

VETERINÁRNÍ UNIVERZITA BRNO

---

FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ  
FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE

KONFERENCE  
INTERNÍ GRANTOVÉ AGENTURY

konané dne 12. prosince 2023

SBORNÍK

---

BRNO 2023

# *Konference Interní grantové agentury VETUNI 2023*

Fakulta veterinárního lékařství

Fakulta veterinární hygieny a ekologie

## **SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ**

z výsledků řešení projektů IGA VETUNI 2023 financovaných z prostředků účelové podpory  
na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT na rok 2023

Editovali:

prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D.

prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.

doc. MVDr. Miša Škorič, Ph.D.

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

doc. MVDr. Josef Kameník, CSc., MBA

Příspěvky neprošly redakční úpravou, za jejich odbornou, jazykovou i formální úroveň odpovídají autoři.

Vydání první

Veterinární univerzita Brno 2023

**ISBN 978-80-7305-946-0**

Vážené kolegyně a kolegové, studentky a studenti,

Veterinární univerzita Brno prostřednictvím Interní grantové agentury univerzity (IGA VETUNI) poskytuje účelovou podporu na projekty výzkumu prováděné studenty při uskutečňování akreditovaných doktorských nebo magisterských studijních programů, který je bezprostředně spojen s jejich vzděláváním. V roce 2023 bylo na úrovni univerzity finančně podpořeno a řešeno celkem 24 studentských projektů, které uspěly v soutěži o účelovou podporu na specifický vysokoškolský výzkum na univerzitě zaměřený na aktuální problémy ve veterinárním lékařství, veterinární hygieně a ekologii, bezpečnosti a kvalitě potravin, ochraně zvířat nebo v gastronomii.

Sborník obsahuje příspěvky zpracované řešiteli projektů pro účely prezentace na konferenci a obhajoby svých projektů, a představuje tedy výsledky výzkumu studentů VETUNI financovaného z prostředků účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT na rok 2023. Konference IGA VETUNI se v letošním roce koná 12. prosince 2023, což je přesně v den 105. výročí založení univerzity. Zapojení studentů do vědy a výzkumu v rámci jejich vzdělávání na univerzitě je předpokladem rozvoje veterinárních poznatků a veterinárního vzdělávání i v budoucích letech.

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

prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D.

předsedkyně komise IGA VETUNI

## OBSAH

### **Příspěvky FVL**

Vliv antiseptických kožních přípravků na mikrobiální kontaminaci periferních intra-venózních katetrů u psů a koček .....	2
Incizní komplikace po laparotomických zákrocích a rizikové faktory jejich vzniku u koní .....	6
Výskyt <i>Helicobacter</i> spp. v trávicím traktu psů s příznaky gastrointestinálního onemocnění ...	12
Citlivost nejvýznamnějších parodontopatogenů psa k nanočásticím stříbra .....	16
Možnosti přímého a nepřímého průkazu alfa herpesviru koní 1 a mapování výskytu reaktivací viru v souvislosti s přidruženými infekcemi dýchacích cest .....	20
Diagnostika a terapie respiračních onemocnění u potkanů chovaných ze záliby .....	24
Role volně žijících vlků evropských jako sentinelových hostitelů <i>Toxoplasma gondii</i> .....	30
Vliv infekce hlísticí <i>Angiostrongylus cantonensis</i> na vybrané fyziologické funkce definitivních hostitelů .....	34
Zavedení síťovací techniky k detekci a následné genotypizaci vajíček tasemnic v trusu volně žijících masožravců .....	38
Porovnání diagnostických algoritmů při vyšetření magnetickou rezonancí v ortopedii a neurochirurgii malých zvířat .....	41
Farmakokinetika torasemidu a zhodnocení jeho dlouhodobého podání na funkci ledvin a plazmatickou elektrolytovou rovnováhu u králíka domácího ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ) .....	45

