.2018.544065
- 3) ALVARADO, Sofia, Glória SANDOVAL, Isidro PALOS, Simón TELLEZ, Yaneli AGUIRRE-LOREDO a Gonzalo VELAZQUEZ. The effect of relative humidity on tensile strength and water vapor permeability in chitosan, fish gelatin and transglutaminase edible films. *Food Science and Technology* [online]. 2015, **35**(4), 690-695 [cit. 2021-11-29]. ISSN 1678-457X. Dostupné z: doi:10.1590/1678-457X.6797
- 4) OTHMAN, Siti H., Nurul R. A. KECHIK, Ruzanna A. SHAPI'I, Rosnita A. TALIB a Intan S. M. A. TAWAKKAL. Water Sorption and Mechanical Properties of Starch/Chitosan Nanoparticle Films. *Journal of Nanomaterials* [online]. 2019, **2019**, 1-12 [cit. 2021-11-29]. ISSN 1687-4110. Dostupné z: doi:10.1155/2019/3843949
- 5) TIAN, Huafeng, Jiaan YAN, A. Varada RAJULU, Aimin XIANG a Xiaogang LUO. Fabrication and properties of polyvinyl alcohol/starch blend films: Effect of composition and humidity. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2017, **96**, 518-523 [cit. 2021-11-29]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.12.067
- 6) MALI, S., L.S. SAKANAKA, F. YAMASHITA a M.V.E. GROSSMANN. Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2005, **60**(3), 283-289 [cit. 2021-11-29]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2005.01.003
- 7) SUPPAKUL, Panuwat, Buppa CHALERNSOOK, Bhatama RATHISUTHAWAT, Sakpipat PRAPASITTHI a Natsaran MUNCHUKANGWAN. Empirical modeling of moisture sorption characteristics and mechanical and barrier properties of cassava flour film and their relation to plasticizing–antiplasticizing effects. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2013, **50**(1), 290-297 [cit. 2021-11-29]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2012.05.013

Tato práce byla financována grantem IGA VETUNI 211/2021/FVHE

Potravní chování luňáků červených jako přirozených predátorů hrabošů polních – významných škůdců a přenašečů infekčních onemocnění

Marek Dostál, Ivan Literák, Jan Škrábal

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

Úvod

Dostupnost potravní nabídky může zásadně ovlivňovat chování ptačích predátorů. Potravní chování může záviset na densitě dostupné kořisti. Individuální chování se mění v souvislosti se změnami velikosti domovského okrsku a se změnami v nalétané vzdálenosti při hledání potravy. Na úrovni populace může docházet ke změnám populační dynamiky a hnízdní úspěšnosti predátorů se změnou dostupnosti potravní nabídky (1, 2).

Luňák červený (*Milvus milvus*) je středně velký dravec, který během zimování společně hřaduje na pravidelně využívaných hromadných nocovištích (3). Na území Jihomoravského kraje vykazují luňáci věrnost několika nocovištím a lokalitám, která opakovaně využívají v průběhu zimování (4). Hraboš polní (*Microtus arvalis*), jakožto jeden z nejpočetnějších malých zemních savců v České republice (5), představuje významnou součást potravního složení luňáků červených během období hnízdění, ale i zimování (6, 7).

Ve 3-4 letých cyklech dochází k populační gradaci hrabošů polních v zemědělské krajině (8). V roce 2019 byla zaznamenána výrazná gradace hrabošů polních napříč Evropou a také Českou republikou (9). Cílem této práce bylo stanovit změny ve velikosti domovských okrsků telemetricky značených luňáků a změny v počtech zimujících luňáků vzhledem k potravní nabídce hrabošů polních v Jihomoravském kraji. Dalším cílem bylo určit, jaké další faktory mohou ovlivňovat časoprostorové aktivity luňáků červených během jejich zimování.

Materiál a metodika

Část dat použitých v této práci pocházela z předcházejících let již probíhajícího výzkumu, nově získaná data významně doplnila zpracovávaný dataset. Studijní oblastí pro výzkum potravního chování luňáků červených na populační dynamiku hrabošů polních byl okres Břeclav, který je situovaný v jihovýchodní části České republiky. Pro studium faktorů ovlivňující časoprostorové aktivity zimujících luňáků červených byla oblast rozšířena o příhraniční oblasti Slovenska a Rakouska, které sousedí s okr. Břeclav.

Do studie individuálního potravního chování bylo zařazeno 37 telemetricky sledovaných jedinců luňáka červeného, přičemž tři z nich se nacházeli ve studované oblasti od konce roku 2017 do roku

2020. Tito ptáci byli osazeni telemetrickým zařízením, které pracuje v systému GPS/GSM. U těchto ptáků byly stanoveny velikosti domovských okrsků prostřednictvím 95% minimálního konvexního polygonu a 95% kernel density estimate v programu ArcGIS (10). Nekumulativní měsíční velikosti domovských okrsků byly analyzovány v koordinačním systému WGS 1984 UTM Zone 33 N. Pro studium časoprostorových aktivit byla použita data s GPS pozicemi všech 37 telemetricky značených ptáků, která byla získána v době, kdy jedinec zimoval ve výše vytyčené oblasti v období let 2015–2020.

Pro studium počtu zimujících luňáků byla využita data spolupracujících ornitologů z přímého pozorování čtyř (2018) a pěti (2019, 2020) hromadných nocovišť luňáků během lednového termínu mezinárodního sčítání těchto ptáků. Byla monitorována společná nocoviště luňáků červených známá z dřívějších let v okrese Břeclav (11).

S použitím indexu aktivně obsazených nor byla sledována populační hustota hrabošů polních na polích s pícninami, především s tolicí vojteškou, jetely či trvalými travními porosty (10). Index nor je zjišťován pracovníky Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ) a představuje počty aktivně používaných vstupů do nor na jeden hektar. Tato data jsou ukládána a veřejně dostupná na webových stránkách ÚKZÚZ.

Pro statistickou analýzu v programu R byl vzhledem k nelinearitě dat velikosti domovských okrsků a počtu zimujících luňáků v souvislosti s densitou hrabošů použit model GAMM (generalized additive mixed model). Vhodnost použití příslušného modelu byla testována prostřednictvím Akaikeho informačního kritéria pro malé datasety (AICc), přesněji rozdílu AICc ($\Delta AICc$) vyššího než dva (12).

Výsledky

Populační hustota hrabošů polních vyjádřená jako počet aktivních nor měla v zimě 2017 hodnotu 678, v zimě 2018 hodnotu 1414 a v zimě 2019 hodnotu 6673. V roce 2018 byl tedy zaznamenán dvojnásobný, v roce 2019 desetinásobný nárůst hustoty populace hrabošů. Velikosti domovských okrsků luňáků se snižovaly se zvyšující se populační hustotou hrabošů. Mezi roky 2017 a 2018 bylo zaznamenáno výrazné snížení velikosti domovského okrsku, zatímco mezi roky 2018 a 2019 nedošlo téměř k žádné změně. Počty zimujících luňáků výrazně stouply v zimním období roku 2019, kdy populační hustota hrabošů dostáhla svého maxima.

Luňáci zimovali v průměru 146 dní na ploše o velikosti $136 \pm 82 \text{ km}^2$. Rostoucí populace hrabošů ovlivnila časoprostorovou aktivitu zimujících luňáků červených a s tím spojené využití jednotlivých typů prostředí v rámci domovského okrsku. Samci a juvenilní ptáci před prvním hnízděním zimovali na větší ploše (měli větší domovské okrsky), než samice a adultní ptáci, kteří už hnízdili. Adultní

ptáci (tj. ptáci po svém prvním hnízdění) měli menší tendenci využívat společná nocoviště než juvenilní dosud nehnízdící ptáci.

Závěr

Změny v populační dynamice kořisti, která pro predátora představuje významnou složku potravy, ovlivňují potravní chování predátorů. Velikost domovského okrsku luňáků červených závisí na dostupnosti potravy. Kulminace populace hrabošů polních měla za následek výrazné zmenšení domovských okrsků luňáků červených ve sledované oblasti a zvýšení počtu nocujících luňáků na společných nocovištích během zimního období. Získané výsledky poskytují možnost rozšíření výzkumu potravního chování luňáků červených i v průběhu hnízdního období.

Seznam literatury:

- 1) GILG, O.; SITTNER, B.; SABARD, B.; HURSTEL, A.; SANÉ, R.; DELATTRE, P.; HANSKI, I.: Functional and numerical responses of four lemming predators in high arctic Greenland. *Oikos*, 2006, 113, 193-216.
- 2) NORRDAHL, K.; KORPIMÄKI, E.: Seasonal changes in the numerical responses of predators to cyclic vole populations. *Ecography*, 2002, 25, 428-438.
- 3) CARTER, I.; GRICE, P.: Studies of re-established Red Kites in England. *British Birds*, 2000, 93, 304-322.
- 4) ŠKRÁBAL, H.: Zimování luňáků červených na jižní Moravě. *Bakalářská práce*. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2020.
- 5) ANDĚRA, M.; BENEŠ, B.: Atlas rozšíření savců v České republice. Předběžná verze IV. Hlodavci (Rodentia) – část 1. Křečkovití (Cricetidae), hrabošovité (Arvicolidae), plchovití (Gliridae). Národní muzeum Praha, 2001.
- 6) HORÁK, P.: Srovnání složení potravy luňáka hnědého (*Milvus migrans*) a luňáka červeného (*Milvus milvus*) na jižní Moravě v době výchovy mláďat. *Crex*, 2013, 32, 54-64.
- 7) GARCIA, J.T.; VINUELA, J.; SUNYER, C.: Geographic variation of the winter diet of the Red Kite *Milvus milvus* in the Iberian Peninsula. *Ibis*, 1998, 140, 302-309.
- 8) TKADLEC, E.; STENSETH, N.CH.: A new geographical gradient in vole population dynamics. *Proceedings: Biological Sciences*, 2001, 267, 1547-1552.
- 9) JACOB, J.; IMHOLT, CH.; CAMINERO-SALDANA, C.; COUVAL, G.; GIRAUDOUX, P.; HERRERO-CÓFRECES, S.; HORVÁTH, G.; LUQUE-LARENA, J.J.; TKADLEC, E.; WYMENGA, E.: Europe-wide outbreaks of Common Voles in 2019. *Journal of Pest Science*, 2020, 93, 703-709.
- 10) PFEIFFER, T.; MEYBURG, B.: GPS tracking of Red Kites (*Milvus milvus*) reveals fledging number is negatively correlated with home range size. *Journal of Ornithology*, 2015, 156, 963-975.
- 11) NEMČEK, V.: Movements of a juvenile red kite *Milvus milvus* in the border zone of Austria, Slovakia and the Czech Republic. *Slovak Raptor Journal*, 2013, 7, 43-48.
- 12) BURNHAM, K.P.; ANDERSON, D.R.: Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach. Springer, New York, USA, 2002.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 203/2021/FVHE

Posouzení efektu pesticidů a organických mikropolutantů na embryonální a embryolarvální stádia vodních organismů

Denisa Medková^{1,2}, Pavla Lakdawala¹, Aneta Hollerová^{1,3}, Zuzana Koutková¹, Barbora Riesová¹,
Zdeňka Svobodová¹

¹Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, ²Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita Brno, ³Oddělení infekčních chorob a preventivní medicíny, Výzkumný ústav veterinárního lékařství

Úvod

Kontaminace prostředí zejména antropogenními organickými polutanty představuje závažný problém z hlediska zdraví ekosystému i lidské populace. Jednou z nejčastěji detekovaných skupin látek v povrchových a podzemních vodách jsou pesticidy. Pesticidy jsou běžně používány v zemědělství a v domácnostech, pro svoji schopnost nerozpustnosti ve vodním prostředí a bioakumulace mohou negativně ovlivňovat necílové druhy vodního prostředí. Fungicidní látka prochloraz způsobuje maskulinizaci a inhibici produkce vitellogeninu u danií pruhovaných, stejně jako zvýšený počet intersexuálních jedinců a inhibici zrání pohlavních žláz (1). MCPA a metazachlor jsou běžně detekovanými pesticidy ve vodním prostředí (2). Metazachlor je také jedním z nejvíce používaných herbicidů ve Velké Británii a Německu (3). Metazachlor způsobuje opožděnou ontogenezi u raků mramorových a jeho přítomnost v povrchových vodách může být smrtelná pro raná vývojová stádia tohoto druhu (4). Kyselina 4-chloro-o-tolyloxyoctová (známá jako MCPA) může vyvolat u ryb přechodnou anemickou reakci, zánětlivou a imunosupresivní odpověď a zvýšenou migraci granulocytů do postižených tkání (5). Kromě pesticidů a léčiv bývají i čím dál častěji v povrchových vodách detekována rezidua produktů osobní péče (PCPs – personal care products). Triclocarban patří mezi bifenylethery používané jako antimikrobiální látky a jeho výskyt ve vodním prostředí je celosvětový. Koncentrace v povrchových vodách se pohybují v rozmezí <0,1 – 2300 ng/l (6). Rovněž u PCPs byl prokázán negativní vliv na organismy vodního prostředí. Například u parabenů, které jsou využívány jako konzervanty v kosmetice, byly pozorovány biochemické změny v žaberních a jaterních buňkách u ryb (7). Cílem práce bylo posoudit vliv reziduí pesticidů (MCPA, prochloraz, metazachlor) a produktů osobní péče (triclocarban, butylparabe, propylparaben, methylparaben) na embryonální a embryo-larvální stádia různých druhů ryb.

Materiál a metodika

Byl proveden akutní embryonální test toxicity v souladu s metodikou OECD 236 (8), ve kterém byla oplozená vajíčka kapra obecného (*Cyprinus carpio*), lína obecného (*Tinca tinca*) a dánia pruhovaného (*Danio rerio*) vystavena expozici MCPA a metazachloru (v koncentracích 0,05; 50; 500; 5 000 a 100 000 µg/l) a prochlorazu (v koncentracích 0,1; 1; 100; 1 000; 100 000 µg/l) po dobu 96 hodin, produkty osobní péče byly testovány na stejných druzích ryb jako pesticidy a dále byly otestovány na drápatce vodní (*Xenopus laevis*). Triclocarban, který je zejména obsažen v dezinfekčních prostředcích byl testován v koncentracích 0,1; 1; 10; 100 a 100 000 µg/l a konzervanty používané v kosmetice jako propylparaben a butylparaben v koncentracích 0,1; 1; 10; 100 a 100 000 µg/l, methylparaben v koncentracích 0,5; 50; 500; 5 000 a 100 000 µg/l. K ředění byla použita ředící voda připravená podle normy ISO 7346 (1996) (9). Embrya byla do testu nasazena do 60–90 minut po oplození do 24 jamkových mikrotitračních destiček. Během pokusu byla embrya umístěna do růstové komory s konstantní teplotou a fotoperiodou. Každých 24 hodin docházelo k výměně roztoků a kontrole koagulace embrya, absence tvorby somitů, nedokonalému oddělení ocasu od žloutkového vřívku a nepřítomnost srdečního tepu, morfologické změny a čas líhnutí. Po 96hodinové expozici byly vzorky odebrány na hodnocení změn genové exprese vybraných genů zodpovědných za vývoj orgánových soustav.

Dále byl proveden embryo-larvální test na kapru obecném dle metodiky OECD 210 (10) semistatickou metodou s pravidelnou výměnou lázně po 12 hodinách. Oplozené jikry byly vybrány a umístěny do krystalizačních misek po 300 kusech. Testovaná látka - prochloraz byla aplikována do nádob ve formě roztoků v koncentracích 0,1; 1; 10; 100 a 1 000 µg/l. Délka trvání pokusu byla do ukončení larválního vývojového stádia (28 dní po vylíhnutí). Ryby byly krmeny 2x denně čerstvě vylíhlými *Artemia salina*. Po ukončení pokusu byly larvální stádia ryb usmrcena anestetikem (MS 222). U ryb byla sledována mortalita, morfologické změny a vývojové abnormality. Z biomarkerů oxidativního stresu byly stanoveny enzymatické parametry (GR, GST, GPx, CAT), lipidní poškození tkání (TBARS), poškození proteinů a poškození DNA.

Výsledky

Výsledky byly hodnoceny v programu Unistat 5.6 for Excel. Statistická významnost byla hodnocena na hladině $p < 0,05$ a $p < 0,01$ a porovnána ke kontrole. V embryonálních testech toxicity vedla expozice metazachloru k 100% mortalitě u dánia a lína po 48 hodinách po oplození (hpf) u kapra po 72 hpf v nejvyšší testované koncentraci. Metazachlor v koncentraci 100 000 µg/l po 24 hpf způsobil u dánia pruhovaného statisticky významně vyšší výskyt malformací, např. nevyvinuté oči, zpomalený vývoj ve srovnání s kontrolou. Také prochloraz způsobil 100% mortalitu v nejvyšší testované koncentraci

u všech testovaných druhů (dánio pruhované, lín obecný, kapr obecný). U embryí dánia pruhovaného vystavených koncentraci 100 000 µg/l MCPA bylo pozorováno zpomalené líhnutí a vznik malformací (84,6 % jedinců). U kapra obecného bylo v této koncentraci MCPA pozorováno 29,1% jedinců s malformacemi.

Produkty osobní péče měly také vliv na embrya testovaných druhů ryb. Methylparaben způsobil 100% mortalitu u dánia pruhovaného a drápatky vodní v koncentraci 100 000 µg/l. U dánia bylo také v této koncentraci pozorované zpomalené líhnutí a výskyt malformací (83 % jedinců), u drápatky bylo pozorováno zpomalené líhnutí i v nižších testovaných koncentracích (5 000 a 500 µg/l). Také butylparaben a propylparaben způsobili 100% mortalitu v koncentraci 100 000 µg/l u dánia pruhovaného, lína obecného, kapra obecného a drápatky vodní. Butylparaben a propylparaben zapříčinili zpomalené líhnutí u dánia pruhovaného a drápatky vodní. Butylparaben v koncentraci 1 000 µg/l měl dále vliv na vznik malformací u dánia pruhovaného (75 %) a drápatky vodní (33 %). Během embryol-arválního testu na kapru obecném byla pozorována statisticky významně vyšší mortalita v koncentraci 1 000 µg/l prochlorazu.

Obrázek 1. Vývojové malformace u embryí: A-edém srdce, krevní sraženina a edém žloutkového vaku u kapra obecného, B-edém srdce u dánia pruhovaného, C-edém srdce a žloutkového vaku u kapra obecného.



Závěr

Bylo zjištěno, že metazachlor, prochloraz, methylparaben, butylparaben a propylparaben mají ve vysokých koncentracích negativní vliv na životaschopnost embryí. MCPA má negativní vliv na vývoj, líhnutí embryí a zapříčiňuje vznik malformací.

Seznam literatury:

- 1) BAUMANN, L., KNÖRR, S., KEITER, S., NAGEL, T., SEGNER, H., BRAUNBECK, T. Prochloraz causes irreversible masculinization of zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22, 16417–16422

- 2) SJERPS R.M.A., KOOIJ, P.J.F., VAN LOON, A., VAN WEZEL, A.P. Occurrence of pesticides in Dutch drinking water sources. *Chemosphere*, 2019, 235: 510–518.
- 3) MOHR, S., FEIBICKE, M., BERGHAIN, R., SCHMIEDICHE, R., SCHMIDT, R. Response of plankton communities in freshwater pond and stream mesocosms to the herbicide metazachlor. *Environmental Pollution*, 2008, 152(3): 530–542.
- 4) VELISEK, J., STARA, A., KUBEC, J., ZUSKOVA, E., BURIC, M., KOUBA, A. Effects of metazachlor and its major metabolite metazachlor OA on early life stages of marbled crayfish. *Scientific Reports*, 2020, 10, 875.
- 5) LUTNICKA, H., BOJARSKI, B., WITESKA, M., CHMURSICA-GASOWSKA, M., TRYBUS, W., TRYBUS, E., KOPACZ-BEDNARSKA, A., LIS, M. Effect of MCPA herbicide on hematological parameters and ultrastructure of hematopoietic tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Folia Biologica (Kraków)*, 2018, 66, 1–11.
- 6) BRAUSCH, J. M., RAND, G. M. A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere*, 2011, 82, 1518–1532.
- 7) SILVA, D. C., SERRANO, L., OLIVEIRA, T. M. A., MANSANO, A. S., ALMEIDA, E. A., VIEIRA, E. M. Effects of parabens on antioxidant system and oxidative damages in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 162, 85–91.
- 8) OECD 2013. Test No 236: Fish Embryo acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, France.
- 9) ISO 7346. 1996. Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – Part 1: Static method.
- 10) OECD 2013. Test No 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, France.

Tato práce byla financována grantem IGA VETUNI 223/2021/FVHE

Odpadné vody ako rezervoár baktérií rezistentných k antibiotikám poslednej voľby

Tomáš Nohejl^{1,2}, Iva Sukkar², Martin Klvaňa¹, Jana Palkovičová^{1,2}, Adam Valček², Kateřina Chudějová³, Kristína Nešporová², Jarmila Laušová^{1,2}, Marek Schneider¹, Ivo Papoušek¹,
Monika Dolejská^{1,2}

¹Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno; ²Středoevropský technologický institut (CEITEC), Veterinární univerzita Brno

Úvod

Léčba humánních a veterinárních bakteriálních infekcí je významně ovlivněna narůstajícím výskytem kmenů bakterií rezistentních k více antimikrobiálním látkám zároveň, přičemž se zvyšuje jak morbidita a mortalita pacientů, tak náklady na jejich léčbu. Antibiotická rezistence se netýká jen zdraví lidí, domácích a hospodářských zvířat, kteří přicházejí do přímého kontaktu s antibiotiky, ale má vliv i na životní prostředí a volně žijící zvířata, jedná se o tzv. Koncept jednoho zdraví (1). Za klíčový ekosystém podílející se na rozvoji a šíření antibiotické rezistence je považováno vodní prostředí, a to zejména odpadní vody a čistírny odpadních vod (ČOV). ČOV jsou místem vysoké kumulace bakterií (ale i organických látek, reziduí chemikálií atd.), kde dochází k jejich interakci, což může podpořit přenos genů rezistence pomocí mobilních genetických elementů. Přestože čistírenské procesy používané v ČOV eliminují většinu mikroorganismů, určitá část procesy přežívá a dostává se následně do povrchových vod a k volně žijícím zvířatům (2).

Karbapenemy patří mezi širokospektrá beta-laktamová antibiotika, která se používají především k léčbě komplikovaných humánních infekcí vyvolaných zejména multirezistentními nozokomiálními kmeny, které odolávají léčbě běžně používanými antibiotiky. Rezistence ke karbapenemům je nejčastěji způsobena produkcí enzymů tzv. karbapenemáz, které degradují strukturu beta-laktamového kruhu těchto antibiotik. Mezi nejrozšířenější karbapenemázy řadíme enzymy KPC, NDM, OXA-48, VIM a IMP (3). Od roku 2000 je známá skupina enzymů nazývaná GES, která byla poprvé detekována u klinického izolátu ve Francouzské Guyaně (Jižní Amerika) (4). Momentálně je známo 23 variant enzymu GES (5), které jsou zodpovědné za produkci širokospektrých beta-laktamáz (ESBL, Extended-Spectrum Beta-Lactamase), přičemž některé varianty hydrolyzují i strukturu karbapenemů. Producenti GES s karbapenemázovou aktivitou jsou dokumentováni skoro po celém světě (Jižní Amerika, Blízký východ, jihovýchodní Asie, Afrika, Evropa) a jejich výskyt je zaznamenán jak v nemocničním prostředí, tak v odpadních vodách (3,4). V roce 2016 byl zachycen kmen *Enterobacter cloacae* produkující GES-5 u pacienta v České republice (6). Přes narůstající záchyt izolátů produkujících karbapenemázu GES je jejich detailní molekulární charakteristika omezená. Tento projekt charakterizoval soubor 121 izolátů nesoucích gen *bla*_{GES} získaných

z městských a nemocničních odpadních vod města Brna. Zejména byl určen fenotyp a genotyp antibiotické rezistence, jejich vzájemná příbuznost, genetické okolí genu *bla_{GES}* a jeho schopnost horizontálního přenosu pomocí genetických mobilních elementů, plazmidů.

Materiál a metodika

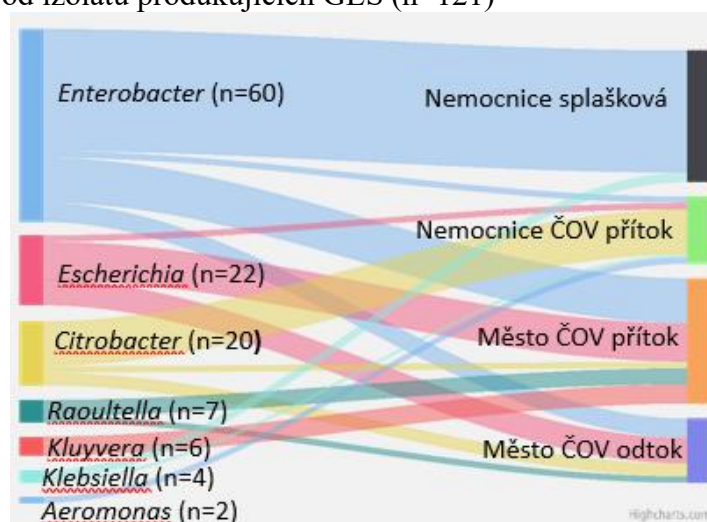
V roce 2016 bylo odebráno celkem šest vzorků vod. Tři vzorky byly odebrané z nemocniční ČOV ve Fakultní nemocnici Brno: 1) přítok ČOV, odpadní voda původem z infekčních klinik, 2) přečištěná voda z odtoku nemocniční ČOV, 3) splašková odpadní voda z nemocniční kanalizace tekoucí do ČOV v Modřicích. Další dva vzorky pocházely ze 4) přítoku a 5) odtoku ČOV Modřice a 6) poslední vzorek byl odebrán z řeky Svratky nad výpustí ČOV Modřice. Metodou PCR byl gen *bla_{GES}* prokázán u 121 izolátů (76 %, n=160). Tyto izoláty byly druhově určeny metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF a byla u nich testována karbapenemázová aktivita pomocí hydrolyzy meropenemu metodou MALDI-TOF MS. Následně byla testována epidemiologická příbuznost izolátů metodou restričního štěpení v kombinaci s pulzní gelovou elektroforézou. U vybraných nepříbuzných izolátů byl určen profil fenotypové rezistence k 21 antimikrobiálním látkám diskovou difúzní metodou a testován horizontální přenos *bla_{GES}* konjugáčními experimenty.

U vybraných izolátů byla extrahována genomická DNA kitem NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel), která byla využita na přípravu knihoven kitem Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina) a tyto knihovny byly sekvenovány na přístroji MiSeq (Illumina). Sekvenační data byla assemblována programy Trimmomatic-0.36 a SPAdes v3.13.0 a získané kontigy byly analyzovány na přítomnost genů antibiotické rezistence (ResFinder 4.1), plazmidových replikonů (PlasmidFinder 2.1) a určení sekvenčního typu izolátů (MLST 2.0) volně dostupnými nástroji (<http://www.genomicepidemiology.org>). Analýza genetického okolí *bla_{GES}* byla zpracována v programu Geneious 9.1.8 za využití databáze GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ve spojení s algoritmem BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) a vizualizována programem clinker v0.0.13. U vybraných izolátů s rozdílným začleněním genu *bla_{GES}* byla navíc extrahována genomická DNA kitem Nanobind HMW DNA Extraction (Circulomics), který poskytuje delší fragmenty DNA, a ty byly sekvenovány na přístroji MinION (Oxford Nanopore Technologies) pomocí kitu Rapid Barcoding kit (Oxford Nanopore Technologies). Kompletní sekvence plazmidů nesoucí gen *bla_{GES}* byly následně získány pomocí programu Guppy Basecalling Software v4.2.2, BBDuk v38.68, Porechop v0.2.4, Ratatosk v0.4, Unicycler v0.4.8, Racon v1.4.20, Medaka v1.2.3, Pilon v1 při využití dat z Illumina a MinION sekvenování.

Výsledky

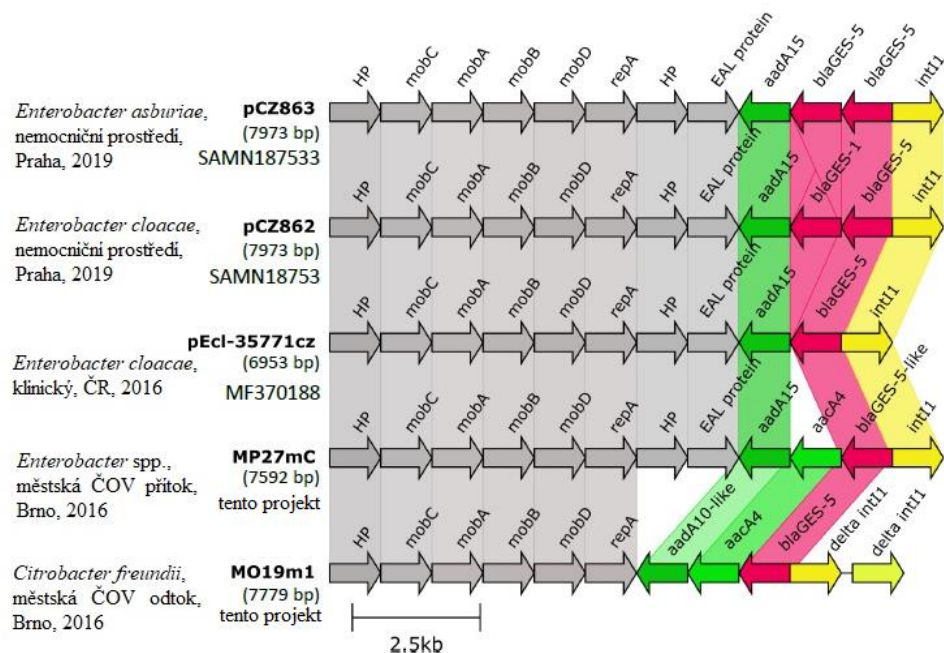
Kmeny nesoucí gen *bla*_{GES} patřily k následujícím bakteriálním rodům: *Enterobacter* (n=60), *Escherichia* (n=22), *Citrobacter* (n=20), *Raoultella* (n=7), *Kluyvera* (n=6), *Klebsiella* (n=4) a *Aeromonas* (n=2) a jejich původ je znázorněn na Obrázku č. 1. Karbapenemázová aktivita byla prokázána u 73 % izolátů (n=121). Na základě jejich příbuznosti byl vybrán soubor 68 nepříbuzných izolátů, který byl celogenomově sekvenován. Varianta GES-1, která způsobuje produkci ESBL, byla prokázána u 51 % izolátů a 49 % izolátů produkovalo karbapenemázu GES-5. Všechny izoláty vykazovaly multirezistenční profil a mezi další detekované geny antibiotické rezistence patřily zejména geny rezistence k beta-laktamům (např. *bla*_{ATC}, *bla*_{CMY-48} pro AmpC beta-laktamázu), fluorochinolonům (plazmidově kódované geny *qnrB1*, *qnrB6*, *qnrS1* a *qnrS2*), aminoglykosidům atd.

Obrázek 1. Rod a původ izolátů produkujících GES (n=121)



Horizontální přenos genu *bla*_{GES} byl úspěšný pouze u 18 % izolátů a byl asociován zejména s ColE2-like a IncQ2 plazmidy napříč bakteriálními rody (*Enterobacter*, *Escherichia* a *Citrobacter*). U plazmidů IncQ2 byl gen sdružen s genovou kazetou nesoucí geny *bla*_{OXA-2-like} a *aac(6')-Ib*, zatímco u ColE2-like plazmidů byl lokalizován především jako součást integronu třídy 1 zahrnujícího geny rezistence k aminoglykosidům *aacA4* and *aadA15/A10-like* (Obrázek č. 2). Podobná struktura ColE2-like plazmidů byla v České republice již dříve dokumentována [6].

Obrázek 2. Genetická struktura ColE2-like plazmidů a charakterizace izolátů



Závěr

V rámci studie byla pozorována vysoká diverzita producentů GES beta-laktamázy, která byla reprezentována vícero bakteriálními druhy a jejich různými sekvenčními typy. Gen *bla_{GES}* byl asociován zejména s ColE52-like a IncQ2 plazmidy. Přítomnost multirezistentních kmenů produkujících GES beta-laktamázu v přečištěné odpadní vodě je vysoce znepokojivá, neboť se tato voda následně vypouští zpátky do životního prostředí. Zvyšující se množství informací o šíření této beta-laktamázy poukazuje na její rostoucí význam.

Seznam literatury:

- 1) HERNANDO-AMADO, Sara, Teresa M. COQUE, Fernando BAQUERO, et al. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nature Microbiology*. 2019, **4**(9), 1432-1442. ISSN 2058-5276.
- 2) LI, Qing, Weishan CHANG, Hongna ZHANG, et al. The Role of Plasmids in the Multiple Antibiotic Resistance Transfer in ESBLs-Producing *Escherichia coli* Isolated From Wastewater Treatment Plants. *Frontiers in Microbiology*. 2019, **10**. ISSN 1664-302X.
- 3) ELLINGTON, Matthew J, Frances DAVIES, Elita JAUNEIKAITĖ, et al. A multi-species cluster of GES-5 carbapenemase producing *Enterobacteriales* linked by a geographically disseminated plasmid. *Clinical Infectious Diseases*. 2019. ISSN 1058-4838.
- 4) WELDHAGEN, Gerhard F. GES: an emerging family of extended spectrum beta-lactamases. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2006, **28**(19), 145-149. ISSN 01964399.
- 5) <https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>
- 6) CHUDEJOVA, Katerina, Veronika ROTOVA, Anna SKALOVA, et al. Emergence of sequence type 252 *Enterobacter cloacae* producing GES-5 carbapenemase in a Czech hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2018, **90**(2), 148-150. ISSN 07328893.

Tato práce byla financována grantem IGA VETUNI 209/2021/FVHE

Stanovení hypoglycinu A v rostlinných vzorcích pocházejících z javoru klen (*Acer pseudoplatanus*) a javoru jasanolistého (*Acer negundo*)

Tereza Novotná, Sabina Pospíšilová, Michaela Kabešová, Petr Maršálek

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

Úvod

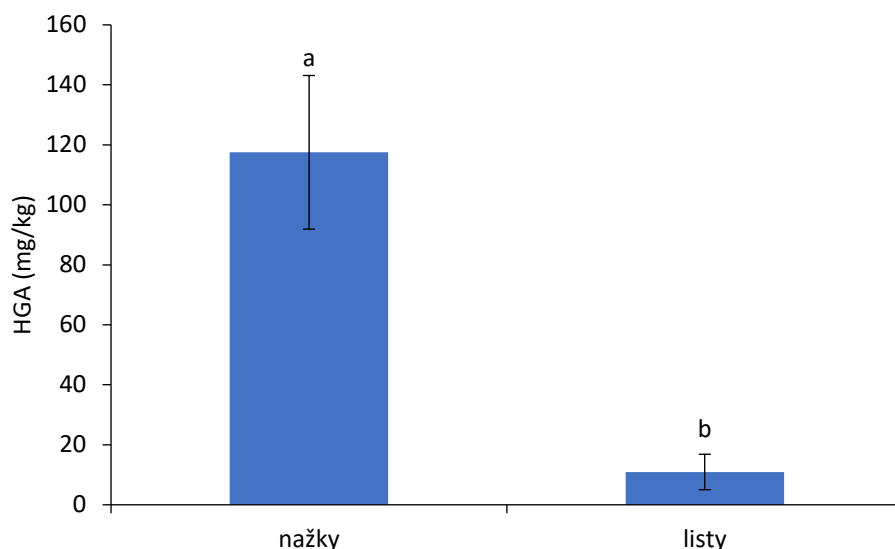
Hypoglycin A (HGA) (L-methylencyklopropylalanin) je neproteinogenní aminokyselina přirozeně se vyskytující v určitých rostlinách, která má neznámou biologickou funkci. V současnosti je HGA nalézán ve stromech a keřích čeledi *Sapindaceae*. Ve vztahu ke zdravým koním jsou nejvýznamnější druhy *Acer pseudoplatanus* (javor klen) a *Acer negundo* (javor jasanolistý) kvůli jejich spojitosti s výskyty často fatálního onemocnění atypické myopatie (AM), známé také jako sezónní pastevní myopatie (SPM) (1). Atypická myopatie je akutní až perakutní, často fatálně končící nezátěžová rabdomyolýza postihující koně na pastvinách v několikaletých intervalech v podzimním a jarním období. Příčinou je získaný deficit dehydrogenázy acyl-CoA vyvolaný methylencyklopropyloctovou kyselinou, která je metabolitem HGA. Důsledkem intoxikace je porucha beta-oxidace mastných kyselin a narušení energetického metabolismu svalu s následnou kumulací lipidů ve svalových vláknech a rabdomyolýzou (2). Hlavním rysem onemocnění je náhlý nástup klinických příznaků charakterizovaný slabostí, ztuhlostí, ulehnutím, fascikulacemi, pocením a myoglobinurií. Postižená zvířata jsou apatická, ale chuť k příjmu krmiva zůstává zachována, orální dysfagie se u postižených koní nevyskytuje, ale byla ojediněle zaznamenána impakce jícnu. Postižené svaly mohou, ale často nemusí být palpačně ztuhlé. Dochází k velmi výrazné elevaci svalových enzymů. Progrese onemocnění je rychlá, k úhynu dochází již za 12 – 72 hodin (3). HGA je nalézán v tělních tekutinách postižených koní a také u klinicky zdravých koní pasoucích se na stejné pastvině, kde se nacházela semena nebo nažky javorů (4). HGA se ve vysokých koncentracích nachází v javoru klen a javoru jasanolistém a byl nalezen v semenech, semenáčích, listech a květenství. V případě javoru jasanolistého hraje důležitou úlohu skutečnost, že se jedná o dvoudomou rostlinu a nažky osamoceně stojících stromů potom neobsahují semena a ani HGA. Koncentrace HGA se zdá být v semenech javoru jasanolistého velmi variabilní (5). V případě javoru mléč (*Acer platanoides*) a javoru babyka (*Acer campestre*) nebyla přítomnost HGA zjištěna (1). U dalších stromů rodu *Acer* nejsou informace o obsahu HGA k dispozici. Cílem této práce bylo zhodnotit obsah HGA ve vzorcích pocházejících z javoru klen a javoru jasanolistého.

Materiál a metodika

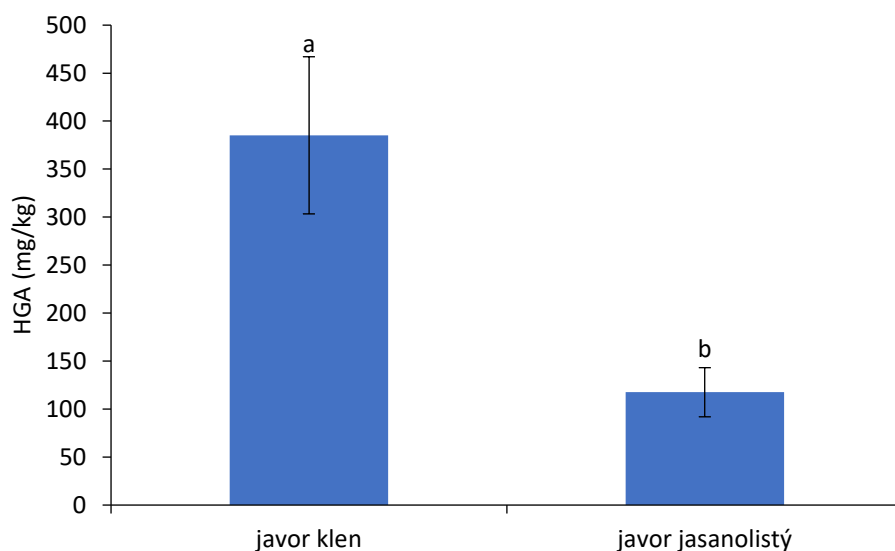
Vzorky rostlin *Acer pseudoplatanus* a *Acer negundo* byly sbírány z různých lokalit České republiky. Na jaře byly odebírány semenáčky, v létě a na podzim pak nažky. Sběr listů probíhal v průběhu celého vegetačního období javorů. Vzorky byly dendrologicky určeny a umístěny do uzavíratelných plastových sáčků. Všechny vzorky byly následně skladovány až do jejich zpracování a analýzy v mrazáku při teplotě -20°C . Celkem bylo analyzováno 36 vzorků javoru klen (21 nažek a 15 semenáčků) a 33 vzorků javoru jasanolistého (19 nažek a 14 semenáčků). Rostlinný materiál byl vložen do homogenizátoru na krmivo na dobu 30 sekund při rychlosti 3000 otáček za minutu. Z homogenizované směsi bylo do dvou Erlenmeyerových baněk odváženo pomocí analytických vah 0,5 g vzorku do každé baňky a přidáno 25 ml methanolu. Vzorky byly následně na třepače extrahovány po dobu 60 minut a filtrovány přes papírový filtr. Do zkumavek bylo pipetováno 200 μl filtrátu a 7,8 ml methanolu při analýze vzorků z rostliny *Acer pseudoplatanus* a 2 ml filtrátu a 6 ml methanolu ve vzorcích *Acer negundo*. Následně bylo 1,7 ml vzorku přefiltrováno pomocí stříkačkového filtru do vialek a použito k LC/MS analýze. LC/MS analýza byla provedena s využitím chromatografické pumpy Accela 1250 a hmotnostního spektrometru TSQ Quantum Access MAX (Thermo Scientific, USA) vybaveným sondou pro vyhřívaný elektrosprej (HESI II). K chromatografické separaci byla využita kolona Thermo Scientific Hypersil C18 (2,1 mm \times 100 mm, 1,9 μm) a gradient mobilní fáze složený z methanolu a vody. Mez detekce byla pro vzorky javoru klen 2,21 mg/kg a pro vzorky javoru jasanolistého 0,208 mg/kg. Statistická analýza byla provedena s využitím software Unistat. Data byla testována na normalitu pomocí testu Kolmogorov-Smirnov. Vzhledem k tomu, že data neměla normální rozdělení, byl dále využit k porovnání jednotlivých souborů neparametrický Mann-Whitney test. V případě, že obsah HGA ve vzorku byl pod mezí detekce, byla pro statistické hodnocení použita polovina hodnoty meze detekce.

Výsledky

Hypoglycin A byl nalezen ve všech vzorcích javoru klen. V případě javoru jasanolistého byl nalezen hypoglycin A ve všech vzorcích nažek, ve vzorcích listů byl obsah hypoglycinu A pod mezí detekce v případě 8 vzorků. Pomocí Mann-Whitneyho testu nebyl nalezen statisticky významný ($p > 0,05$) rozdíl mezi obsahem HGA v nažkách a semenáčcích javoru klen. V případě javoru jasanolistého byl pomocí Mann-Whitneyho testu nalezen statisticky významně vyšší ($p < 0,01$) obsah HGA v nažkách ve srovnání s listy (Obr. 1). Dále byl s využitím Mann-Whitneyho testu nalezen statisticky významně vyšší ($p < 0,01$) obsah HGA v nažkách pocházejících z javoru klen ve srovnání s nažkami pocházejících z javoru jasanolistého (Obr. 2).