## Příspěvky FVHE

Analýza cest šíření aviární patogenní <i>Escherichia coli</i> z různých zdrojů .....	49
Vliv fortifikace rostlinnými přísadami na vlastnosti mýdla vyrobeného z použitého oleje .....	53
Rezidua pesticidů a léčiv jako významný faktor ovlivnění welfare a zdraví vodních organismů .....	57
Volba zastávek a překonávání přírodních bariér během migrací u telemetricky značených dravců v souvislosti s veterinárně hygienickými aspekty .....	61
Celogenomové sekvenování jako nástroj pro sledování cest šíření rezistentních kmenů <i>Klebsiella</i> spp. z odpadních vod do prostředí .....	64
Adaptace bakteriálních kmenů rezistentních ke karbapenemům a jejich interakce s mobilními genetickými elementy .....	68
Stanovení karagenanů metodou ELLA .....	72
Komparativní genomika multirezistentních patogenních kmenů <i>Escherichia coli</i> ST131 a analýza přidružených plazmidů .....	78
Prevalence lyssavirů a astrovirů u netopýrů v Evropě a Asii .....	82
Komplexní posouzení toxicity bisfenolu A a F pro pstruha duhového ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) .....	86
Vliv suchého zrání vepřového masa na mikrobiologickou kvalitu a senzorycké vlastnosti ....	90
Vplyv hemogregarínů rodu <i>Hemolivia</i> na zdravotný stav ich korytnačích hostitel'ov .....	94
Vliv přísadky beta-glukanů v krmivu na pstruha duhového ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) po experimentální challenge <i>Aeromonas salmonicida</i> .....	98

**Příspěvky**  
**Fakulty veterinárního lékařství**

# **Vliv antiseptických kožních přípravků na mikrobiální kontaminaci periferních intravenózních katetrů u psů a koček.**

Matěj Pavlík<sup>1</sup>, Andrea Nečasová<sup>1</sup>, Jan Kraška<sup>2</sup>, Alois Nečas<sup>1</sup>

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

*2 - Magisterský studijní program – 6. ročník, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno*

## **Úvod**

Mikrobiální kontaminace periferních intravenózních katetrů je častou komplikací ve veterinární medicíně. Četnost výskytu mikrobiální kontaminace se pohybuje mezi 7-48 % (Matthews et al. 1996, Seguela et al. 2011, Simpson et al. 2022, Matula et al. 2023). Jednou z nejdůležitějších bran průniku infekce a následné kolonizace intravenózního katetru je kůže. Riziko kontaminace se dá snižovat dostatečným ostříháním srsti, odstraněním hrubých nečistot a následným použitím antiseptických kožních přípravků. Závažnost a klinické důsledky mikrobiální kontaminace intravenózních katetrů jsou mnohem vyšší u pacientů na jednotkách intenzivní péče, proto se zde věnuje zvýšená pozornost řádné aseptické přípravě před zavedením intravenózního katetru (Spurlock et al. 1990, Ones et al. 2009, Simpson et al. 2022). Bakteriální kontaminace intravenózních katetrů a rozdíly v účinnosti jednotlivých antiseptických přípravků pro přípravu operačního pole jsou dobře popsána témata (Asimus et al. 2019), ale dle našeho vědomí se žádná studie dosud nevěnovala srovnání jednotlivých antiseptických kožních přípravků a jejich vlivu na míru bakteriální kontaminace intravenózního katetru. Naším cílem bylo proto určit vliv vybraných antiseptických kožních přípravků (alkohol, chlorhexidin a jejich kombinace) na míru mikrobiální kontaminace periferních intravenózních katetrů.

## **Materiál a metodika**

Do studie byla zařazena zvířata hospitalizovaná na jednotce intenzivní péče Kliniky chorob psů a koček, kterým byl zaváděn periferní intravenózní katetr. U každého zvířete byl k přípravě místa před zavedením intravenózního katetru použit jeden z následujících přípravků: roztok na bázi alkoholu (ethanol, 2-propanol, Softasept N, B. Braun), chlorhexidinový sprej (SkinMed spray, Cymedica) a kombinace chlorhexidinového mýdla (Lifo-Scrub, B. Braun) a roztoku na bázi alkoholu (Softasept N, B. Braun). Psi a kočky byli rozděleni do skupin na základě použitého antiseptického přípravku a dále na základě délky hospitalizace. Zvířata byla podle délky hospitalizace rozdělena do tří skupin: <24 h, 24-48 h, >48 h.