Obr. 1. Obsah HGA v nažkách (n=19) a listech (n=14) javoru jasanolistého. Sloupce představují průměr a chybové úsečky střední chybu průměru. Rozdílná písmena indikují statistickou významnost ($p < 0,01$)



Obr. 2. Obsah HGA v nažkách javoru klen (n=21) a javoru jasanolistého (n=19). Sloupce představují průměr a chybové úsečky střední chybu průměru. Rozdílná písmena indikují statistickou významnost ($p < 0,01$)

Můžeme také potvrdit, že obsah HGA se liší mezi jednotlivými stromy v rámci jedné pastviny, jako tomu bylo v Pravlově, kde bylo v nažkách určitých stromů naměřeno až desetkrát více HGA oproti stromům stejného druhu v jejich bezprostřední blízkosti. Zajímavým zjištěním byla opakovaně naměřená vyšší koncentrace ve vzorcích obou druhů javorů z Mladoboleslava, naopak nižší hodnoty byly zjištěny v okolí Brna. Na základě toho můžeme předpokládat, že se množství HGA liší také v jednotlivých lokalitách. Protože však všechny vzorky nebyly sbírány ve stejnou dobu, musíme

brát v úvahu i možnou změnu koncentrací této látky v závislosti na ročním období. Na základě této studie můžeme potvrdit, že javor klen obsahuje významné množství HGA, zejména jeho nažky a semenáčky, které tak pro koně na pastvině představují největší riziko. U javoru jasanolistého můžeme na základě porovnání jeho nažek s nažkami javoru klenu očekávat výrazně nižší hladiny HGA. To by mohlo odpovídat menšímu počtu případů atypické myopatie vyvolané pozřením javoru jasanolistého a mírnějšímu průběhu otravy. Protože však na území České republiky byl zatím popsán pouze jeden potvrzený případ intoxikace HGA z javoru jasanolistého, nelze na základě toho udělat konečný závěr. Ke zhodnocení rizika rozvoje fatální intoxikace by bylo potřeba více dokumentovaných případů otravy tímto druhem javoru na našem území a také porovnání hladiny HGA v jeho semenáčcích z různých lokalit.

Závěr

Byl prokázán významný rozdíl v obsahu hypoglycinu A mezi javorem klen a javorem jasanolistým. HGA byl prokázán ve všech vzorcích javoru klenu (nažky, semenáčky), avšak nebyl zjištěn významný rozdíl v hladině této látky mezi nimi. U javoru jasanolistého byl HGA přítomen ve všech vzorcích nažek, v listech byla jeho koncentrace oproti nažkám výrazně nižší a v několika vzorcích dokonce pod mezí jeho detekce.

Seznam literatury:

- 1) VOTION, D.M.; HABYARIMANA, J.A.; SCIPPO, M.L.; RICHARD, E.A.; MARCILLAUD-PITEL, C.; ERPICUM, M.; GUSTIN, P.: Potential new sources of hypoglycin A poisoning for equids kept at pasture in spring: a field pilot study. *Veterinary Record*. 2019, 184, 740.
- 2) LUDVÍKOVÁ, E.; HRDINOVÁ, F.; JAHN, P.: Atypical myopathy-new knowledge and situation in the Czech Republic. *Veterinářství*. 2014, 64(4), 310–314.
- 3) LUDVÍKOVÁ, E.; FEBEN, M.; VLADAŘOVÁ, L.: Atypical myoglobinuria in the Czech Republic. *Veterinářství*. 2012, 62(8), 492–494.
- 4) KARLÍKOVÁ, R.; ŠIROKÁ, J.; MECH, M.; FRIEDECKÝ, D.; JANEČKOVÁ, H.; MÁDROVÁ, L.; HRDINOVÁ, F.; DRÁBKOVÁ, Z.; DOBEŠOVÁ, O.; ADAM, T.; JAHN, P.: Newborn foal with atypical myopathy. *Journal of veterinary internal medicine*. 2018, 32(5), 1768-1772.
- 5) WESTERMANN, C.M.; VAN LEEUWEN, R.; VAN RAAMSDONK, L.W.; MOL, H.G.: Hypoglycin A concentrations in maple tree species in the Netherlands and the occurrence of atypical myopathy in horses. *Journal of veterinary internal medicine*. 2016, 30(3), 880-884.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 204/2021/FVHE

Dynamika, komparatívna genomika a riziko šírenia multirezistentných patogénnych línií

***Escherichia coli* u rackov bielohlavých na vodnom diele Nové Mlýny**

Jana Palkovičová^{1,2}, Kristína Nešporová^{1,2}, Tomáš Nohejl^{1,2}, Marek Schneider¹, Monika Dolejská^{1,2}

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

Úvod

Zvyšujúci sa výskyt antibiotickej rezistencie ku klinicky významným antibiotikám (najmä širokospektrálne beta-laktámy a fluorochinolóny) používaným na liečbu závažných infekcií v humánnej aj veterinárnej medicíne u týchto patogénov sa stala obrovským globálnym rizikom (1). Nadmerné alebo nesprávne používanie antibiotík zanecháva reziduá týchto látok v prostredí, a tým dochádza k selekcii kmeňov, ktoré sú k antibiotikám rezistentné. Šírenie bakteriálnych kmeňov, ktoré disponujú génmi pre antibiotickú rezistenciu, je naďalej podporené interakciami rôznych organizmov a prostredia (2).

Racky majú tendenciu žiť sa ľahko dostupnou potravou spojenou s ľudskými aktivitami, ako sú napríklad skládky odpadov. Predchádzajúce štúdie ukázali, že pojedaním zvyškov zo skládok odpadu môžu byť racky kolonizované bakteriálnymi kmeňmi prirodzene sa vyskytujúcimi u ľudí. Fekálna kontaminácia spôsobená týmito divo žijúcimi vtákmi prispieva k šíreniu ľudských patogénov do prostredia, čím sa môžu dostať do kontaktu s ďalšími organizmami (3). V Českej republike zimuje a hniezdi niekoľko druhov rackov. Jedným z ich pravidelných hniezdísk je nádrž Nové Mlýny. Tá je rozdelená na niekoľko častí, jedna z oblastí slúži ako prírodná rezervácia, kde je možné pozorovať mnohé druhy vtákov (vrátane rackov), ale iné lokality sú využívané na rekreačné účely (4).

Cieľom tejto štúdie teda bolo sledovať populácie rackov hniezdiacich na ostrovčekoch tejto nádrže, charakterizovať bakteriálne kmene, ktorými sú kolonizované, a kvantifikovať riziko spojené s výskytom a šírením patogénnych multirezistentných baktérií.

Materiál a metodika

Zbierka izolátov bola vytvorená 72 vzorkami kloakálnych sterov rackov bielohlavých (*Larus cachinnans*) z roku 2018, 45 vzorkami z roku 2019 a vzorkami vody z vodnej nádrže Nové Mlýny z roku 2019. Izoláty boli selektované na médiu s cefotaximom (2 µg/ml) a ciprofloxacinom (0,05 µg/ml). Každá vzorka bola rezistentná aspoň na jedno z týchto antibiotík.

U získaných izolátov sme charakterizovali rezistenčný fenotyp, a to testom na citlivosť pomocou diskovej difúznej metódy k panelu 20 antibiotík, ktoré sú zaužívaným štandardom *European Commitee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), a komerčným fenotypovým testom

MASTDISCS® Combi na detekciu produkcie beta-laktamáz a odlišenie producentov širokospektrálnych beta-laktamáz (ESBL) a AmpC beta-laktamáz. Pomocou zaužívaného PCR skrínungu boli identifikované gény rezistencie voči klinicky významným antibiotikám (beta-laktámy, chinolóny).

Na základe fenotypových testov a PCR skrínungu boli vybrané izoláty na celogenómové sekvenovanie (WGS). Celogenómová DNA bola extrahovaná NucleoSpin® Tissue kitom. Knižnica bola pripravená pomocou kitu Nextera XT a sekvenovaná na platforme HiSeq (Illumina). Zo získaných dát boli odfiltrované adaptéry a čítania zlej kvality pomocou programu Trimmomatic a sekvencie izolátov boli poskladané pomocou algoritmu SPAdes. Pomocou MLST (*Multilocus Sequence Typing*) sa určil sekvenčný typ (ST) bakteriálnych kmeňov. Plazmidové replikóny boli detegované pomocou nástroja PlasmidFinder. Gény pre rezistenciu k antibiotikám boli identifikované pomocou nástroja ResFinder. Následne bola určená lokalizácia génov – na chromozóme alebo na plazmide.

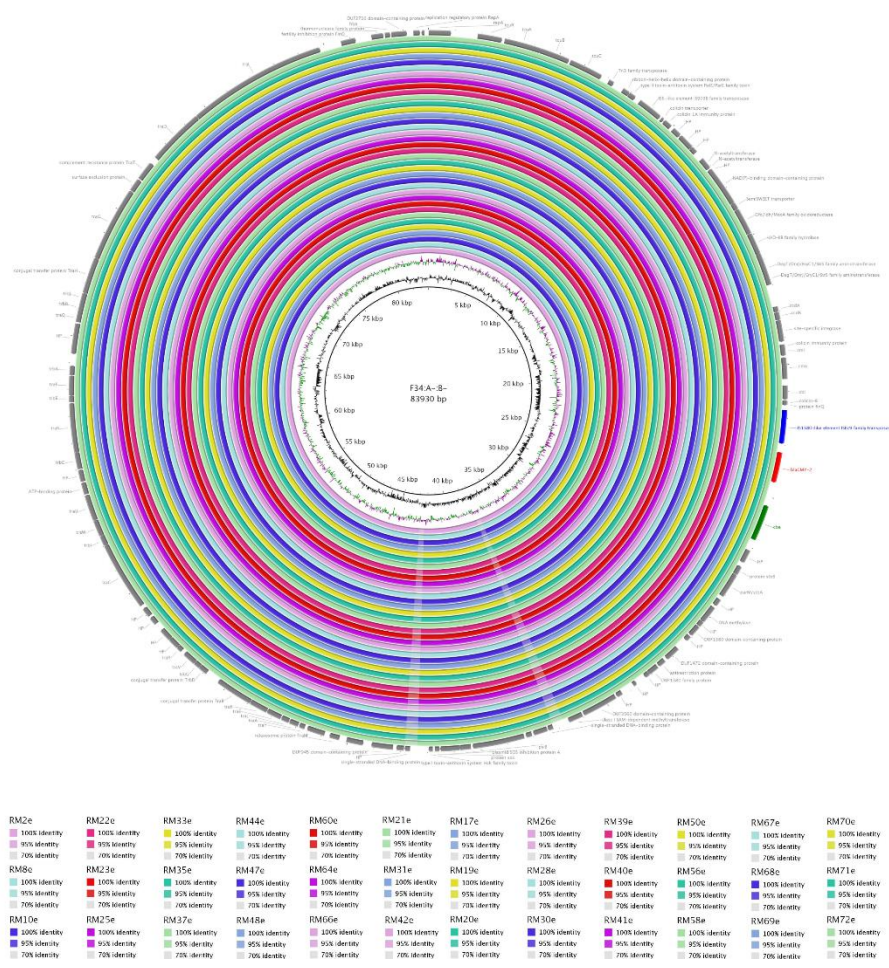
Výsledky

Testovaný súbor izolátov bol získaný selekciou vzoriek na médiu s cefotaximom (2 µg/ml) a ciprofloxacínom (0,05 µg/ml) zo sterov rackov a z odberov vody z rekreačnej nádrže Nové Mlýny. Selekciami na médiu s cefotaximom sme získali 57 izolátov *E. coli* (79 %) z kloakálnych sterov z roku 2018 a 16 izolátov (36 %) z roku 2019. Z média na ciprofloxacíne bolo získaných 58 izolátov *E. coli* (81 %) z roku 2018 a 36 izolátov (80 %) z roku 2019. Každá vzorka bola rezistentná aspoň na jedno z týchto antibiotík. Po vyradení duplicitných izolátov (rezistentných na cefotaxim aj na ciprofloxacín) zo sterov rackov bolo na ďalšie analýzy vybraných 99 izolátov *E. coli* z roku 2018 a 32 izolátov z roku 2019. Zo vzoriek vody bolo selekciou na cefotaxime získaných 14 izolátov, ale z média s ciprofloxacínom bolo možné získať len 1 izolát. Zo vzoriek kloakálnych sterov rackov bolo multirezistentných (k 3 a viac antibiotikám) 87 % izolátov (86/99) z roku 2018 a 81 % izolátov (22/27) z roku 2019. Všetky izoláty získané zo vzoriek vody boli multirezistentné.

Rezistentné izoláty niesli gény rezistencie k beta-laktámom (*bla*_{CARB}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY}), chinolónom (*qnrB*, *qnrS*), amfenikolom (*catA1*), sulfonamidom (*sul1*, *sul2*), tetracyklínom (*tetA*, *tetB*) aj k streptomycínu (*strA*). Pomocou WGS sme identifikovali konkrétne varianty génov pre produkciu ESBL a AmpC beta-laktamáz, a to *bla*_{CARB-2}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-106}, *bla*_{TEM-52}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-27}, *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{CMY-2} a k fluorochinolónom (*qnrS1*, *qnrB19*). Len 1 z izolátov neniesol žiadne plazmidy, u zvyšných 99 % (139/140) izolátov bol identifikovaný aspoň 1 z plazmidových replikónov B/O/K/Z, C, FIA, FIB, FIC, FII, HI1, HI2, I1, I2, N, R, X1, X2, X4, Y.

Na základe fylogenetickéj analýzy bolo identifikovaných 31 rôznych ST u izolátov zo sterov rackov v roku 2018 a 15 rôznych ST v roku 2019, pričom sa pracovalo s 3x menej izolátmi z roku 2019. Najviac prevalentné boli v roku 2018 *E. coli* ST11893 (37/99), nasledovali *E. coli* ST155 (7/99) a ST2325 (4/99). V roku 2019 boli zo sterov rackov najviac prevalentné *E. coli* ST2325 (8/27) a ST351 (3/27). V 15 izolátoch získaných zo vzoriek vody bolo identifikovaných 5 rôznych ST, z ktorých najprevalentnejšie boli *E. coli* ST10 (7/15) a *E. coli* ST2325 (4/15), ktoré boli detegované aj u izolátov zo sterov rackov z roku 2019. *E. coli* ST2325 boli u rackov identifikované už v roku 2018, ale v oveľa menšej miere (4 %) než v roku 2019 (30 %).

Rozšírenie izolátov rezistentných k fluorochinolónom bolo podobné v oboch rokoch (asi 80 %). Prevalencia izolátov rezistentných k beta-laktámom získaných vzorkovaním rackov bola ale v roku 2019 signifikantne nižšia (36 %, 16/45) oproti roku 2018, kde bolo pozorovaných 81 % rezistentných *E. coli* izolátov (57/72). Analýzou WGS dát sme identifikovali bakteriálnu líniu *E. coli* ST11893 u 65 % týchto izolátov (37/57 rezistentných). Tento klon niesol F34:A-B1 plazmid, ktorý kodoval beta-laktamázu CMY-2. V roku 2019 tento klon vymizol. Vo všetkých izolátoch bol tento IncF plazmid identický, ako je vizualizované na obrázku 1.



Obr. 1. Porovnanie F34:A-B- plazmidov z rôznych *E. coli* izolátov

Hlbšou analýzou plazmidu sme zistili, že gén *bla_{CMY-2}* bol začlenený tak, že narušil gén pre kolicín zodpovedný za lýzu iných bakteriálnych kmeňov v populácii, a tým pravdepodobne došlo k zníženiu schopnosti konkurovať iným baktériám, ako napríklad línii *E. coli* ST2325, ktorá v roku 2019 prevládla.

Záver

Racky bielohlavé voľne žijúce v oblasti rekreačnej nádrže Nové Mlýny boli kolonizované multirezistentnými kmeňmi *E. coli*. Tieto bakteriálne kmene boli rozšírené nielen medzi rackami, ale aj vo vode nádrže, čo predstavuje značné riziko pre ľudské zdravie aj pre okolité prostredie. Okrem toho sme demonštrovali význam plazmidov vo výskyte a šírení multirezistentných izolátov.

Zoznam literatúry:

- 1) MANGES, AR., et al. Global Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Lineages. Clin Microbiol Rev, 2019; 32: e00135-18.
- 2) ALVES, MS., et al. Seawater is a reservoir of multi-resistant *Escherichia coli*, including strains hosting plasmid-mediated quinolones resistance and extended-spectrum beta-lactamases genes. Front Microbiol, 2014; 5: 426.
- 3) ALM, EW., et al. Potential for gulls to transport bacteria from human waste sites to beaches. Sci Total Environ, 2018; 615: 123-130.
- 4) <http://www.pasohlavky.cz/novomlynske-nadrze/>

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI Brno 208/2021/FVHE

Antioxidační a protizánětlivé účinky jedlého hmyzu v závislosti na krmení

Martina Pečová, Simona Ljasovská, Jan Gregar, Matej Pospiech, Zdeňka Javůrková

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

Úvod

Hmyz a produkty z jedlého hmyzu jsou jedním z velkých témat posledních let. EFSA (Evropský úřad pro bezpečnost potravin) vydala začátkem roku 2021 stanovisko, ve kterém byl moučný červ (*Tenebrio molitor*) označen jako bezpečná potravina. V návaznosti na to byl v květnu roku 2021 tento hmyz prvním schváleným druhem. S úpravou nové evropské legislativy je možné některé druhy hmyzu přidávat do potravin ale i krmiv.

Velkou výhodou při produkci hmyzu je jeho nízká zátěž na životní prostředí. Kromě vysoké míry reprodukce je hmyz spojován také s nízkou spotřebou krmiva a vody. Zároveň nevyžaduje příliš velké plochy pro chov a produkuje méně skleníkových plynů než například hovězí dobytek (1, 2). Významné nutriční složení je jedním z důvodů, proč se o hmyzu mluví jako o alternativním zdroji proteinů. Proteiny jsou u některých druhů zastoupeny až 77 %, navíc obsahují významné esenciální aminokyseliny a v neposlední řadě jsou také dobře stravitelné (3). Proteiny jsou ve stravě nezastupitelnou složkou. Zastávají nespočet funkcí a jsou důležité pro správné fungování organismu. Při jejich degradaci dochází ke vzniku peptidů a aminokyselin, které navíc nesou další významné funkční vlastnosti. Z některých studií vyplývá, že bioaktivní peptidy získané z proteinů hmyzu vykazují nejen známky antioxidačních účinků, ale také některých dalších pozitivních účinků na zdraví (4,5).

Krmiva pro zvířata se často vyrábí s ohledem na komponenty, které mají po následné digesti a absorpci, pozitivně ovlivnit růstové vlastnosti a zároveň zabezpečit rovnoměrný přísun důležitých látek. S cílem zajistit přirozené produkty živočišného původu, s co možná nejlepšími vlastnostmi na zdraví a údržnost, je tendence přidávat antioxidanty přímo do krmiv a krmných směsí. Z hlediska toxicity se eliminují přídatky syntetické a volí se antioxidanty přírodní. Ve studii Pena-Bermudeze et al. (6) sledovali vliv látek s antioxidačními vlastnostmi, přidávaných do krmiva, na jakostní znaky masa jehňat.

Materiál a metodika

Chov larev potměníka brazilského (*Zophobas morio*) probíhal v experimentálních podmínkách v plastových boxech při konstantní teplotě 22 °C. Skupiny byly rozděleny do 3 variant po 2 opakováních. Každá varianta byla označena příslušným druhem krmiva, které bylo měněno

v týdenních intervalech. Voda ve formě pekingského zelí byla dodávána *ad libitum*. Krmivo pro jednotlivé varianty bylo následující: 1-2 (komerční krmná směs pšeničných klíčků a pšeničných otrub), 3-4 (sójové vločky) a 5-6 (kukuřičné vločky). Každá skupina obsahovala $550 \text{ g} \pm 0,6494 \text{ g}$ jedinců. Pokus probíhal, včetně adaptačního týdne, 5 týdnů. Během každého týdne byla měřena délka a hmotnost náhodných 10 jedinců pro každou skupinu. Celková hmotnost každé skupiny byla zaznamenávána. Pro ukončení pokusu byl hmyz ponechán 24 hodin vytrávit a následně šokově zmražen a pro následující analýzy uchováván při mrazírenských teplotách.

Pro účely analýz byly vzorky hmyzu upraveny 3 způsoby: celý bez enzymatické hydrolyzy (N), celý hydrolyzovaný (C), enzymaticky hydrolyzovaný extrahovaný protein (O). Extrakce proteinu byla provedena na základě srážení proteinů za pomoci NaOH a HCl. Enzymatická hydrolyza byla provedena u variant C a O dle metodiky Jakubczyk et al. (7).

Pro stanovení celkových polyfenolů byla použita spektrofotometrická metoda dle Folin-Ciocalteua, vycházející ze studie Zhang et al. (9). Antioxidační kapacita (TAC) byla stanovena metodami ABTS a DPPH spektrofotometricky. Pro všechna stanovení byly vzorky 4x zředěny a následně odstředěny pro zbavení kalu. Všechny metody byly upraveny pro mikrotitrační destičky a měření probíhalo pomocí spektrofotometru Infinite M Nano (Tecan, Rakousko). Protizánětlivé účinky jednotlivých vzorků byly stanoveny pomocí kitu (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Tento test měří peroxidázovou složku COX. Aktivita peroxidázy se měří kolorimetricky sledováním výskytu oxidovaného N, N, N', N'- tetramethyl-p-phenylenediaminu při 590 nm.

Výsledky

Z chovného pokusu vyplývá, že hmotnost larev potemníka brazilského se konstantně snižovala u skupiny 3 a 4, tedy jedinců, kteří přijímali jako krmivo sójové vločky. Nejúspěšnějším krmivem, z hlediska zvyšování hmotnosti skupiny, bylo pozorováno u krmiva pšeničného charakteru. Celkový vývoj změny hmotnosti ukazuje tab. 1. Průměrně hmotnost larev potemníka, na konci pokusu po vytrávení, na pšeničném krmivu dosahovala $750,05 \text{ g} \pm 2,33$. Pro sójové krmivo $109,45 \text{ g} \pm 18,17$ a pro kukuřičné krmivo $701,55 \text{ g} \pm 4,60$.

Tabulka 1. Vývoj hmotnosti larev potemníka v závislosti na krmení v průběhu 5 týdnů

Krmivo		Pšeničné klíčky a otruby		Sójové vločky		Kukuřičné vločky	
Skupina		1	2	3	4	5	6
Hmotnost (g)							
Týden	1	550,7	549,8	551	549,9	550,1	551,4
	2	685,9	683,9	378,7	397,2	663	666,2
	3	708,7	686,9	327,1	329,4	668,9	662,5
	4	755,3	755,6	204,7	200,5	707,6	716,7
	5	772	773,1	126,9	101,3	720,1	726,8
Po vytrávení		751,7	748,4	122,3	96,6	698,3	704,8

Výsledky chovného pokusu potvrdily, že pšeničné klíčky a otruby jsou vhodnou krmnou směsí pro chov potemníka brazilského, který při této formě krmení dosahuje nejvyšší hmotnostní přírůstek. Krmná dávka, kromě zvyšování hmotnosti, pro hmyz představuje také životní prostředí a jako takové má vliv i na další parametry takto vyprodukovaného hmyzu. V této studii byl proto sledován vliv krmné dávky na antioxidační vlastnosti hmyzího produktu a zároveň vliv na potenciální protizánětlivé účinky.

Tabulka 2. Výsledky měření antioxidačních a protizánětlivých ukazatelů pro jednotlivé skupiny

	N				C				O			
	polyfenoly (mg/1 kg kys. gallové)	ABTS (%)	DPPH (%)	COX (%)	polyfenoly (mg/1 kg kys. gallové)	ABTS (%)	DPPH (%)	COX (%)	polyfenoly (mg/1 kg kys. gallové)	ABTS (%)	DPPH (%)	COX (%)
1	0,1577	22,7371	12,9834	64,8693	0,3296	34,9630	15,8168	85,8191	0,1213	7,5925	5,3261	75,6864
	0,1663	21,7283	11,1902	66,4770	0,2820	24,4990	15,0696	64,2015	0,1152	7,2629	4,7403	76,7252
2	0,1383	23,9476	12,5172	97,8894	0,3108	31,0356	17,3710	65,8669	0,1808	7,1285	6,4917	69,9852
	0,1710	21,9704	12,8161	76,6098	0,2581	27,2159	11,3097	86,8497	0,1499	6,0457	4,8957	78,3206
3	0,2657	40,1816	18,8475	68,6207	0,3813	26,6644	16,4624	81,9359	0,1469	6,5367	4,5131	73,9550
	0,2557	39,1527	17,8373	65,1414	0,4181	33,6516	17,6639	65,7515	0,1382	6,0592	4,2441	77,5909
4	0,1552	25,8104	11,9613	70,2614	0,4402	28,4398	14,5317	99,1508	0,1476	7,4781	0,8249	83,3540
	0,2191	26,4492	11,5428	74,3672	0,4409	36,5905	14,9740	77,8218	0,1471	6,6644	1,9427	74,8207
5	0,1092	18,4667	8,7333	78,9430	0,2741	17,6059	7,8008	84,1702	0,0991	5,2051	0,8428	74,1776
	0,1108	18,1103	8,6317	69,0824	0,2297	18,6079	9,7077	66,4853	0,1096	5,9449	0,8309	61,3406
6	0,1090	17,5252	8,0100	86,1324	0,2524	18,8366	8,8290	71,1271	0,0925	4,6402	0,5320	59,6092
	0,1096	19,3813	7,9921	78,8029	0,2813	23,6382	9,7794	82,0843	0,1025	6,1601	0,4364	59,6092

Z tabulky 2 vyplývá, že nejvyšší obsah polyfenolů byl u celého enzymaticky hydrolyzovaného hmyzu (C), nejvyšší u hmyzu krmeného sójovými vločkami, následoval hmyz krmený pšeničnými klíčky a otrubami a nakonec kukuřičnými vločkami. Nejvyšší obsah polyfenolů u larev všech skupin byl u hmyzu krmeného krmivem obsahujícím sóju. Hmyz, který byl krmen krmivem s obsahem polyfenolů je schopen tyto polyfenoly absorbovat. Tento jev byl pozorován například u studie Nina et al. (10) aplikované na cvrčka domácího (*Acheta domestica*). Nejvyšší obsah polyfenolů byl pozorován u vzorků s nejvyšší antioxidační aktivitou vyjádřenou jako % inhibice DPPH* (8). To bylo pozorováno i u našich vzorků (viz tab. 2). Nejvyšší koncentrace polyfenolů odpovídají nejvyššímu procentu inhibice DPPH* v 75 % případů u prvních 4 nejvyšších hodnot pro všechny způsoby přípravy vzorku (N, C, O). Podobná pozitivní korelace mezi celkovým obsahem polyfenolů a antioxidační aktivitou byla popsána i u extraktů z hmyzu cvrčka domácího (*Acheta domestica*) a potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) ve studii Navarro Del Hierro et al. (8).

U protizánětlivých účinků, změřených pomocí kitu byly shledány rozdíly mezi pšeničnými klíčky a otrubami ($69,04 \pm 6,37$) a sójovými vločkami ($80,69 \pm 12,48$) u nativního hmyzu (N). U ostatních typů přijímaného krmiva a způsobů zpracování hmyzu nebyly protizánětlivé účinky mezi skupinami

rozdílné. Průměrně se protizánětlivé účinky vyjádřené v procentech pohybovali: u vzorků O $72,10 \pm 7,85$, u vzorků C $77,61 \pm 11,00$ a u vzorků N $74,77 \pm 9,77$.

Závěr

Z chovného pokusu larev potměníka brazilského vyplývá, že pro dosažení nejlepšího hmotnostního přírůstku není sójové krmivo příliš vhodnou variantou. Výběr krmiva zároveň ovlivňuje obsah polyfenolů a antioxidační vlastnosti u tohoto hmyzu. Je zřejmé, že bioaktivní látky z krmiva přechází do výsledné potraviny – jedlého hmyzu. Přídavek larev potměníka brazilského do potravin může pozitivně ovlivnit množství bioaktivních látek v těchto potravinách. Díky těmto poznatkům by bylo možné hmyz zařadit i mezi funkční potraviny.

Seznam literatury:

- 1) IMATHIU S., 2020. Benefits and food safety concerns associated with consumption of edible insects. *NFS Journal*, vol. 18, p. 1-11.
- 2) MISHRA G., OMKAR O., 2017. Insects as Food. *Industrial Entomology*, Springer Nature Singapore Pte Ltd, p. 413-434.
- 3) XIAOMING C., YING F., HONG Z., ZHIYONG C., 2010. Review of the nutritive value of edible insects. *Forest insects as food: humans bite back*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, p. 85-92.
- 4) JANTZEN DA SILVA LUCAS A., MENEGON DE OLIVEIRA L., DA ROCHA M., PRENTICE C., 2020. Edible insects: An alternative of nutritional, functional and bioactive compounds. *Food Chemistry*, vol. 311.
- 5) ZIELIŃSKA E., BARANIAK B., KARAŚ M., 2017. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Hydrolysates and Peptide Fractions Obtained by Enzymatic Hydrolysis of Selected Heat-Treated Edible Insects. *Nutrients*, vol. 9, no. 9, 14 p.
- 6) PENA-BERMUDEZ Y. A., LOBO R. R., ROJAS-MORENO D. A., POLETI M. D., DE AMORIM T. R., ROSA A. F., PEREIRA A. S. C., PINHEIRO R. S. B., BUENO I. C. S., 2020. Effects of Feeding Increasing Levels of Yerba Mate on Lamb Meat Quality and Antioxidant Activity. *Animals*, vol. 10, no. 9, 14 p.
- 7) JAKUBCZYK A., KARAŚ M., BARANIAK B., PIETRZAK M., 2013. The impact of fermentation and *in vitro* digestion on formation angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from pea proteins. *Food Chemistry*, vol. 141, no. 4, p. 3774-3780.
- 8) NAVARRO DEL HIERRO J., GUTIÉRREZ-DOCIO A., OTERO P., REGLERO G., MARTIN D., 2020. Characterization, antioxidant activity, and inhibitory effect on pancreatic lipase of extracts from the edible insects *Acheta domesticus* and *Tenebrio molitor*. *Food Chemistry*, vol. 309.
- 9) ZHANG Q., ZHANG J., SHEN J., SILVA A., DENNIS D., BARROW C., 2006. A Simple 96-Well Microplate Method for Estimation of Total Polyphenol Content in Seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, vol. 18, p. 445-450.
- 10) NINO M., REDDIVARI L., FERRUZZI M., LICEAGA A., 2021. Targeted Phenolic Characterization and Antioxidant Bioactivity of Extracts from Edible *Acheta domesticus*. *Foods*, vol. 10, no. 10.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 224/2021/FVHE

Riziko vybraných nanokovů a jejich oxidů na akvatický ekosystém

Michal Příbyl, Lucie Tesařová, Barbora Havelková

*Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární univerzita Brno*

Úvod

Spektrum využití nanomateriálů se rychle rozšiřuje, zejména díky unikátním fyzikálně-chemickým vlastnostem nanočástic. Pro své antibakteriální účinky mají materiály na bázi nano kovů a jejich oxidů (ZnO, CuO) velké uplatnění v medicíně a biologii. Nárůst jejich environmentálních koncentrací je zřejmý, rezidua jsou zjišťována v půdě, povrchových vodách, sedimentech, podzemních vodách i v mořských ekosystémech (1). Nanoforma oxidu zinku je využívána v různých odvětvích. V kosmetice se například přidává do přípravků na opalování, vzhledem k tomu, že lépe odráží či absorbuje UV záření. Při kontaktu s vodou však dochází k uvolnění až 25 % nanoseného krému, což při dlouhodobém užívání a zejména v turistických oblastech může zvyšovat ekologická rizika (2). V zemědělství se nanoforma zinku využívá například v postřicích na ochranu rostlin nebo jako přídatek do diety k dosažení antimikrobiální aktivity chovaných zvířat (3). Měď je léty prověřená fungicidní látka, obzvláště často používaná na vinicích a v ekologickém zemědělství. Ionty mědi mají schopnost bránit klíčení spor plísní, avšak pro dosažení tohoto účinku je potřeba aplikovat velké množství mědi. Řešením se jeví nanotechnologie za použití nanokomplexů mědi, čímž se dosáhne výrazného snížení dávky mědi při zachování fungicidního účinku (4). S narůstajícími koncentracemi nanočástic v jednotlivých složkách životního prostředí roste i jejich potenciální riziko pro vodní biocenózu. Relevantní informace zejména o subletálních efektech na vodní organismy jsou stále sporadické.

Materiál a metodika

Pro posouzení vlivu vybraných nanokovů na vodní biocenózu byly zvoleny testy akutní toxicity na sladkovodní řase *Pseudokirchneriella subcapitata*, na okřehku menším *Lemna minor*, na sladkovodním korýši *Daphnia magna*, nitěnce *Tubifex tubifex* a raných vývojových stádiích dania pruhovaného. Metodicky se postupovalo dle příslušných norem a to OECD 201 (Test inhibice růstu řas), OECD 221 (Test inhibice růstu *Lemna* sp.), OECD 202 (Akutní imobilizační test s *Daphnia* sp.) a jako alternativa k testu toxicity na rybách test dle OECD 236 (Embryonální test toxicity). Pro testy s nitěnkou byla využita modifikovaná metodika dle OECD 207.

Testy s vodními organismy byly vybrány tak, aby byla zastoupena trofická úroveň producenta, konzumenta a destruenta. Princip testu inhibice růstu řas *P. subcapitata* spočívá v jejich kultivaci

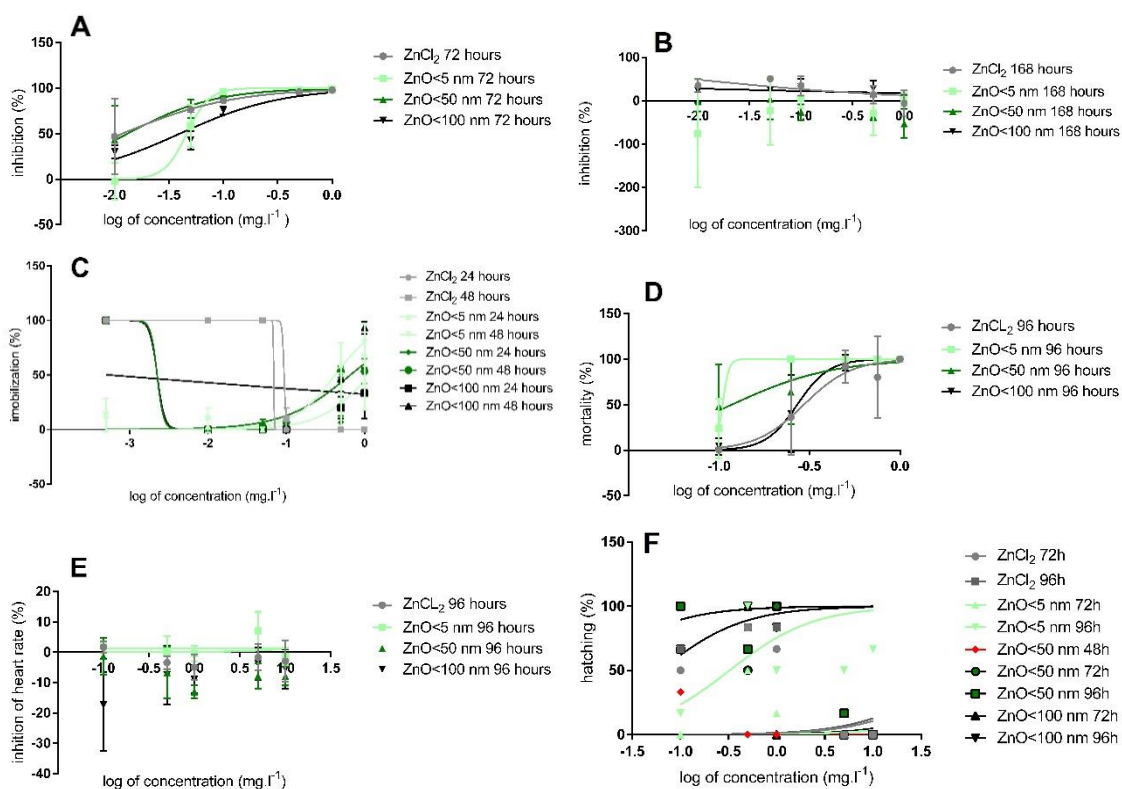
v živném médiu, které obsahuje testovanou látkou v různých koncentracích. Účinek testované látky na řasovou kulturu se projeví jako inhibice růstové rychlosti v porovnání s kontrolami v čistém živném roztoku. V testu s okřehkem menším se sleduje inhibice rychlosti růstu a biomasy okřehku za 168 hodin. Akutní test na perloočkách *D. magna* spočívá ve sledování jejich imobilizace ve zvoleném rozsahu koncentrací testované látky při expozici 24 a 48 hodin. Principem zkoušky s nitěnkou *T. tubifex* je vystavení pěti stejně velkých jedinců působení testované látky po dobu 96 hodin. Sledovanými efekty jsou mortalita a imobilizace. Akutní toxický účinek testovaných látek na jikry ryb dania pruhovaného (*D. rerio*) je hodnocen na základě hodnot LC50 (letální koncentrace) a dalších subletálních efektů (líhnutí, srdeční frekvence, edém, oddělení ocasu, nepřítomnost somitů, úniková reakce a deformity páteře) po dobu 96 hodin.

Koncentrační řada nanočástic kovů byla stanovena na základě předběžných testů. Současně pro porovnání probíhaly testy s iontovou formou kovů. Koncentrační řada vybraných nanokovů (ZnO, CuO) a iontových forem kovů (ZnCl₂, CuCl₂·2H₂O) byla pro řasy a okřehek (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; a 1 mg.l⁻¹), pro dafnie (0,0005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 a 1 mg.l⁻¹), pro nitěnky (0,1; 0,25; 0,5; 0,75; a 1 mg.l⁻¹) a dania (0,1; 0,5; 1; 5; a 10 mg.l⁻¹). Byly otestovány tři velikosti nanočástic zinku, a to menší než 5, 50 a 100 nm a jedna velikost nanočástic mědi menších než 50 nm.

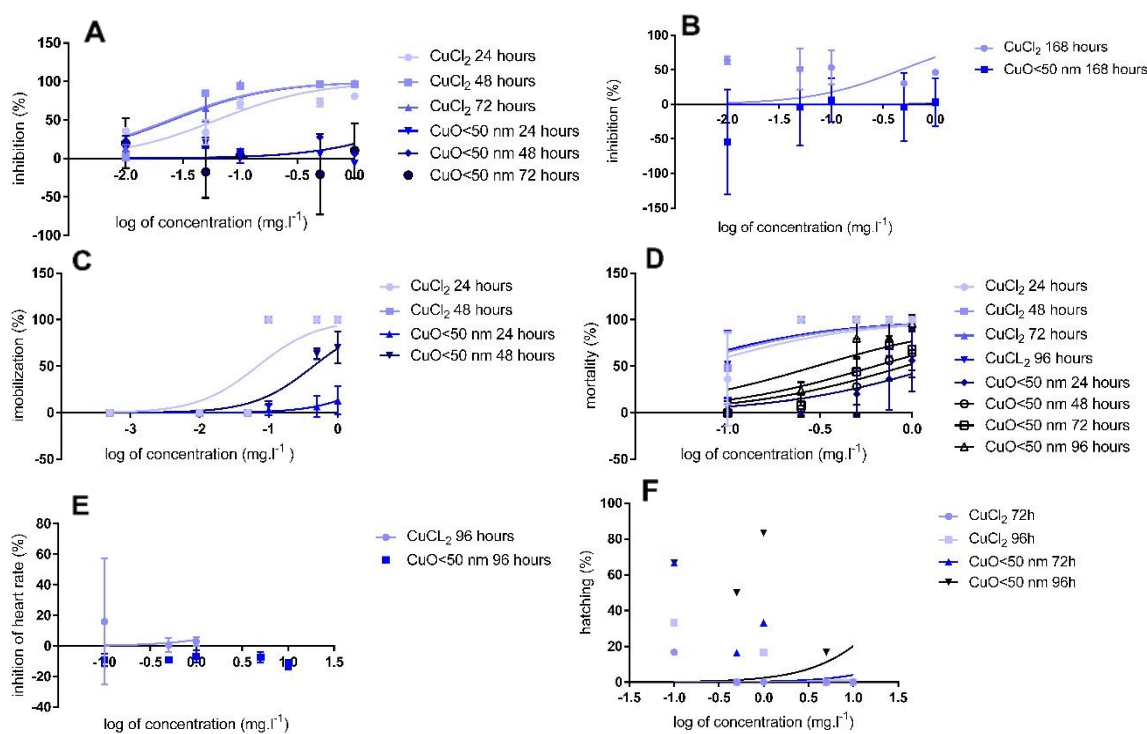
Výsledky

Na základě sledovaných letálních a subletálních efektů u testovacích organismů bylo posuzováno ekotoxikologické riziko kovových nanočástic, významných z hlediska vodní toxikologie. Citlivost k testovaným nanokovům jednotlivých zástupců vodní biocenózy se výrazně lišila. Rozdílné efekty byly zjištěny i v případě, kdy testovací organismy byly exponovány nanočásticím různé velikosti, případně iontovým formám kovů, výrazné rozdíly byly u rostlinných a živočišných zástupců vodní biocenózy. Zinek i měď jako mikrobiogenní prvky ovlivňují metabolické procesy v rostlinách. Mohou působit jako aktivátory nebo inhibitory biochemických procesů. Při nedostatku dochází k poškození chloroplastů a snižuje se fotosyntéza. To se ukázalo v případě okřehku, kdy s růstem koncentrace zinku byl zaznamenán výrazný nárůst biomasy (Graf 1). Naopak u řas působil zinek jako inhibitor biochemických procesů, což se projevilo v inhibici růstu (Graf 2). V případě *D. magna* jsme zaznamenali kumulaci agregátů měděných nanočástic ve střevech a na povrchu těla v závislosti se vzrůstající koncentrací testovaných nanokovů (Obrázek 1). Tyto agregáty znemožňují přirozený pohyb dafnií ve vodním sloupci. Změna ve velikosti těla nebyla zaznamenána. Pro *D. rerio* jsou nejvíce toxické iontové formy kovů. Se vzrůstající velikostí nanočástic toxicita klesá. Jako nejméně citlivý ukazatel se jeví mortalita danií. Bylo ovšem zaznamenáno výrazné ovlivnění líhnutí, které je

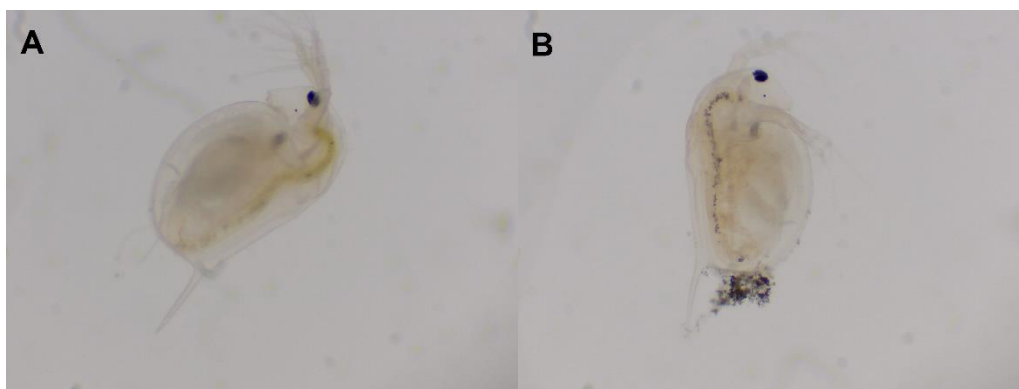
oproti kontrole opožděné nebo k němu po dobu testu nedochází. Srdeční rytmus byl oproti kontrole mírně stimulován u všech testovaných látek. Další subletální efekty zaznamenány nebyly.



Graf 1. Křivky dávka–odpověď ZnCl₂ a ZnO pro **A** *P. subcapitata* **B** *L. minor* **C** *D. magna* **D** *T. tubifex* a **E F** *D. rerio*. Chybové úsečky odpovídají 95% intervalům spolehlivosti.



Graf 2. Křivky dávka–odpověď CuCl₂·2H₂O a CuO pro **A** *P. subcapitata* **B** *L. minor* **C** *D. magna* **D** *T. tubifex* a **E F** *D. rerio*. Chybové úsečky odpovídají 95% intervalům spolehlivosti.