U každého psa a kočky byly provedeny 2 mikrobiologické stěry z kůže a odebrán jeden vzorek z katetru po jeho vyjmutí z cévy. První stěr byl odebrán z kůže v místě zavedení intravenózního katetru po ostrihání srsti před použitím antiseptického kožního přípravku. Druhý stěr byl odebrán ve stejném místě po použití antiseptického kožního přípravku. Stěry byly odebírány sterilním tamponem navlhčeným ve sterilním fyziologickém roztoku, který byl následně umístěn do transportního média AMIES. Jako poslední vzorek byla ke kultivaci odeslána poslední třetina intravenózní části katetru. Vzorky byly následně odeslány ke kultivačnímu vyšetření. Celkem bylo odebráno 252 vzorků.

Kultivace stěrů z kůže probíhala na Columbia agar (Oxoid) s přidavkem 5 % ovčí krve (krevní agar, KA) a MacConkey agar (MCA, Oxoid). Vzorky byly inkubovány při 37 °C, za aerobních podmínek, po dobu 48 hodin. Vzorky kanyl byly za aseptických podmínek vyjmuty z odběrové zkumavky, nakultivovány na KA a následně přesunuty do zkumavky s Brain Heart Infusion bujonem (BHI, Oxoid) k pomnožení. Pomnožení probíhalo při 37 °C, za aerobních podmínek, 24 hodin. Po inkubaci byl bujon důkladně zvortexován, 100 µl bylo nanášeno na KA a následně inkubováno při 37 °C, za aerobních podmínek, 48 hodin. Narostlé kolonie byly vizuálně hodnoceny na základě rozdílné morfologie a následně identifikovány metodou MALDI TOF MS.

Vzorky kanyl byly kultivovány na KA a současně pomnoženy v Brain Heart Infusion bujonu (BHI). Po pomnožení byl vzorek z bujonu vyočkován na KA. Kultivace vzorků na agarech probíhala při 37 °C, aerobně, 48 hodin. Narostlé kolonie byly identifikovány metodou MALDI TOF MS. Získaná data byla statisticky zhodnocena, k hodnocení byl použit Fisherův exaktní test.