Obrázek 1. **A** *Daphnia magna* (kontrola) **B** *Daphnia magna* (1 mg.l⁻¹ CuO)

Závěr

Z výsledků je zřejmé, že nanočástice kovů ovlivňují negativně vodní biocenózu a to především na úrovni subletálních efektů. Relevantní informace zejména o těchto efektech na vodní organismy jsou stále sporadické. Je zřejmé, že akvatické organismy nejsou vystaveny působení pouze nanočástic, ale také jejich rozpustných a/nebo agregovaných produktů. Toxicita kovů je prokazatelně ovlivněna formou jejich výskytu ve vodě a fyzikálně chemickými vlastnostmi vody, zejm. hodnotou pH. Je proto třeba zaměřit se i na způsob přípravy roztoku (míchání, sonikace), přítomnost a míru osvětlení ovlivňující fotosyntézu autotrofních organismů a posoudit potenciální rizika nejen z hlediska akutní, ale i chronické a kombinované toxicity.

Seznam literatury:

- 1) GAW S., THOMAS K.V., HUTCHINSON T.H. Sources, impacts and trends of pharmaceuticals in the marine and coastal environment. *Philos Trans R Soc B*. 2014, 369(1656): 20130572. <http://doi.org/10.1098/rstb.2013.0572>
- 2) MILANI N., MCLAUGHLIN M.J., STACEY S.P., KIRBY J.K., HETTIARACHCHI G.M., BEAK D.G., CORNELIS G. Dissolution Kinetics of Macronutrient Fertilizers Coated with Manufactured Zinc Oxide Nanoparticles. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, s. 3991–3998.
- 3) HORKÝ P. a kol. VOJTĚCH A. Metodika modifikace a syntézy nanokomplexů zinku pro dietní využití u hospodářských zvířat, Brno: Mendelova univerzita v Brně. 2017, 28 s., ISBN 978-80-7509-535-0
- 4) GOGOS A., KNAUER K., BUCHELI T. Nanomaterials in Plant Protection and Fertilization: Current State, Foreseen Applications, and Research Priorities. *J Agric Food Chem.* 2012, 60(39), s. 9781–9792.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 219/2021/FVHE

Plazmidy přenášená rezistence ke kolistinu u humánních, animálních a environmentálních izolátů *Escherichia coli*: genomická surveillance

Petra Šišmová^{1,2}, Aneta Papoušková^{2,3}, Jana Palkovičová^{1,2}, Katarína Pomorská⁵, Vladislav Jakubů⁴, Ivana Chytilová⁵, Helena Žemličková⁴, Monika Dolejská^{1,2}

¹Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, ²CEITEC, Veterinární univerzita Brno, ³Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno, ⁴Státní zdravotní ústav Praha, ⁵Státní veterinární ústav Praha

Úvod

Přestože byla zaznamenána nižší spotřeba antibiotik včetně důrazu kladeného na jejich racionální aplikaci při léčbě běžných onemocnění, rostoucí antibiotická rezistence je i nadále alarmující. Závažným zjištěním je vzrůst odolnosti bakterií i na tzv. rezervní antibiotika, užívaná při léčbě život ohrožujících systémových infekcí způsobených multirezistentními kmeny. Jedním z těchto antibiotik je i kolistin. Problémem představující možný zdroj kolistinové rezistence je jeho běžné použití ve veterinární sféře při terapii gastrointestinálních infekcí vyvolaných neinvazivními gramnegativními bakteriemi (1). Donedávna byla rezistence ke kolistinu spojená pouze s chromozomálními mutacemi. Objev izolátů s plazmidy determinovanou rezistencí ke kolistinu zprostředkovanou geny *mcr* (z angl. „*mobile/modern colistin resistance*“) byl poprvé zaznamenán v roce 2015 u veterinárních izolátů v Číně. Nedlouho poté bylo dokumentováno celosvětové rozšíření genů *mcr* u *Enterobacteriaceae* (nejčastěji u *E. coli*) různého původu zahrnující pacienty, potravinová zvířata, potraviny i prostředí včetně volně žijících zvířat (4, 5). Doposud bylo detekováno celkem 10 variant *mcr* genů (*mcr-1* až *mcr-10*) zodpovědných za rezistenci ke kolistinu (2), které mohou být začleněné do chromozomu nebo umístěné na plazmidu s možností přenosu prostřednictvím konjugace (2, 3). Cílem projektu bylo stanovení prevalence a genotypu izolátů *E. coli* rezistentních ke kolistinu s plazmidy kódovanou rezistencí z lidí, hospodářských zvířat a prostředí České republiky.

Materiál a metodika

V rámci projektu byl analyzován soubor zahrnující klinické izoláty s plazmidy determinovanou rezistencí ke kolistinu z let 2009-2020 (n=73), vzorky čerstvého drůbežího (n=181), vepřového (n=91) a hovězího (n=90) masa z tuzemské i zahraniční tržní sítě, vzorky slepých střev (n=297) z jatečných zvířat (drůbeže, n=183 a prasat, n=114) a vzorky z prostředí (odpadní vody, n=44 a volně žijící zvířata, n=64). Primární vzorky z terénu a sbírka bakteriálních izolátů rezistentních ke kolistinu (MIC > 2mg/l) byli poskytnuty Státním zdravotním ústavem (SZÚ) a Státním veterinárním ústavem

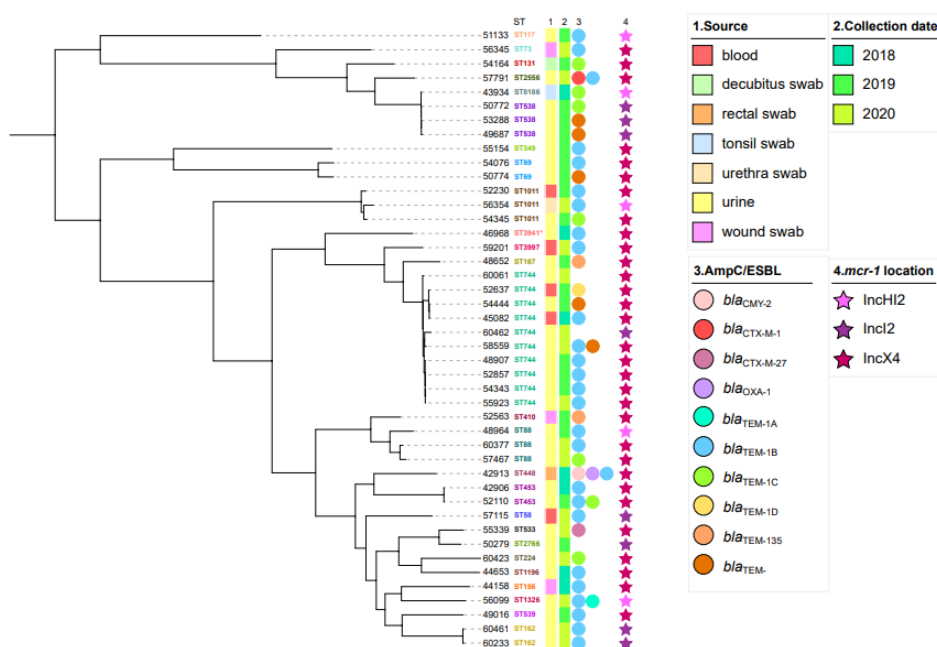
(SVÚ) jako součást běžících národních programů monitoringu významných mechanismů antibiotické rezistence. Veterinární vzorky (n=659) pomnožené v peptonové vodě byly podrobeny selektivní kultivaci na agarových půdách (Eosin methylene blue a MacConkey agar) s kolistinem (3,5 mg/l). Získané čisté kultury rezistentních izolátů byly druhově identifikovány pomocí hmotnostního spektrometru MALDI-TOF (microflex LT/SH; Bruker). Ke stanovení profilu citlivosti k antibiotikům včetně produkce klinicky významných beta-laktamáz byla využita disková difúzní metoda s hodnocením dle CLSI (CLSI, 2018) a mikrodiluční metoda na základě minimální inhibiční koncentrace (MIC) dle EUCAST (EUCAST 2021). Detekce genu *mcr* (*mcr-1* až *mcr-10*) byla provedena polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Detailní analýza bakteriálních izolátů z různých zdrojů nesoucích gen *mcr* byla provedena metodou celogenomového sekvenování (WGS) na platformě Illumina v kombinaci s technologií MinION. K izolaci celogenomové DNA byl použit kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel) a příprava DNA knihoven byla realizována kitem Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina). Získaná sekvenční data byla kvalitativně zpracována programem Trimmomatic v0.36. a následně assemblována do formátu fasta za využití software SPAdes v3.13.1 obsahující pouze sekvenci jednotlivých čtení složených do delších úseků DNA. Ze zpracovaných dat jsme pomocí online dostupných bioinformačních nástrojů určili sekvenční typ bakterie (MLST), geny rezistence k antibiotikům (ResFinder), chromozomální mutace (PointFinder) a plazmidové replikony (PlasmidFinder). Primární nukleotidové sekvence plazmidů sestavené s využitím programu Unicycler 0.4.8 byly porovnány s referenčními sekvencemi z databáze GenBank ke stanovení příbuznosti plazmidů nesoucích geny *mcr* v rámci naší sbírky a s plazmidy popsány v Evropě a ve světě. Schopnost horizontálního přenosu plazmidů s geny rezistence ke kolistinu byla otestována konjugačními experimenty. Velikost a počet plazmidů přenesených do recipientních buněk byly stanoveny pomocí pulzní gelové elektroforézy (PFGE) s použitím nukleázy S1 a porovnání sekvencí plazmidů bylo provedeno nástrojem BRIG.

Výsledky

Z 2511 humánních izolátů rezistentních ke kolistinu byla u 73 izolátů (3 %, n=2511) prokázána přítomnost genu na plazmidu (*mcr-1*, n=48 a *mcr-4*, n=3). Izoláty *E. coli* s genem *mcr-1* (obr. 1) patřily k různým sekvenčním typům (ST, n=26), z nichž nejčastěji zastoupený byl ST744 (n=10). Patnáct izolátů *E. coli* náleželo k ST88 (n=3), ST538 (n=3), ST1011 (n=3), ST69 (n=2), ST162 (n=2) a ST453 (n=2), zatímco zbývajících jedenáct izolátů patřilo k unikátním ST. Mezi izoláty komplexu *E. cloacae* dominovala linie ST484 (n=11). Většina rezistentních izolátů s *mcr-1* nesla geny rezistence k aminoglykosidům, makrolidům, sulfonamidu, tetracyklinu a trimethoprimu. Mezi plazmidy nesoucí gen *mcr-1* dominoval u humánních izolátů výskyt ~33 kb IncX4 (34/73; 47 %)

s vysokou úrovní nukleotidové podobnosti (>99,9 %). Sestavené sekvence plazmidu vykazovaly vysokou míru shody s jinými plazmidy dostupnými ve veřejných databázích, např. plazmid pMCR_1413_E1 z *E. coli* ST354 pocházejícího ze syrového krůtího masa z České republiky a izolát pMCR_1138_D1 z *E. coli* ST744 ze syrového krůtího masa dovezeného z Německa. V menší míře byly zastoupeny středně velký ~55 kb plazmid IncI2 (8/73; 11 %) a největší ~220 kb plazmid IncHI2 (9/73; 12 %). Zbýlých 22 izolátů neslo gen *mcr-4* na Col plazmidu (3/73; 4 %) a gen *mcr-9* začleněný do chromozomu (19/73; 26 %). Přenos plazmidu s genem *mcr-1* byl úspěšný u 43 izolátů (90 %, n=48) zahrnující izoláty *E. coli* (n=39) a *K. pneumoniae* (n=4).

Obr. 1. Fylogenetická analýza humánních izolátů *E. coli* včetně původu, typu plazmidu a detekce genů kódujících klinicky významné beta-laktamázy.



Ze sbírky 659 veterinárních vzorků pomnožených v peptonové vodě bylo selektivní kultivací na dvou agarových půdách získáno celkem 112 izolátů *E. coli* rezistentních ke kolistinu s genem *mcr-1*. Izoláty pocházely z 65 vzorků (10 %, n=659), přičemž z pozitivního vzorku byly obvykle získány dva pozitivní izoláty. Izoláty s genem *mcr* byly nalezeny v čerstvém masu z domácí produkce (43/303, 14 %) zahrnující drůbeží (33/149, 22 %), vepřové (6/74, 8 %) a hovězí maso (4/80, 5 %). Vyšší míru rezistence ke kolistinu jsme zaznamenali v masu z dovozu (17/59, 28 %), konkrétně u drůbežního (16/32, 50 %) a hovězího masa (1/10, 10 %), ve vzorcích vepřového importovaného masa (n=17) nebyly geny *mcr* nalezeny. Naopak nízký výskyt *E. coli* s geny *mcr* byl zjištěn ve střevě jatečné drůbeže (3/181; 2 %) a prasat (2/114, 2 %), slepé střevo hovězího dobytka nebylo vyšetřeno. Při stanovení profilu rezistence k antibiotikům byla u většiny izolátů rezistentních ke kolistinu (97/112, 87 %) prokázána rezistence k různým typům antibiotik, což poukazuje na možný výskyt

multirezistentních kmenů. Izoláty *E. coli* náležely k různým ST, včetně patogenních linií (ST=69, ST131), přičemž nejčastěji zastoupené byly ST=1011 (n=8) a ST10 (n=6). Gen *mcr-1* se nacházel převážně na jednom ze tří inkompatibilních (Inc) skupin konjugativních plazmidů zahrnující plazmidy IncX4, IncI2 a IncHI2. Přenos *mcr-1* do laboratorního kmene *E. coli* byl úspěšný u 70 % izolátů.

Z environmentálních vzorků byl detekován gen *mcr-1* u jednoho ze čtyř izolátů *E. coli* z racků a u jednoho ze šedesáti izolátů *E. coli* z dravců. ST analýza prokázala vysokou variabilitu, nicméně některé ST byly shodné s izoláty od lidí a hospodářských zvířat (ST162, ST10). Ze vzorků odpadních vod (n=44) bylo selekcí získáno 50 bakteriálních izolátů ze 4 různých čeledí. Gen *mcr-1* byl detekován pouze u izolátů *E. coli* (12/50, 24 %).

Závěr

Projekt poskytl nové poznatky o výskytu plazmidy kódované rezistence ke kolistinu u bakterií čeledi Enterobacteriaceae napříč různými zdroji. Celogenomovým sekvenováním jsme v bakteriálním genomu určili geny odpovědné za rezistenci ke kolistinu, stanovili chromozomální mutace a sekvenční typy (ST) a detailně charakterizovali plazmidy jako významné nástroje pro přenos genů *mcr* mezi bakteriemi navzájem. Studie rozšířila výzkum rezistence na kolistin v rámci národního monitoringu a prokázala zvýšený záchyt genů *mcr* u hospodářských zvířat, který může být považován za jeden z významných zdrojů kolistinové rezistence. Výzkum doplnil informace o potencionálním přenosu rezistentních izolátů ze zvířat na lidi a podpořil tak myšlenku jednotného zdraví, které poukazuje na spojitost mezi zdravím lidí, hospodářských zvířat a prostředí.

Seznam literatury:

- 1) CATRY, B. et al. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2015, 46(3).
- 2) JAVED, H. et al. Emergence of plasmid-mediated *mcr* genes from Gram-negative bacteria at the human-animal interface. *Gut Pathogens*. 2020, 12(54).
- 3) ZHU, W. et al. Conjugal Transfer, Whole-Genome Sequencing and Plasmid Analysis of Four *mcr-1*-Bearing Isolated from U. S. Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2019, 63(4).
- 4) LI, R. et al. Genetic characterization of *mcr-1*-bearing plasmids to depict molecular mechanisms underlying dissemination of the colistin resistance determinant. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017, 72(2).
- 5) POMORSKÁ, K. et al. Detection of plasmid-determined colistin resistance mediated by *mcr* genes in the Czech Republic. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie SZÚ Praha*. 2018, 27(9).

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 218/2021/FVHE

Detekce vybraných patogenních mikroorganismů v ready-to-eat potravinách

Zora Šťátková, Petra Furmančíková, Pavlína Navrátilová, Ivana Bednářová, Hana Hellingerová,
Ivana Bernatíková

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

Úvod

Ready-to-eat (RTE) potraviny jsou velmi atraktivní pro konzumenty, kteří hledají konvenientní potraviny. Codex Alimentarius definuje RTE potraviny jako potraviny (včetně nápojů), které mohou být syrové, vařené, zpracované či jinak připravené, a jsou ve formě, ve které jsou přímo spotřebiteli konzumovány (1). Vzhledem k chybějící tepelné úpravě RTE potravin před jejich konzumací, představují tyto potraviny potencionální zdravotní riziko pro konzumenty. Riziko spočívá především v možné kontaminaci RTE potravin patogenními mikroorganismy během jejich výroby, manipulace a skladování. Chlazené RTE potraviny, kontaminované patogenními mikroorganismy, vedly celosvětově již k mnoha případům alimentárních onemocnění. Proto se problematika mikrobiální bezpečnosti a kvality těchto potravin stala důležitým tématem v ochraně veřejného zdraví (2). Hlavním cílem tohoto projektu bylo rozšíření poznatků o mikrobiálním zatížení RTE potravin dostupných v tržní síti. Pozornost byla věnována především detekci patogenů a to: *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. a *Staphylococcus aureus* resp. MRSA ve vybraných RTE potravinách.

Materiál a metodika

Vzorky RTE potravin byly zakoupeny v tržní síti na území České republiky. Bylo provedeno 5 odběrů, v rámci nichž bylo celkem zakoupeno a vyšetřeno 50 vzorků RTE potravin. Výběr vzorků zahrnoval různé typy těchto potravin (salát, sandwich, bageta, bagel, wrap, uzený losos, uzená makrela). Při výběru vzorků byl kladen důraz na zastoupení živočišných složek. Vzorky byly transportovány a uchovávány při teplotě 2-4 °C. Mikrobiologické analýzy byly prováděny vždy do dvou hodin od nákupu vzorků. Ke stanovení patogenních bakterií byly využity klasické kultivační metody a metody molekulárně-biologické. *Salmonella* spp. byla stanovena dle ČSN EN ISO 6579, *L. monocytogenes* dle ČSN EN ISO 11290-1 a *S. aureus* dle ČSN EN ISO 6888-1. Následně byly u získaných izolátů provedeny vybrané konfirmační testy. Suspektní izoláty byly poté testovány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Z konfirmačních testů byl využit ITEST S. AUREUS LATEX (ITEST plus, s.r.o.) pro potvrzení tvorby plasmakoagulázy. Dále pak SALMONELLA TEST KIT (OXOID) pro stanovení *Salmonella* spp. a test API LISTERIA (BIOMÉRIEUX) pro konfirmaci

L. monocytogenes. Pro následnou PCR reakci byla použita DNA, jež byla ze získaných izolátů izolována varem. Pomocí PCR byly detekovány vybrané geny specifické pro daný druh, resp. rod. U suspektních izolátů *S. aureus* byl pomocí multiplex PCR zjišťován výskyt specifického fragmentu SA442 a současně byla provedena detekce genu *mecA* (pro určení případného výskytu MRSA – methicilin rezistentní *S. aureus*) (3, 4). Jako interní kontrola byl v této multiplex PCR použit gen kodující 16SrRNA (5). U suspektních izolátů *L. monocytogenes* a *Salmonella* spp. byla rovněž využita metoda PCR. Provedení obou reakcí bylo úspěšně optimalizováno na podmínky laboratoře. U *L. monocytogenes* byl detekován gen *prfA* zodpovědný za produkci Listeriolysin positive regulatory protein a současně jako interní kontrola gen kodující 16SrRNA (5, 6). U rodu *Salmonella* pak byla stanovena přítomnost genu *invA* specifického pro tento rod (7, 8). Bakteriální DNA pro Nested PCR byla ze vzorků RTE potravin izolována pomocí dvou různých kitů, DNeasy mericon Food kit (QIAGEN®) a NucleoSpin Microbial DNA (Macherey-Nagel). Detekce *H. pylori* byla provedena pomocí Nested PCR, jejíž optimalizace byla jedním z úspěšně splněných cílů projektu IGA číslo: 224/2020/FVHE. Pomocí Nested PCR byla dále ve vzorcích detekována *Salmonella* spp. Tato reakce byla navržena na základě studií Waage et al. (9) a El-Taweel et al. (10) a upravena vzhledem k podmínkám laboratoře. U této reakce se pro zvýšení specificity využívají dva páry primerů. Nejprve se provede reakce s tzv. vnějšími páry primerů a vzniklý produkt je využit jako templát pro reakci s vnitřními primery. Kombinací dvou párů primerů se zvýší pravděpodobnost amplifikace pouze daného, specifického úseku, a to i při malém množství DNA.

Výsledky

V rámci projektu bylo zjištěno, že izolace pomocí NucleoSpin Microbial DNA (Macherey-Nagel) je pro získání větší výtěžnosti bakteriální DNA z potravin výhodnější. Dále pak došlo k optimalizaci metody pro stanovení *Salmonella* spp. pomocí Nested PCR a rovněž k optimalizaci klasické PCR pro detekci *L. monocytogenes* a *Salmonella* spp. Projekt umožnil využití optimalizované metody pro stanovení *H. pylori* pomocí Nested PCR, která je výsledkem předchozího projektu IGA 224/2020/FVHE. Celkem bylo vyšetřeno 50 vzorků RTE potravin, které byly zakoupeny v 6 různých prodejnách. Bylo zjištěno, že v každé prodejně se nacházela potravina kontaminovaná námi sledovanými patogenními bakteriemi. Všechny vzorky byly negativní na přítomnost *S. aureus* a tím pádem i MRSA. Toto odpovídá výsledkům jiných studií, ve kterých byla rovněž prevalence MRSA v RTE potravinách velmi nízká. Prevalence *S. aureus* je naopak v řadě studií výrazněji vyšší (11, 12). Toto může poukazovat na vysokou úroveň hygieny výroby těchto výrobků v Česku. *L. monocytogenes* byla prokázána ve 3 vzorcích (6 %). Jednalo se o vzorky typu wrap a tortilla (Caesar wrap, tortilla s mozzarellou a sušenými rajčaty, tortilla s halloumi sýrem a pečenou

paprikou). Kontrola výskytu této bakterie v RTE potravinách je v současnosti stanovena v platné legislativě (Nařízení komise (ES) č. 2073/2005), protože právě tyto potraviny jsou nejčastěji spojovány s výskytem závažného onemocnění – listeriózy (13). Při stanovení *Salmonella* spp. bylo dosaženo rozdílných výsledků pomocí metody PCR a Nested PCR. V případě PCR nebyla v žádném vzorku prokázána přítomnost této bakterie. Při použití metody Nested PCR byla *Salmonella* spp. prokázána u 4 vzorků (8 %). Konkrétně se jednalo o vzorky: řecký salát, wrap s kuřecími stripsy, filet z uzeného lososa, toast se šunkou a sýrem. Výsledky ukazují, že Nested PCR lze použít i na vyšetření potravin s vysokým výskytem kontaminující mikroflóry a také, že tato metoda je schopna detekovat i velice malé množství přítomných bakterií rodu *Salmonella*. Výskyt *L. monocytogenes* i *Salmonella* spp. byl relativně nízký, což potvrzují výsledky i dalších studií (14, 15). V případě *H. pylori* bylo 25 vzorků (50 %) pozitivních. Toto je výrazně častější záchyt, než v studiích Ghorbani et al. a Hemmatinezhad et al. (16, 17), kde byl stanoven výskyt v RTE potravinách 13,45 % a 20 %. Tento rozdíl lze přičíst tomu, že ve zmíněných studiích byla použita kultivační metoda. *H. pylori* způsobuje závažná onemocnění, jako je chronická gastritida, chronický vřed a rakovina žaludku. Při nepříznivých podmínkách dokáže tato bakterie vstoupit do životaschopné, ale nekultivovatelné formy, u které se však předpokládá, že může být stále infekční. Proto byla jako nejvhodnější vybrána metoda Nested PCR, která dokáže zachytit i tyto formy.

Závěr

Vzhledem k chybějícímu tepelnému ošetření před konzumací RTE potravin, mohou tyto potraviny představovat zvýšené riziko pro spotřebitele, a to i díky zjištěnému výskytu možných původců onemocnění z potravin jako byla v našem případě *L. monocytogenes* a *Salmonella* spp. a především vysokému výskytu *H. pylori*. Způsoby přenosu *H. pylori* nejsou dosud přesně známy. Nicméně výsledky naší studie ukazují, že RTE potraviny mohou hrát významnou roli v šíření tohoto patogenu v lidské populaci.

Seznam literatury:

- 1) KOTZEKIDOU, P. Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods. *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods*. 2016. ISBN 9780128019160.
- 2) Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny
- 3) MENGISTU, D. A., TOLERA, S. T., CASTILLO, A. Prevalence of Microorganisms of Public Health Significance in Ready-to-Eat Foods Sold in Developing Countries: Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Food Science* [online]. 2020, 1-9 [cit. 2020-12-07]. ISSN 2314-5765. DOI:10.1155/2020/8867250.
- 4) MARTINEAU, F., PICARD, F. J., ROY, P. H., OUELLETTE, M., BERGERON, M. G. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, vol. 36, no. 3, p. 618-623.

- 5) BOŞGELMEZ-TMAZ, G., ULUSOY, S., ARIDOĞAN, B., COŞKUN-ARI, F. Evaluation of different methods to detect oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* and their clinical laboratory utility. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2006, vol. 25, no. 6, p. 410-412.
- 6) MARTINEAU, F., PICARD, J. F., ROY, H.P., OUELLETTE, M., BERGERON, M.G. Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, vol. 34, no. 12, p. 2888-2893.
- 7) ZHANG, W., JAYARAO, B.M., KNABEL, S.J. Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70.2: 913-920.
- 8) RAHN, K., De GRANDIS, S.A, CLARKE, R.C., McEWEN, S.A., GALÁN, J.E., GINOCCHIO, C., CURTISS III, R., GYLES, C.L. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and cellular probes*, 1992, 6.4: 271-279.
- 9) SANTOS, L.R., NASCIMENTO, V.P.D., OLIVEIRA, S.D.D., FLORES, M.L., PONTES, A.P., RIBEIRO, A.R., SALLE, C.T.P., LOPES, R.F.F. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Salmonella* in artificially inoculated chicken meat. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 2001, 43: 247-250.
- 10) WAAGE, A. S., VARDUND, T., LUND, V., KAPPERUD, G. Detection of low numbers of *Salmonella* in environmental water, sewage and food samples by a nested polymerase chain reaction assay. *Journal of applied microbiology*, 1999, 87.3: 418-428.
- 11) EL-TAWHEEL, G.E., MOUSSA T.A., SAMHAN, F.A., EL-SENOUSY, W.M., EL-LATHY, M.A. Nested PCR and conventional techniques for detection of *Salmonella spp.* in River Nile water, Egypt. *Egyptian Journal of Microbiology*, 2010, 45: 63-76.
- 12) SHAFIZI, A.W., RIDZUAN, M., UBONG, A., NEW, C.Y., MOHHIDDIN, O., TOH, P.S., CHAI, L., SON, R. Assessing *Staphylococcus aureus* in ready to eat (RTE) food and risk assessment of food premises in Putrajaya. *International Food Research Journal*, 2016, 23.4.
- 13) YANG, X., ZHANG, J., YU, S., WU, Q., GUO, W., HUANG, J., CIAI, S. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Retail Ready-to-Eat Foods in China. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 816.
- 14) GAMBARIN, P., MAGNABOSCO, C., LOSIO, M.N., PAVONI, E., GATTUSO, A., ARCANGELI, G., FAVRETTIM M. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat seafood and potential hazards for the consumers. *International journal of microbiology*, 2012, 2012.
- 15) BOHAYCHUK, V. M., GENSLER, G.E., KING, R.K., MANNINEN, K.I., SORENSEN, O., WU, T.J, STILES, M.E., McMULLEN, L.M. Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in Edmonton, Alberta, Canada. *Journal of Food Protection*, 2006, 69.9: 2176-2182.
- 16) CABEDO, L., PICART I BARROT, L., TEIXIDO I CANELLES, A. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in ready-to-eat food in Catalonia, Spain. *Journal of Food Protection*, 2008, 71.4: 855-859.
- 17) GHORBANI, F., GHEISARI, E., DEHKORDI SAFARPOOR, F. Genotyping of *vacA* alleles of *Helicobacter pylori* strains recovered from some Iranian food items. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2016, 15.8: 1631-1636.
- 18) HEMMATINEZHAD, B., MOMTAZ, H., RAHIMI, E. *VacA*, *cagA*, *iceA* and *oipA* genotypes status and antimicrobial resistance properties of *Helicobacter pylori* isolated from various types of ready to eat foods. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 2016, 15.1: 1-9.

Tato práce byla financována grantem IGA VETUNI 214/2021/FVHE

Porovnání úrovně dobrých životních podmínek v chovech a při přepravě na jatky u druhů a kategorií zvířat chovaných v ČR na základě výskytu úhynů a traumatických poškození zjišťovaných při veterinární prohlídce na jatkách

Lenka Válková, Eva Voslářová, Vladimír Večerek

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

Úvod

Zajistit odpovídající úroveň péče a zacházení se zvířaty je nutné nejen zvířatům v chovu, ale i zvířatům přepravovaným k porážce na jatkách (1). Je skutečností, že úroveň welfare se u jatečných zvířat liší podle druhu a kategorie porážených zvířat. Z důvodu směřování veterinárního dozoru nad chovem, přepravou a porážením jatečných zvířat je důležité rozpoznat, u kterých druhů a kategorií jatečných zvířat je v současných podmínkách péče a zacházení se zvířaty riziko úhynů při přepravě na jatky a poškozování zvířat traumatickými vlivy narušujícími odpovídající úroveň welfare jatečných zvířat. Určení druhů a kategorií zvířat na základě jejich porovnání z pohledu následků neodpovídající péče a neodpovídajícího zacházení, které způsobuje úhyny při přepravě anebo traumatická poškození těl a končetin zvířat, nejvíce postižených z pohledu narušených podmínek welfare zvířat, je významným výstupem aplikovaného výzkumu s využitelností těchto výsledků pro chovatelskou i veterinární praxi (2-5). Poznatky porovnávací welfare většiny druhů a kategorií zvířat porážených na jatkách jsou však v odborné literatuře omezené a jejich rozpoznání na základě reálných dat by bylo významným přínosem pro rozvoj poznatků v oblasti welfare jatečných zvířat a vytvořilo by předpoklad pro opatření k zvýšení úrovně welfare zvířat porážených na jatkách.

Cílem práce proto bylo porovnat úroveň dobrých životních podmínek v chovech a při přepravě na jatky u hospodářských zvířat chovaných v ČR na základě úhynů při přepravě a na základě výskytu traumatických poškození zjišťovaných při veterinární prohlídce na jatkách s cílem rozpoznání trendů ve vývoji úrovně welfare v posledních letech u jednotlivých druhů a kategorií zvířat a na základě mezidruhového srovnání dovodit rozdíly v úrovni welfare mezi jednotlivými druhy a kategoriemi porážených zvířat ve smyslu určení rizikových druhů a kategorií zvířat z pohledu veterinárního dozoru nad welfare zvířat přepravovaných k porážce jatky.

Materiál a metodika

Porovnání úrovně dobrých životních podmínek v chovech a při přepravě na jatky u dojníc, jalovic, býků, telat, prasnic, prasat ve výkrmu, selat, ovcí, jehňat, koz, kůzlat, králíků, nosnic, kuřecích brojlerů, krůt, hus, kachen a pštrosů chovaných v ČR bylo provedeno na základě počtu úhynů při

přepřavě a na základě výskytu traumatických poškození zjišťovaných za období 10 let (2010 až 2019) při veterinární prohlídce na jatkách, a to zejména se zaměřením na rozlišení traumatických změn na těle a na končetinách, které mohou indikovat rozdílné způsoby zacházení s jatečnými zvířaty. Trendy ve vývoji úrovně welfare u sledovaných druhů a kategorií jatečných zvířat byly stanoveny na základě výskytu úhynů v jednotlivých letech sledovaného období a z průběhu časových řad byly dovozeny případné směry vývoje v úrovni welfare sledovaných druhů a kategorií zvířat. Mezdruhové rozdíly v péči zvířat a při zacházení s nimi s dopadem na jejich welfare byly dovozeny na základě porovnání četnosti výskytu úhynů a výskytu nálezů traumatického původu na jatkách mezi jednotlivými druhy a kategoriemi zvířat. Jednotlivé nálezy z veterinární prohlídky na jatkách pro sledované druhy a kategorie porážených zvířat pro období 2010 až 2019 byly získány ve spolupráci se Státní veterinární správou.

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí programu Unistat 6.5 for Excel. Pro statistické porovnání četností v rámci jednotlivých kategorií byl využit Chí kvadrát test pro hodnocení statistické významnosti v kontingenční tabulce 2x2. Při četnostech překračujících 5, byla použita Yatesova korekce, při četnostech nižších než 5 byl využit Fisherův přesný test. K vyjádření trendů v průběhu sledovaného období byl použit Spearmanův koeficient pořadové korelace.

Výsledky

Z výsledků vyplývá, že existují rozdíly v úrovni úhynů při přepravě na jatky pro různé druhy a kategorie jatečných zvířat. Mezi zvířaty přepravovanými volně (tabulka 1) byly nejvyšší úhyny zjištěny při přepravě prasat (0,065%), statisticky významně ($P < 0,05$) nižší úhyny byly zjištěny u skotu (0,027%) a ovcí (0,015%). Z mezidruhového srovnání vyplývá, že u dospělých zvířat vyřazených z chovu byly nejvyšší úhyny zjištěny u prasnic (0,188%), mezi vykrmovanými zvířaty byly nejvyšší úhyny zjištěny u vykrmovaných prasat (0,061%) a mezi mláďaty vyřazenými z chovu u selat (0,266%). Z porovnání četnosti úhynů při přepravě na jatky pro zvířata přepravovaná v kontejnerech vyplývá, že nejvyšší úroveň úhynů vykazovaly nosnice (0,507%) coby ptáci přepravovaní po ukončení intenzivního snáškového období (tabulka 2). U vykrmované drůbeže a králíků byly úhyny při přepravě statisticky významně nižší ($P < 0,05$). Mezi vykrmovanými zvířaty byly nejvyšší úhyny zjištěny u brojlerových kuřat (0,429%) a dále u králíků (0,199%) a naopak nejnižší u hus (0,003%). U většiny sledovaných druhů a kategorií zvířat nebyly během sledovaného období zjištěny statisticky významné změny, avšak u vykrmovaných prasat ($r_{Sp} = -0,83$, $P = 0,003$) a selat ($r_{Sp} = -0,85$, $P = 0,002$) byl prokázán pokles úhynů, naopak u brojlerových kuřat ($r_{Sp} = 0,70$, $P = 0,025$) a kachen ($r_{Sp} = 0,92$, $P = 0,000$) počty úhynů vzrostly.

Nejvíce traumatických zranění (tabulka 3 a 4) bylo zjištěno u nosnic (2,80%), u dojníc (1,71%) a u králíků (1,52%). Pozitivní zjištění je, že u většiny sledovaných druhů a kategorií byly traumatické nálezy pozorovány pouze v nízké četnosti. Z pohledu lokalizace traumatických nálezů byly častější ($P < 0,01$) nálezy na končetinách než na trupu. Výjimku představovaly pouze pštrosi, jehňata, kozy a kůzlata, u kterých statisticky významný rozdíl mezi nálezy na končetinách a trupu zjištěn nebyl ($P = 1,00$), což bylo dáno velmi nízkým (jehňata) nebo žádným (pštrosi, kozy a kůzlata) výskytem traumatických nálezů u těchto skupin.

Tabulka 1. Úhyny skotu, prasat, ovcí a koz při přepravě na jatky

	Druh zvířat										
	skot				prase			ovce		koza	
	dojnice	jalovice	býci	telata	prasnice	výkrm	selata	bahnice	jehňata	kozy	kůzlata
přepraveno	1137256	257931	1015601	104557	587351	25042633	123520	22821	114278	1350	5778
uhynulo	502	19	60	98	1106	15330	329	6	14	2	0
úhyn (%)	0,044	0,007	0,006	0,094	0,188	0,061	0,266	0,026	0,012	0,148	0,000

Tabulka 2. Úhyny drůbeže, králíků a pštrosů při přepravě na jatky

	Druh/kategorie zvířat						
	králíci	brojlerová kuřata	nosnice	krůty	husy	kachny	pštrosi
přepraveno	1880670	1094054474	20132832	1182971	37691	28613090	6252
uhynulo	3741	4647787	102088	1373	1	33325	0
úhyn (%)	0,199	0,425	0,507	0,116	0,003	0,117	0,000

Tabulka 3. Četnost traumatických poškození u skotu, prasat, ovcí a koz zjištěných při prohlídce na jatkách

Druh/kategorie	Počet poražených zvířat	Traumatická poškození končetin		Traumatická poškození těla	
		počet	%	počet	%
dojnice	1136754	13716	1,207	5768	0,507
jalovice	257912	1448	0,561	405	0,157
býci	1015541	2269	0,223	596	0,059
telata	104459	391	0,374	83	0,080
prasnice	586245	749	0,128	111	0,019
prasata výkrm	25027303	23477	0,094	741	0,003
selata	123191	164	0,133	15	0,012
bahnice	22815	17	0,075	2	0,009
jehňata	114264	2	0,002	3	0,003
kozy	1348	0	0	0	0
kůzlata	5778	0	0	0	0

Tabulka 4. Četnost traumatických poškození u drůbeže, králíků a pštrosů zjištěných při prohlídce na jatkách

Druh/kategorie	Počet poražených zvířat	Traumatická poškození končetin		Traumatická poškození těla	
		%	počet	%	počet
králíci	1876929	15645	0,834	12855	0,685
nosnice	20030744	557726	2,784	2269	0,011
brojlerová kuřata	1089406687	150545	0,014	81770	0,008
krůty	1181598	2532	0,214	612	0,052
husy	37690	160	0,425	5	0,013
kachny	28579765	832	0,003	42	0,000
pštrosi	6252	0	0	0	0

Závěr

Výsledky ukazují, že z pohledu úhynů při přepravě je problematická zejména přeprava zvířat v kontejnerech, k nejvyšším úhynům docházelo při přepravě nosnic, brojlerových kuřat a králíků. U zvířat přepravovaných volně docházelo k nejvyšším úhynům u prasat, zejména prasnice a selat. Vyšší prevalence úhynů zvířat přepravovaných na konci jejich produkčního cyklu (nosnice, prasnice a dojnice) nebo po vyřazení z chovu (selata) dokládá potřebu věnovat větší pozornost posouzení zdravotnosti zvířat před přepravou a vyloučení nezpůsobilých zvířat z přepravy. Obdobné závěry vyplývají i z posouzení výskytu traumatických nálezů, které se nejčastěji vyskytovaly u post-produkčních zvířat (zejména dojnice a nosnice). Poměrně nízká četnost traumatických lézí u ostatních druhů a kategorií zvířat je z pohledu welfare poražených zvířat příznivá.

Seznam literatury:

- 1) SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K.S., et al., 2012. Road transport of cattle, swine and poultry in North America and its impact on animal welfare, carcass and meat quality: A review. *Meat Science*, **92**(3), 227-243.
- 2) GRILLI, C., et al., 2015. Welfare indicators during broiler slaughtering. *British Poultry Science*, **56**(1), 1-5.
- 3) HUNEAU-SALAUN, A., et al., 2015. Contribution of meat inspection to the surveillance of poultry health and welfare in the European Union. *Epidemiology & Infection*, **143**(11), 2459-2472.
- 4) STARK, K.D.C., 2017. Abattoir condemnation data remain underused in decision making. *Veterinary Record*, **180**(21), 514-515.
- 5) STARK, K.D.C., et al., 2014. Strengths and weaknesses of meat inspection as a contribution to animal health and welfare surveillance. *Food Control*, **39**, 154-162.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 213/2021/FVHE

Přímá identifikace felinního koronaviru u koček chovaných v útulku a jeho vliv na welfare

Veronika Vojtkovská¹, Gabriela Lukešová¹, Eva Voslářová¹, Jarmila Konvalinová¹, Dana Lobová²

¹Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, ²Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno

Úvod

Vlivem umístění do útulku mohou zvířata čelit faktorům, které jsou spojeny s narušením dobrých životních podmínek. Jedním z takových faktorů je vysoká koncentrace různých zvířat s neznámou zdravotní historií. Koronavirus koček (FCoV) je v populaci koček rozšířen celosvětově, především v útulcích a u většího počtu zvířat v domácích chovech. Virus patří do rodu *Alphacoronavirus 1*, podčeledi *Orthocoronavirinae*, čeledi *Coronaviridae* (1). Existují dva biotypy FCoV, a to avirulentní nebo nízkovirulentní enterická forma viru (FECV) a vysoce virulentní forma (FIPV), která vznikne v důsledku mutací viru v organismu hostitele a je původcem infekční peritonitidy s vysokým procentem mortality koček (2). K mutacím a k rozvoji letálního onemocnění pak dochází u přibližně 3 % koček nakažených nepatogenním FECV (3). Perzistenci FCoV v organismu ovlivňují faktory prostředí, genom hostitele i původce. U hostitele je důležitým faktorem výkonnost imunitního systému, který bývá negativně ovlivněn stresem; ten kočky často vlivem změny režimu, přítomnosti cizích koček a osob po umístění do útulku prožívají. Roli hraje také stáří, plemeno a genetické predispozice. Šíření viru výkaly zvířat je rozdílné u chovů s jedním zvířetem (25 %) a tam, kde je vysoká koncentrace chovaných koček (útulky nebo domácí chovy s větším počtem koček) (80 %) (4). Cílem této práce byla identifikace a kvantifikace FCoV v trusu u koček nově přijatých do útulku metodou qPCR, porovnání citlivosti rychlých antigenních testů z trusu koček od tří výrobců pro praktickou využitelnost v útulku, identifikace viru z prostředí metodou RT nested PCR a zjištění přežitelnosti viru v útulku v závislosti na účinku dezinfekce, která se v útulku běžně používá, a sledování chování koček s pozitivním nálezem FCoV.

Materiál a metodika

Pro detekci FCoV byl odebrán trus od 70 nově přijatých koček pocházejících ze 3 různých útulků v ČR a následně analyzován metodou real-time PCR (qPCR). Kočky byly v čase odběru vzorků umístěné v karanténní části útulku. Pro izolaci RNA ze vzorku trusu byl využit kit NucleoSpin® RNA Stool (Macherey Nagel, Německo). 5 ml RNA bylo následně po izolaci přepsáno do cDNA použitím Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Švýcarsko) a Random oligonucleotidů. Jako

pozitivní kontrola byl využit purifikovaný plazmid s inzertem DNA felinního koronaviru, negativní kontrolou byla voda RNase-free. Detekce a kvantifikace RNA byla provedena použitím kitu Xceed qPCR SG 1step 2 × Mix Lo-ROX v celkovém množství 20 µl dle instrukcí uvedených výrobcem v přístroji Light Cycler® 480 II (Roche, Švýcarsko). Kromě qPCR analýzy byly vzorky trusu ještě podrobeny testování pomocí rychlých antigenních testů pocházejících od tří různých výrobců.

Za účelem zjištění schopnosti felinního koronaviru přežít v prostředí útulku bylo odebráno a vyšetřeno 19 stěrů z prostředí (6x kočičí toalety, 4x podlaha, 4x domek, 2x gauč, 3x vyvýšené police - odpočívadla) před očištěním těchto objektů a prostor. Ze stěrů byla kitem Nucleo Spin RNA (Macherey Nagel, Německo) izolována virová RNA a detekce virové RNA byla provedena RT nested PCR za použití MM master mixu (Top Bio, ČR). Protože byla virová RNA v prostředí nalezená, byla navíc ověřována účinnost 3 druhů dezinfekce (na bázi chloru, alkoholu a neiontových, povrchově aktivních látek) ve vztahu k přežívání FCoV. Jelikož jeden z útulků disponoval zařízením na ozónování vzduchu, bylo ověřeno i působení ozonu na FCoV. Po ozonaci bylo z prostředí odebráno 14 stěrů, ze kterých byla izolována a detekována RNA výše popsaným způsobem. Jelikož byla i po aplikaci ozónu virová RNA identifikována, bylo nezbytné navíc ověřit viabilitu FCoV v prostředí pomocí kultivace suspenzních izolátů na buněčných liniích kočičí provenience. Za aseptických podmínek byl virus v koncentraci 10⁻⁴ inokulován na buněčný monolayer linie CRFK (Sigma-Aldrich, USA) v 5 % médiu DMEM (Sigma-Aldrich, USA) a provedena inkubace v termostatu při 37 °C s 5 % koncentrací oxidu uhličitého. Po 48-hodinové inkubaci byl pozorován cytopatický efekt pod inverzním mikroskopem.