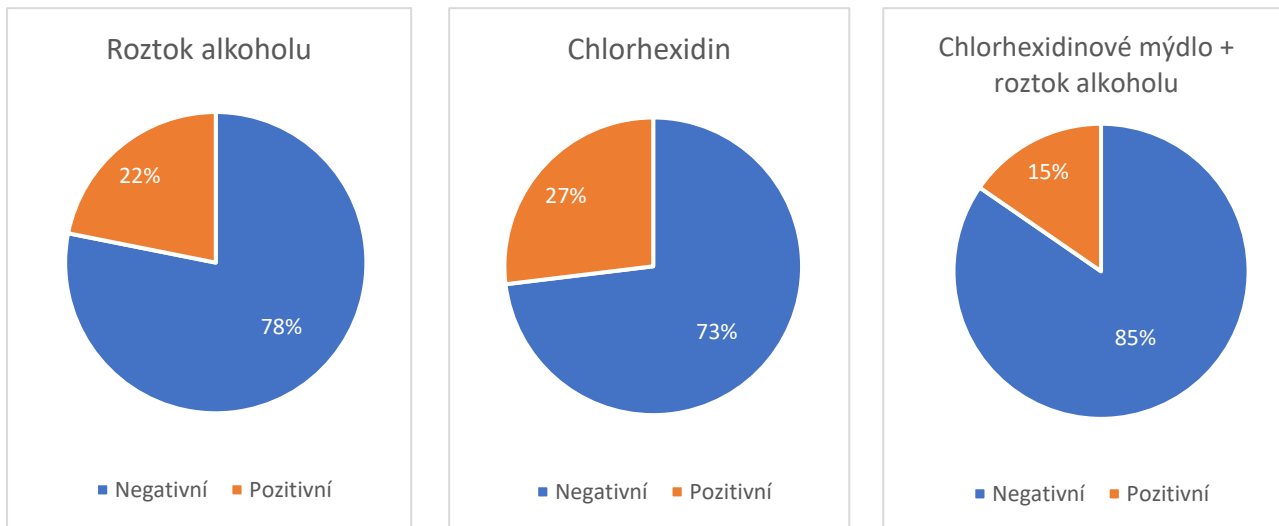
## Výsledky

Celkem bylo do studie zařazeno 84 zvířat, konkrétně 74 psů a 10 koček. Kůže před zavedením intravenózní kanyly byla ošetřena roztokem alkoholu u 32 zvířat, chlorhexidinovým sprejem u 26 zvířat a kombinací chlorhexidinového mýdla a roztoku alkoholu u 26 zvířat. Ve skupině zvířat ošetřených roztokem na bázi alkoholu byly kultivačně pozitivní katetry zjištěny u 7 jedinců (21,86 %), ve skupině zvířat ošetřených chlorhexidinovým sprejem u 7 jedinců (26,92 %), a ve skupině zvířat ošetřených chlorhexidinovým mýdlem a roztokem na bázi alkoholu u 4 jedinců (15,38 %) (graf 1). Jednotlivé skupiny se mezi sebou statisticky významně nelišily ( $p=0,55$ ). Z celkového počtu 84 testovaných katetrů byl kultivací zjištěn pozitivní nález u 18 vzorků (21,43 %), četnost pozitivního kultivačního nálezu se mezi jednotlivými skupinami podle typu použitého antiseptického přípravku nelišila ( $p=0,64$ ).

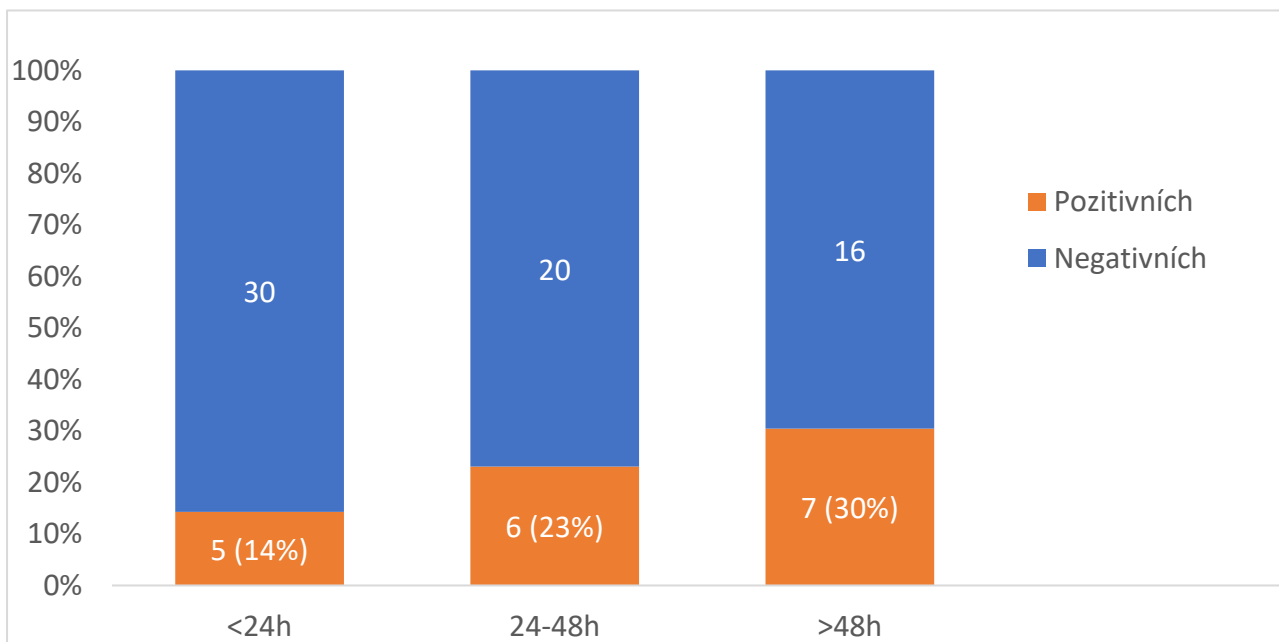
Na základě délky hospitalizace se procentuální počet kultivačně pozitivních katetrů zvyšoval s délkou hospitalizace. Ve skupině do 24 h bylo pozitivních 5 ze 35 (14,29 %), ve skupině 24-48 h bylo pozitivních 6 z 26 (23,08 %) a ve skupině nad 48 h bylo pozitivních 7 z 23 (30,43 %) (graf 2). Bakterií