Za účelem zjištění vlivu FCoV na welfare koček, byly u jedinců vylučujících FCoV v trusu ve 14-denním intervalu monitorovány změny ve 3 behaviorálních (úroveň hravého chování, sociability a vztahu k ostatním kočkám) a 8 zdravotních indikátorech welfare (úroveň fyzické kondice (BCS), průjem, výtok/zarudnutí/otok oka, výtok z nosu/zarudnutí/otok, přítomnost patologických zvuků a ztíženého dýchání, kulhání a abnormální postoj, kvalita srsti, viditelná poranění) podle protokolu sestaveného na základě poznatků získaných z vědecké literatury. Získaná data byla statisticky vyhodnocena pomocí statistického programu Unistat 6.5. Na základě statistické analýzy byly získané výsledky z antigenních testů srovnávány s výsledky analýzy metodou qPCR; stanovena byla senzitivita a specifita antigenních testů. K testování rozdílů mezi četnostmi byl využit χ^2 test, Spearmanův korelační koeficient byl využit ke korelační analýze. Wilcoxonův test byl použit k otestování významnosti mezi známkami v rámci jednotlivých hodnocení zdravotních a behaviorálních indikátorů koček.

Výsledky

Ze 70 vyšetřených vzorků bylo na přítomnost FCoV v trusu metodou qPCR zjištěno významně více pozitivních ($p < 0,05$) než negativních vzorků (44 vs. 26). Věk ani pohlaví nehrály významnou roli ($p > 0,05$) ve vylučování FCoV v trusu koček. V rámci testování trusu rychlými antigenními testy byl zaznamenán statisticky významný rozdíl v počtu pozitivně testovaných vzorků ($p < 0,05$), výsledky mezi testem A a B vzájemně nekorelovaly ($p > 0,05$, $r_s = 0,2025$). Korelace mezi výsledky byla nalezena v případě testu B a C ($p < 0,05$, $r_s = 0,4792$). Stanovená senzitivita byla u testu A a C na překvapivě nízké úrovni (20,5 % a 34,1 %), senzitivita testu B byla vyšší (65,9 %). Stanovená specificita testů byla na vysoké, resp. uspokojivé úrovni (test A: 100 %, test B: 73,1 %, test C: 92,3 %). Množství virových částic detekovaných přístrojem Light Cycler® 480 II nekorelovalo s výsledky antigenních testů ($p > 0,05$). Zjistili jsme, že ani v případě analýzy vzorků pomocí qPCR ani v případě použití antigenových testů nekorelovaly získané výsledky s konzistencí trusu ($p > 0,05$).

Z 19 stěrů, které byly odebrány z prostředí útulku před jeho očištěním, byla RNA FCoV izolována ze 16 vzorků (84,2 %). Zjistili jsme, že výskyt FCoV se v prostředí útulku nutně nevázal pouze na kočičí toalety, právě naopak, stěry, ve kterých nebyla RNA nalezena, byly odebrány z povrchu toalet. Po aplikaci ozonu byla RNA FCoV stále nalezena v 10 ze 13 stěrů odebraných před aplikací ozonu, proto bylo přežívání viru navíc ověřováno kultivací na buňkách. Cytopatický efekt nebyl u buněk evidentní ani v případě stěrů získaných z prostředí před ani po aplikaci ozónu.

Z hlediska ověřování účinnosti dezinfekčních prostředků na přežívání FCoV, byla eliminace RNA už po 5 minutách přímého působení na virus detekována u dezinfekčního prostředku na bázi chloru (účinná látka chlornan sodný). U zbylých dvou dezinfekčních prostředků na bázi alkoholu (účinná látka ethanol + propan-2-ol) a neiontových povrchově aktivních látek (účinná látka alkyl (C12-16) dimethylbenzylammoniumchlorid) byla virová RNA nalezena po 5, 15 ale i po 30 minutové expozici. Dá se tedy konstatovat, že kombinace ozónu a dezinfekčního prostředku, především na bázi chloru výrazně redukuje virus z prostředí.

V průběhu sledování koček v útulku v 14-denním intervalu bylo zjištěno, že u významně vyššího počtu koček ($p < 0,05$) nedošlo ke změně stavu během pobytu v útulku, resp. došlo k jeho zlepšení v alespoň jednom ze sledovaných indikátorů oproti počtu koček, u kterých došlo během pobytu v útulku ke zhoršení stavu. U žádného ze sledovaných indikátorů nebyl zaznamenán významný rozdíl při srovnání známek koček prvního a posledního hodnocení ($p > 0,05$). V průběhu sledování uhynulo 5 koček, avšak ani u jedné nebyla primární příčinou smrti infekční peritonitida.

Závěr

Výsledky této studie naznačují, že použitelnost rychlých antigenních testů k detekci FCoV trusu koček v útulku je omezená a nemůže v plné míře nahradit spolehlivější metody (qPCR). Z pohledu vlivu dezinfekčních prostředků na přežívání FCoV v prostředí lze za nejspolehlivější dezinfektant označit přípravek na bázi chloru (v praxi např. Savo), jelikož virová RNA byla u zbývajících dvou testovaných přípravků na bázi alkoholu a neiontových povrchově aktivních látek nalezena i po jejich 30-minutové expozici. Viabilita viru by měla být u těchto přípravků v dalším výzkumu ověřována kultivací na buněčných liniích.

Seznam literatury:

- 1) INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2019. Taxonomy [online]. [vid. 4.12.2020]. Dostupné z: <https://ictv.global/taxonomy>.
- 2) PEDERSEN, N.C., 2014. An update on feline infectious peritonitis: virology and immunopathogenesis. *The Veterinary Journal*, **201**(2), 123-132.
- 3) ADDIE, D.D., and O. JARRETT, 1992. A study of naturally occurring feline coronavirus infection in kittens. *The Veterinary Record*, **130**(7), 133-37.
- 4) KISS, I., S. KECSKEMETI, J. TANYI, B. KLINGEBORN, and S. BELÁK, 2000. Prevalence and genetic pattern of feline coronaviruses in urban cat populations. *The Veterinary Journal*, **159**(1), 64-70.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 215/2021/FVHE

Vliv perorální aplikace nesteroidních antiflogistik na ryby

Zuzana Weiserová, Aneta Hollerová, Vojtěch Svatoš, Zdeňka Svobodová

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

Úvod

V současné době patří nesteroidní antiflogistika (NSAID) mezi nejčastější a nejběžnější používaná léčiva v humánní i veterinární medicíně. Využívají se k tlumení bolesti, zánětu a snížení horečky (1, 2, 3). Mezi často využívaná NSAID v humánní medicíně patří především ibuprofen a diklofenak. Ibuprofen je derivát kyseliny propionové a je hojně využíván pro svůj analgetický, protizánětlivý a antipyretický účinek. Derivát kyseliny octové, diklofenak, se pak využívá například při léčbě revmatických onemocnění, kde kromě analgetického účinku zmírňuje otoky kloubů. Nejčastěji jsou NSAID aplikovány perorálně, jsou tedy absorbovány v gastrointestinálním traktu (1). Po vyloučení z organismu odchází rezidua společně s odpadní vodou do čistíren odpadních vod, které ale nejsou schopny tyto látky z vody kompletně odstranit a v povrchových vodách nalézáme rezidua léčiv v koncentracích 0,001-1 $\mu\text{g/l}$ (5), ale i násobně vyšších (1600 ng/l) (6). V důsledku vysoké spotřeby NSAID dochází ke kumulaci těchto látek v životním prostředí (4) a předešlé studie jasně prokazují negativní vliv NSAID na vodní organizmy (7, 8).

Cílem tohoto projektu bylo rozšířit poznatky o účincích perorální aplikace ibuprofenu a diklofenaku na zdravotní stav pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Testované látky byly podávány v krmivu, a to v množstvích 2 $\mu\text{g/kg}$ ibuprofenu = IBN2; 200 $\mu\text{g/kg}$ ibuprofenu = IBN200; 2 $\mu\text{g/kg}$ diklofenaku = DFN2; 200 $\mu\text{g/kg}$ diklofenaku = DFN200; 2 $\mu\text{g/kg}$ ibuprofenu + 2 $\mu\text{g/kg}$ diklofenaku = IBN+DFN.

Materiál a metodika

Během experimentu byl sledován vliv perorální aplikace ibuprofenu a diklofenaku na pstruha duhového. Samotnou experimentální část předcházela příprava testovaného krmiva. Patentovanou impregnační metodou byly na povrch granulí nanášeny testované látky v koncentracích 2 $\mu\text{g/kg}$ a 200 $\mu\text{g/kg}$ ibuprofenu, 2 $\mu\text{g/kg}$ a 200 $\mu\text{g/kg}$ diklofenaku a směs těchto látek v koncentraci 2 $\mu\text{g/kg}$ ibuprofenu a 2 $\mu\text{g/kg}$ diklofenaku. Před zahájením experimentu proběhla 14-denní fáze aklimatizace, během které si ryby navykly na testované krmivo a prostředí. Během experimentu byly pravidelně analyzovány fyzikálně-chemické parametry vody, byla sledována mortalita a případné změny chování pokusných zvířat.

Po šestitýdenní experimentální fázi byl pokus ukončen a ryby byly usmrceny tupým úderem do hlavy. Poté jim byla odebrána krev a během pitvy i další vzorky tkání pro laboratorní analýzy. Krev byla využita pro stanovení hematologických a biochemických ukazatelů. Ze vzorků žaber, jater a ledvin byla izolována DNA pro genovou expresi vybraných genů a byly odebrány také vzorky tkání pro histopatologické vyšetření a analýzu stanovení oxidativního stresu.

V rámci analýzy genové exprese byly specifické primery navrženy a jejich funkčnost byla ověřena pomocí gelové elektroforézy. Pro validaci qRT-PCR analýzy byly využity vzorky vybraných orgánů, které byly získány v rámci předchozího experimentu na pstruhu duhovém. Na orgánech byly testovány vybrané zánětlivé a protizánětlivé geny a geny, které ovlivňuje stres ryb (*cox1*, *cox2*, *hsp70*, *cyp1a1*, *cyp3a27*, *cls1* a *cls2*).

Hematologické vyšetření bylo provedeno podle metodiky Svobodova et al. (9). Biochemické vyšetření bylo provedeno na analyzátoru Konelab 20i.

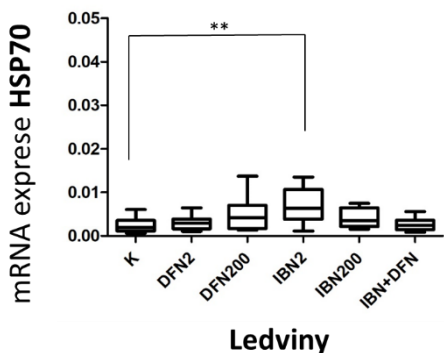
Výsledky histopatologického vyšetření se momentálně zpracovávají a budou součástí sepsané vědecké publikace s IF.

Zjištěná data byla následně statisticky vyhodnocena pomocí statistického programu Unistat.

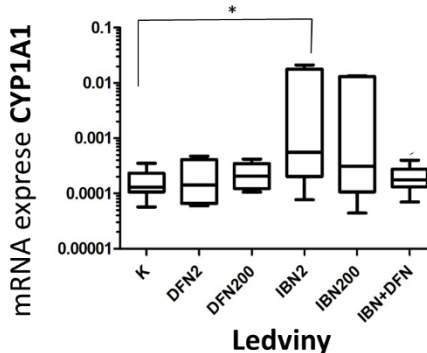
Výsledky

V rámci experimentu se zjišťoval případný vliv ibuprofenu a diklofenaku na genovou expresi sedmi vybraných genů (*cox1*, *hsp70*, *cyp3a27*, *cox2*, *cls1*, *cyp1a1* a *cls2*). Vzorky odebranými pro tuto analýzu byla tkáň jater, žaber a ledvin. Jako statisticky významné byly vybrány hodnoty, které vykazovaly $p < 0,05$ a $p < 0,01$. Tkáň ledvin IBN2 skupiny vykazovala statisticky významné zvýšení exprese genů *hsp70* ($p < 0,01$) (graf. 1) a *cyp1a1* ($p < 0,05$) (graf. 2). Statisticky významné ($p < 0,05$) zvýšení exprese genu *hsp70* jsme zaznamenali také v jaterní tkáni skupiny IBN2 (graf. 3). Analýza žaberní tkáně ukázala statisticky významné zvýšení genové exprese genu *hsp70* ve skupině IBN2 ($p < 0,01$), IBN200 ($p < 0,01$) a DFN200 ($p < 0,05$) (graf. 4). U ostatních sledovaných genů nebyly zaznamenány statisticky významné odchylky.

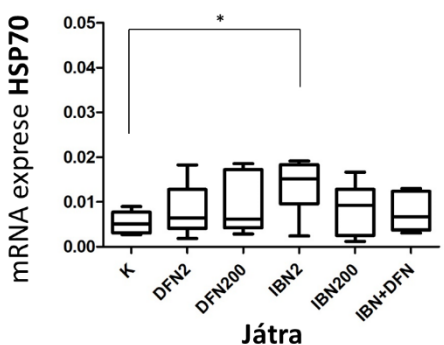
Při statistickém vyhodnocení hematologických ukazatelů nebyl zjištěn žádný signifikantní rozdíl mezi testovanými skupinami a kontrolou.



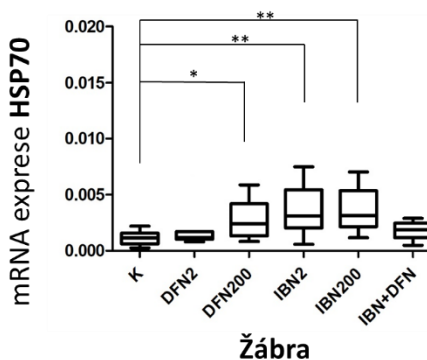
Graf 1. Expresse genu *hsp70* ve tkáni ledvin



Graf 2. Expresse genu *cyp1a1* ve tkáni ledvin



Graf 3. Expresse genu *hsp70* ve tkáni jater



Graf 4. Expresse genu *hsp70* ve tkáni žaber

Při analýze biochemických parametrů z krevní plazmy bylo zjištěno statisticky významné ($p < 0.01$) snížení hladiny amoniaku u skupiny vystavené kombinaci ibuprofenu a diklofenaku oproti kontrole. U dalších biochemických parametrů nebyly zjištěny žádné signifikantní změny.

Při analýze parametrů oxidativního stresu bylo prokázáno statisticky významné ($p < 0.01$) snížení aktivity enzymu GPx (glutathio peroxidázy) po šestitýdenní expozici koncentracím 2 a 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ibuprofenu při srovnání s kontrolní skupinou u žaber. Dále v žábrech došlo ke statisticky významnému ($p < 0.01$) snížení aktivity katalázy ve skupině vystavené koncentraci 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ diklofenaku v krmivu oproti kontrole.

Závěr

V rámci experimentu, jsme pozorovali vliv nesteroidních antiflogistik, ibuprofenu a diklofenaku, na pstruha duhového. Kromě sledování vlivu jednotlivých látek jsme se zaměřili i na jejich kombinaci. Ve vodním prostředí se obvykle nevyskytují látky samostatně, ale ve směsi látek, které na organismy komplexně působí.

Zjistili jsme zvýšení genové exprese dvou genů, *hsp70* a *cyp1a1*. Gen *hsp70* patří do skupiny „heat shock protein“. Jedná se o gen, který je z této skupiny nejvíce rozšířený a jeho úkolem je ochrana buněk před stresovými podmínkami. Gen *cyp1a1* je součástí cytochromu P450, podílí se tedy, mimo

jiné, na metabolismu léčiv. Výsledky studie prokazují vliv koncentrace ibuprofenu 2 µg/kg krmiva, na zvýšené stresové působení ve tkáni ledvin, jater a žaber. Zvýšení exprese genu *cyp1a1* v ledvinách pak poukazuje na jeho vyšší potřebu při detoxikaci organismu.

Testované látky statisticky významně neovlivnili hematologické a biochemické parametry, s výjimkou hladin amoniaku v krevní plazmě. Tkáň žaber ale vykazovala u skupin, kterým byl podáván ibuprofen (2 a 200 µg/kg) výrazné snížení aktivity enzymu glutathion peroxidázy a u skupiny které byl podáván diklofenak (200 µg/kg) výrazné snížení aktivity enzymu katalázy. Oba tyto enzymy mají za úkol přeměňovat v organismu peroxid vodíku na vodu a vodík. Jejich snížení tedy vede k poškození tkání působením peroxidu vodíku.

V závěru můžeme říct, že ibuprofen a diklofenak mají na pstruha duhového negativní vliv, který je výrazně větší u jednotlivých látek než u jejich kombinace.

Seznam literatury:

- 1) FOKUNANG, Ch. N.; FOKUNANG, E. T.; FREDERICK, K.; NGAMENI, B.; NGADJUI B.: Overview of non-steroidal anti-inflammatory drugs (nsaids) in resource limited countries. *MOJ Toxicol.* 2018;4(1):5–13. <https://doi.org/10.1136/inp.c1436>
- 2) INNES, J.; O'Neill, T.; LASCELLES, D.: Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of canine osteoarthritis. In *Practice.* 2012, 32: 126-137. <https://doi.org/10.1136/inp.c1436>
- 3) DUZ, M.: Choice of non-steroidal anti-inflammatory drugs in equine colic. *UK-Vet Equine.* 2019, 3: 6-10.
- 4) BROWN, J. N.; PAXÉUS, N.; FÖRLIN, L.; LARSSON, D. G. J.: Plasma levels of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and gemfibrozil in fish exposed to sewage effluents: Assessing the risk of discharges to aquatic environments. 2007. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4244.3929>
- 5) SKOČOVSKÁ, M.; FERENČÍK, M.; SVOBODA, M.; SVOBODOVÁ, Z.: Residues of selected sulfonamides, nonsteroidal anti-inflammatory drugs and analgesics-antipyretics in surface water of the Elbe river basin (Czech Republic). *Veterinarni Medicina,* 2021. 66, (05): 208–218. <https://doi.org/10.17221/180/2020-VETMED>
- 6) BEREKETOGLU, C.; PRADHAN, A.; OLSSON, P. - E.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) cause male-biased sex differentiation in zebrafish. *Aquatic Toxicology.* 2010, 223: 105476. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105476>
- 7) MOHEBI DERAKHSH, P.; MASHINCHIAN MORADI, A.; SHARIFPOUR, I.; JAMILI, Sh.: Toxic effects of diclofenac on gills, liver and kidney of *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). *Iranian Journal of Fisheries Sciences.* 2020, 19.
- 8) MEMMERT, U.; PEITHER, A.; BURRI, R.; Weber, K.; Schmidt, T.; Sumpter, J. P.; Hartmann, A.: Diclofenac: New data on chronic toxicity and bioconcentration in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 2013, 32: 442-452. <https://doi.org/10.1002/etc.2085>
- 9) SVOBODOVA, Z.; PRAVDA, D.; MODRA, H.: Metody hematologického vyšetřování ryb. *Edice metodik č. 122. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod.* 2012, 40.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 205/2021/FVHE

Stanovení železa, mědi a zinku v séru psů a posouzení jejich vztahu k výživě

Viola Zentrichová, Alena Pechová

Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno

Úvod

V dnešní době je na trhu dostupná velká škála komerčních krmiv pro psy, ať už granulovaných, nebo vlhkých. V našich podmínkách se výrobci těchto krmiv řídí doporučeními Evropské federace výrobců krmiv pro domácí zvířata (FEDIAF) (1). To je do jisté míry zárukou, že jsou tato krmiva nutričně vyvážená. Kromě základních živin, jako jsou bílkoviny, tuk a makroprvky, jsou v těchto doporučeních obsažena i minimální doporučená množství pro některé stopové prvky. Mezi nimi jsou i železo, měď a zinek. Psi, krmení komerčním krmivem, by tedy měli mít zajištěn dostatečný příjem těchto minerálů.

V současné době ovšem také narůstá popularita doma připravované stravy, a to především syrové, nebo vařené kombinované se syrovou. Dle majitelů, krmících své psy syrovou stravou, je tento způsob „zdravější“ a „přirozenější“ (2). Mezi výhody se také uvádí, že je pro psy chutnější, psi mají čistší zuby a lesklejší srst (3). Jen 9 % majitelů ovšem konzultuje výživu svého psa s veterinářem a také se více spoléhají na internetové zdroje, než na odborníky (2). Taková strava pak může být nevyvážená, bez dostatečného množství všech esenciálních živin. Na to poukazují i publikované studie, zkoumající obsah minerálních látek v doma připravovaných dietách pro psy. V první studii, analyzující 95 receptů, nesplňovalo požadavky na minerální látky 60 % z nich (4). Ve druhé studii dokonce ani jeden ze 75 receptů nesplnil všechny nutriční doporučení FEDIAF (5). Cílem této práce bylo potvrdit hypotézu, že psi krmení doma připravovanou stravou mají nižší příjem minerálních látek, a proto i nižší koncentrace železa, mědi a zinku v krevním séru. Dále byl posouzen vztah stopových prvků k jednotlivým makroprvkům a biochemickým parametrům.

Materiál a metodika

Vzorky byly odebrány ve spolupráci se soukromými veterinárními lékaři v rámci jejich preventivní a diagnostické činnosti. Všichni psi byli před odběrem vyšetřeni a shledáni klinicky zdravými. Majitelé podepsali informovaný souhlas a vyplnili anamnestický dotazník. V tomto dotazníku podali informace o věku, pohlaví a plemeni psa, a dále o skladbě stravy a četnosti krmení. Podle těchto informací byli psi rozděleni do tří skupin – psi krmení komerčním krmivem (více než 75 % denní dávky tvořilo komerčně vyráběné krmivo), psi krmení domácí stravou (více než 75 % denní dávky

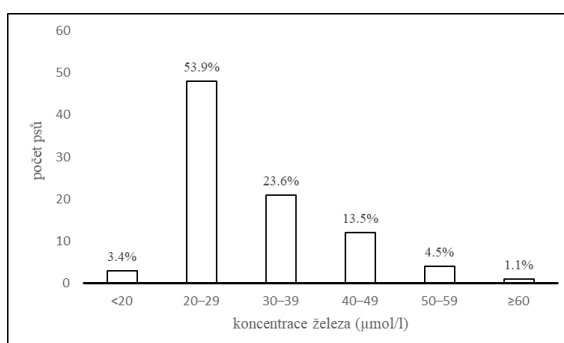
tvořila doma připravovaná strava) a psi krmení kombinovanou stravou. Celkem jsme získali vzorky od 89 psů, z toho 50 zvířat bylo krmeno komerční, 21 domácí a 18 kombinovanou stravou.

Vzorky byly odebírány z *v. jugularis* nebo *v. cephalica antebrachii*. Přibližně 2 mililitry byly odebrány do zkumavky bez antikoagulantia. Pro získání séra byly vzorky ponechány 30 minut v pokojové teplotě a následně odstředěny. Všechny vyšetřovaný materiál byl zmražen na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a rozmražen až bezprostředně před analýzou. Všechna stanovení probíhala pomocí klinického biochemického analyzátoru INDIKOTM, za použití komerčních setů a certifikovaných kontrolních materiálů. Z biochemických parametrů byly stanovovány kromě železa, mědi a zinku také vápník, anorganický fosfor, hořčík, ALT, ALP, AST, GMT, urea, kreatinin, celková bílkovina, albumin, triglyceridy, kreatinin kináza, cholesterol a celkový bilirubin. Z důvodu nedostatku vzorku nebyly všechny parametry změřeny ve všech vzorcích. Pro statistické zpracování dat byl použit program UNISTAT 6.0 (Unistat Ltd, Londýn, Velká Británie). Data byla testována pomocí Kolmogorov-Smirnova testu, a dle výsledku byla použita jednofaktorová ANOVA, nebo Mann-Whitney U test. Korelace byly hodnoceny pomocí Spearmanova koeficientu. Hladina statistické signifikance byla určena na $p \leq 0,05$.

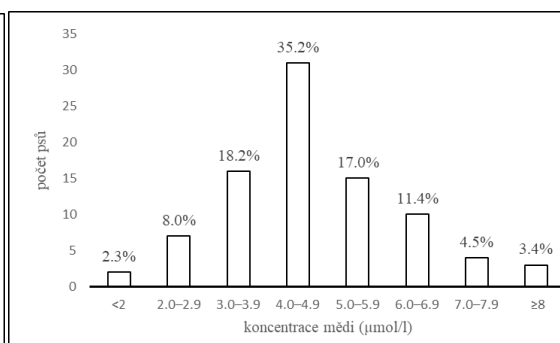
Výsledky

Z 21 psů krmených převážně domácí stravou jen dva majitelé uvedli, že přidávají nutriční doplněk s obsahem minerálů. V grafech 1-3 je znázorněna distribuce dat koncentrace železa, mědi a zinku v krevním séru celého souboru vyšetřovaných psů. Tabulka 1 uvádí sérové koncentrace stopových prvků v závislosti na dietě. Signifikantní vliv diety byl zjištěn pouze u zinku, přičemž koncentrace Zn v krvi byla vyšší u psů dostávajících komerční dietu ve srovnání se psy krmenými domácí stravou.

Graf 1. Koncentrace železa (n = 89)



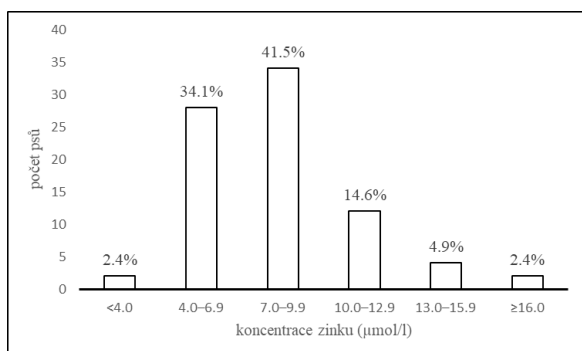
Graf 2. Koncentrace mědi (n = 88)



Po analýze vzájemných vztahů stopových prvků a ostatních biochemických parametrů bylo zjištěno, že koncentrace železa nekoreluje se žádným ze sledovaných parametrů. Měď pozitivně korelovala s hodnotami vápníku ($c = 0,430$, $p < 0,001$), hořčíku ($c = 0,318$, $p = 0,003$), ALT ($c = 0,246$, $p =$

0,022), ALP ($c = 0,253$, $p = 0,017$), albuminu ($c = 0,268$, $p = 0,012$) a celkové bílkoviny ($c = 0,272$, $p = 0,011$). Zinek pozitivně koreloval s hořčíkem ($c = 0,242$, $p = 0,028$), ALP ($c = 0,233$, $p = 0,035$), albuminem ($c = 0,320$, $p = 0,003$), triglyceridy ($c = 0,360$, $p < 0,001$) a cholesterolem ($c = 0,286$, $p = 0,045$).

Graf 3. Koncentrace zinku (n = 82)



Tabulka 1. Koncentrace stopových prvků (medián) v závislosti na dietě (* $p \leq 0,05$, signifikantní rozdíl mezi skupinami)

µmol/l	komerční strava	kombinovaná strava	domácí strava
železo	28,4	24,8	29,6
měď	4,4	4,3	4,3
zinek	8,9*	7,3	6,7*

Při statistickém vyhodnocení údajů z anamnestických dotazníků vyplněných autory bylo dále zjištěno, že váha psů (skupiny < 10 kg, $10-20$ kg, > 20 kg) nemá vliv na koncentraci železa, mědi ani zinku v krevním séru. Zaznamenali jsme ovšem vliv věku a pohlaví. Psi starší 10 let měli vyšší koncentraci mědi (medián $5,5$ µmol/l) než všechny ostatní věkové skupiny (mladší 2 let medián $4,0$ µmol/l, 2–5 let $4,4$ µmol/l a 6–10 let $4,3$ µmol/l). Pohlaví mělo rovněž vliv na hladinu mědi. Dále i na koncentraci zinku. Zatímco medián u samců byl $6,6$ µmol/l pro zinek a $4,3$ µmol/l pro měď, u samic byl $8,9$ µmol/l (zinek) a $5,0$ µmol/l (měď).

Závěr

Způsob krmení psů ovlivňuje sérovou hladinu zinku. Nejnížší koncentraci najdeme u psů krmených převážně doma připravovanou stravou a nejvyšší u psů krmených komerčním krmivem, přičemž tento rozdíl je statisticky významný. Naše hypotéza se tedy v případě zinku potvrdila. Měď a železo ovšem podávanou stranou ovlivněny nebyly. Zajímavé ovšem je, že sérová hladina zinku byla ovlivněna pohlavím a hladina mědi pohlavím a věkem.

Seznam literatury:

- 1) THE EUROPEAN PET FOOD IDUSTRY: Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs [online]. FEDIAF, 2021 [cit. 2021-10-21]. Dostupné z: www.fediaf.org/self-regulation/nutrition.html
- 2) MORGAN, S. K.; WILLIS, S.; SHEPHERD, M. L.: Survey of owner motivations and veterinary input of owners feeding diets containing raw animal products. PeerJ, 2017, 5.
- 3) FREEMAN, L. M.; CHANDLER, M. L.; HAMPER, B. A.; WEETH, L P.: Current knowledge about the risks and benefits of raw meat-based diets for dogs and cats. Journal of the American Veterinary Medical Association, 2013, 243(11), 1549-1558.
- 4) DILLITZER, N., BECKER, N., KIENZLE, N.: Intake of minerals, trace elements and vitamins in bone and raw food rations in adult dogs. British Journal of Nutrition, 2011, 106(S1), S53-S56
- 5) PEDRINELLI, V.; ZAFALON, R. V. A.; RODRIGUES, R. B. A.; PERINI, M. P.; CONTI, R. M. C.; VENDRAMINI, T. H. A.; DE CARVALHO BALIEIRO, J. C.; BRUNETTO, M. A.: Concentrations of macronutrients, minerals and heavy metals in home-prepared diets for adult dogs and cats. Scientific Reports, 2019, 9(1), 13058.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 201/2021/FVHE

Spermie a párovací systémy evropských netopýrů

Kateřina Zukalová¹, Veronika Seidlová^{1,2}, Vladimír Piaček¹, Jiří Pikula¹, Šárka Bednaříková¹,
Monika Němcová¹, Jan Zukal^{1,2}

¹Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární univerzita Brno, ²Ústav biologie obratlovců, Akademie věd České republiky

Úvod

Životní strategie netopýrů žijících v mírném pásmu se liší od obecného savčího modelu kvůli jejich schopnosti překonat období nedostatku potravy v zimních měsících ve stavu pravého zimního spánku neboli hibernace. V tomto období dochází ke snížení životních funkcí a hormonální aktivity spojené s reprodukcí. Spermatogeneze, probíhá na jaře a v létě, zatímco páření nastává na podzim během swarmingu a výjimečně i během hibernace. Zralé životaschopné spermie jsou uchovávány po celou dobu hibernace buď v *cauda epididymis* (přesto, že spermatogeneze ustává již od konce léta) nebo po kopulaci v samičí rozmnožovací soustavě (1). Takto uložené spermie přežijí až 7 měsíců, což je mezi savci výjimečné (např. *Rhinolophus hipposideros*) (2). Na jaře po probuzení dochází u samic k ovulaci, uvolnění spermií a následně oplodnění vajíčka.

Párovací systémy jsou alespoň částečně popsány pouze u 7 % druhů netopýrů. Většina evropských druhů netopýrů využívá typicky savčí model, tedy polygamii, s možnou promiskuitou obou pohlaví. Možnost mnohonásobného páření a parametry reprodukční fyziologie netopýrů naznačují, že kompetice spermií bude hrát důležitou a často podceňovanou roli v evoluci párovacích systémů u netopýrů (3). Tento jev dokazuje například i vícenásobná paternita u druhu *Eptesicus fuscus* (4). U evropských druhů netopýrů, jakými jsou netopýr dlouhouchý (*Myotis bechsteinii*) a netopýr řasnatý (*Myotis nattereri*), dochází k páření na místech swarmingu. Tato místa se často nacházejí před vchody do jeskynních systémů. Aktivita jedinců na těchto místech tak může být považována za období pářící aktivity (5).

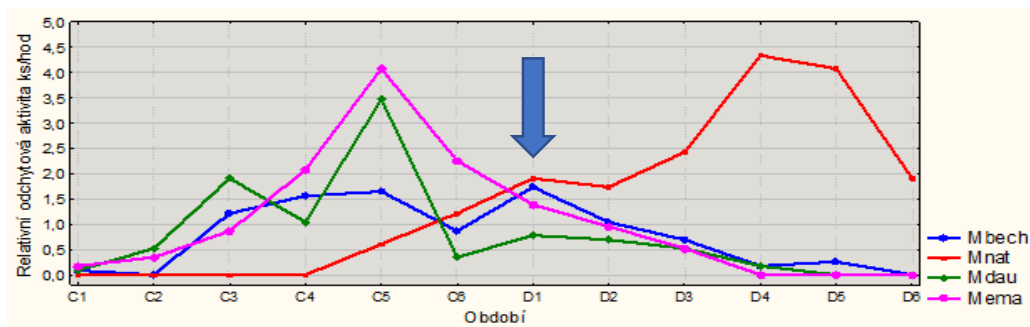
Cílem studie bylo porovnání parametrů spermií a aktivity na místě swarmingu u druhů *Myotis bechsteinii* a *Myotis nattereri*. Položili jsme si výzkumné otázky a zpracovali je do následující hypotézy: Pokud je reprodukční aktivita dvou druhů rozdílná v čase, budou mít samci jednotlivých druhův daném okamžiku rozdílné parametry spermií? Tedy u *M. nattereri* nebudou nalezeny rozdílné parametry spermií, neboť se v daném čase všichni samci nachází před obdobím pářící aktivity, zatímco *M. bechsteinii* se v daném čase nachází po období pářící aktivity, tudíž lze očekávat rozdílné parametry spermií u samců úspěšných a neúspěšných.

Materiál a metodika

Do odchytné klece a nárazových sítí byli dne 18. 9. 2021 při výletu z Kateřinské jeskyně (Blansko) odchyceni 4 samci *Myotis bechsteinii* a 4 samci *Myotis nattereri*. Jedinci byli změřeni, zváženi a samostatně vloženi do označených plátěných pytlíků. Zvířata byla individuálně uspána za pomoci inhalačního přístroje s odpařovačem isofluranu anestetikem o koncentraci 1,5-2 %. Pro získání vzorků ejakulátu byl použit přístroj IEEG-impulsní elektroejakulační generátor (Certifikovaná metodika). Po uspání zvířete byla do rekta zavedena mikroelektroda pro dosažení ejakulace semene (0,3-3 mA, 50 Hz). Ejakulát byl odebrán sterilní špičkou, přičemž 5 μ l vzorku sloužilo k analýze pomocí systému CASA (Computer-assisted Sperm Analysis, Španělsko) a 5 μ l bylo napipetováno na podložní sklíčko a zafixováno k pozdější morfometrické analýze. Pro barvení vzorků bylo použito Giemsovo barvivo. Po odebrání ejakulátu bylo odpojeno inhalační anestetikum a zvířata byla ponechána na kyslíku až do probuzení. Bezprostředně po úplném probuzení z inhalační anestezie byla zvířata vypuštěna v místě odchytu. Data o aktivitě netopýrů ve vchodu Kateřinské jeskyně byla získána ve spolupráci s Ústavem biologie obratlovců AV ČR (doc. Zukal). Letová aktivita netopýrů byla zaznamenávána po desetidenních intervalech od poloviny července do poloviny listopadu. Samci byli pro statistickou analýzu rozděleni na dvě kvalitativní skupiny s rozdílným zastoupením nepohyblivých spermií ve vzorku. Méně než 10 % nepohyblivých spermií představuje vysoký aktuální reprodukční potenciál (VARP), více než 10 % nepohyblivých spermií představuje aktuálně nízký reprodukční potenciál (NARP). Jelikož všechna získaná data měla normální rozložení (Shapiro-Wilkův test) byla k analýze rozdílů mezi druhy a definovanými skupinami samců použita parametrická analýza rozptylu (ANOVA).

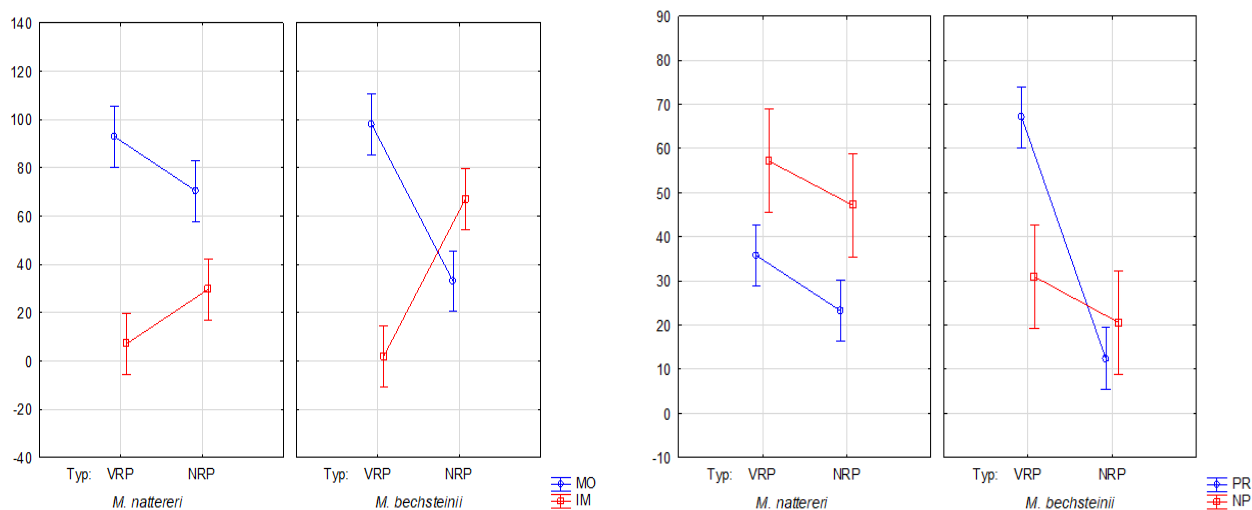
Výsledky

Aktivita *Myotis bechsteinii* a *Myotis nattereri* v období páření na místě swarmingu (Kateřinská jeskyně) se významně liší. *M. bechsteinii* je aktivní zejména v druhé polovině srpna, zatímco vrchol aktivity *M. nattereri* nastává až v průběhu října (Obr. 1). Datum odběru vzorků spermií odpovídá desetidennímu období D1 a je zvýrazněno modrou šipkou.

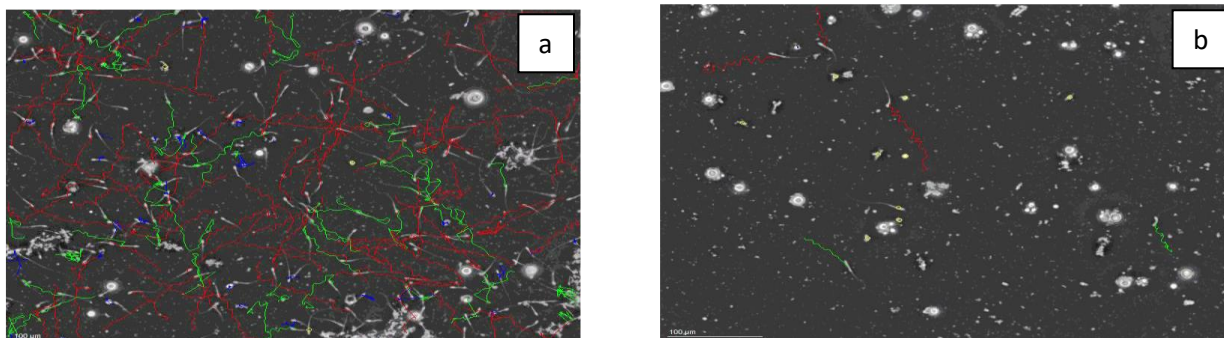


Obrázek 1. Relativní aktivita druhů v závislosti na období. C1-D6 značí desetidenní interval odchytů v období 15.7.-14.11.2021.

Koncentrace spermií v 1 ml vzorku se neliší mezi jedinci téhož druhu, ani mezi různými druhy ($F = 0,93$; $p < 0,5$). Rozdíly však byly nalezeny v procentuálním zastoupení imotilních a motilních spermií ($F = 42,44$; $p < 0,01$; respektive $F = 42,45$; $p < 0,01$) (Obr 2a,3a,3b). Dále byl testován rozdíl dvou typů motilních spermií, které se dělí na progresivní spermie, které se pohybují přímočaře či ve velkých kruzích a neprogresivní spermie, které se sice pohybují, ale jejich pohyb je v malých kruzích nebo bez přímého posunu (Obr 2b). Významný rozdíl v zastoupení motilních spermií byl způsoben zejména rozdílem v objemu progresivních spermií ($F = 88,81$; $p < 0,01$). Zastoupení neprogresivních spermií se statisticky významně lišilo pouze mezi druhy ($F = 38,81$; $p < 0,01$), nikoliv v rámci jednoho druhu ($F = 5,79$; $p < 0,07$).



Obrázek 2 a, b. Typ **VARP**– samec s méně než 10 % imotilních spermií, Typ **NARP** – samec s více než 10 % imotilních spermií, **MO** – motilní spermie, **IM** – imotilní spermie, **PR** – progresivní spermie, **NP** – neprogresivní spermie, hodnoty v %.



Obrázek 3 a, b. Fotografie z vyšetření ejakulátu pomocí přístroje CASA u samce *M. bechsteinii* s VARP (a) a NARP (b).

Závěr

Naše výsledky potvrzují rozdílnou fenologii reprodukce samců u dvou studovaných druhů. U samců *M. bechsteinii*, kteří jsou vzorkováni za vrcholem svého pářicího období byly zjištěny výrazné rozdíly v kvalitě ejakulátu. Lze tedy předpokládat, že samci s vysokým zastoupením imotilních a neprogresivních spermií (NARP) byli při reprodukci úspěšní, zatímco samci s vysokým zastoupením motilních a progresivních spermií (VARP) byli při rozmnožování neúspěšní. U samců *M. nattereri*, kteří jsou vzorkováni před pářicím obdobím se tyto rozdíly v kvalitě ejakulátu neprojevily, neboť jsou připraveni k rozmnožování, ke kterému teprve dojde.

Seznam literatury:

- 1) OXBERRY B.A. Female reproductive patterns in hibernating bats. *Journal of Reproductive and Fertility*. 1979, **56**, 359-367.
- 2) GAISLER J. et al. A contribution to the population ecology of *Nyctalus noctula* (Mammalia: Chiroptera). *Acta Sci Nat Brno*. 1979, **13**, 1-38.
- 3) HOSKEN D.J. Sperm competition in bats. *Proceeding Royal Society London B*. 1997, **264**, 385-392.
- 4) VONHOF M.J. et al. A tale of two siblings: multiple paternity in big brown bats (*Eptesicus fuscus*) demonstrated using microsatellite markers. *Molecular Ecology*. 2006, **15**, 241-247.
- 5) BERKOVÁ, H. & ZUKAL, J. Flight activity of bats at the entrance of a natural cave. *Acta Chiropterologica*. 2006, **8**, 187-195.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 216/2021/FVHE

Editovali:	<p>doc. MVDr. Petr Chloupek, Ph.D.</p> <p>prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.</p> <p>doc. MVDr. Miša Škorič, Ph.D.</p> <p>prof. MVDr. Jirí Pikula, Ph.D., Dipl. ECZM</p> <p>prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D.</p>
Název:	Konference Interní grantové agentury VETUNI
Počet stran:	139
Vydání:	První
Vydavatel:	<p>Veterinární univerzita Brno</p> <p>Brno 2021</p>

ISBN 978-80-7305-865-4