nejčastěji izolovanou z periferních intravenózních katetrů byl *Enterobacter cloacae* (celkově 7x, 38,89 % ze všech pozitivních nálezů). Další nejčastěji izolované bakterie z intravenózních katetrů byly bakterie rodu *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* a *Bacillus*. Bakterie izolované z kontaminovaných katetrů korespondovaly s bakteriemi izolovanými z kůže daného zvířete pouze v jednom případě (5,56 %), jednalo se o bakterii *Micrococcus luteus*.



Graf 1. Procentuální podíl kultivačně pozitivních kanyl v závislosti na použitém antiseptickém přípravku.



Graf 2. Počet kultivačně pozitivních katetrů v závislosti na délce hospitalizace.

## Závěr

Přestože nejnižší míra kontaminace periferních intravenózních katetrů byla zjištěna při použití chlorhexidinového mýdla v kombinaci s roztokem alkoholu, nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi námi sledovanými přípravky. Míra kontaminace intravenózních katetrů má tendenci stoupat s délkou hospitalizace. Bakterie izolované z kontaminovaných katetrů nekorespondovaly s bakteriemi izolovanými z kůže daného zvířete. Naše výsledky potvrzují účinnost jednotlivých kožních antiseptik a zároveň poukazují na to, že ke kontaminaci intravenózních kanyl dochází během hospitalizace především z prostředí, a nejedná se proto o důsledek nedostatečné aseptické přípravy kůže před samotným zavedením katetru. Autoři by se rádi věnovali výzkumu zdrojů a mechanismů kontaminace v dalších studiích.

## Seznam literatury

- Asimus, E., Palierne, S., Blondel, M., et al. (2019) Comparison of hydroalcoholic rubbing and conventional chlorhexidine scrubbing for aseptic skin preparation in dogs. *Veterinary Surgery*, **48**, 1466-472.
- Mathews, K. A., Brooks, M. J. and Valliant, A. E. (1996) A prospective study of intravenous catheter contamination. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, **6**, 33-43.
- Matula, E., Mastrocco, A., Prittie, J., et al. (2023), Microorganism colonization of peripheral venous catheters in a small animal clinical setting. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, **33** (5), 509-519.
- Ones, I. D., Case, A. M., Stevens, K. B., Boag, A. and Rycroft, A. N. (2009) Factors contributing to the contamination of peripheral intravenous catheters in dogs and cats. *Veterinary Record*, **164**, 616-618
- Simpson, S. E., Zersen, K. M. (2022) Incidence and type of peripheral intravenous catheter complications documented in hospitalized dogs. *Journal of Small Animal Practice*, **64** (3), 130-135.
- Seguela, J. and Pages, J.-P. (2011), Bacterial and fungal colonisation of peripheral intravenous catheters in dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*, **52**, 531-535.
- Spurlock, S. L. and Spurlock, G. H. (1990) Risk factors of catheter-related complications. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, **12**, 241-248.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 118/2023/FVL***

# **Incizní komplikace po laparotomických zákrocích a rizikové faktory jejich vzniku u koní**

Zuzana Kecerová, Kristýna Dvořáková, Magdaléna Oubrechtová

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

## **Úvod**

Infekce v místě chirurgického zákroku, tzv. incizní komplikace, vedou ke zhoršenému hojení ran a jsou častým problémem u hospitalizovaných koní zejména po laparotomických operacích (Gehlen et al., 2023; Mair and Smith, 2005). Protože laparotomie reprezentují jedny z nejčastějších operací u koní, jsou incizní komplikace ve středu zájmu veterinárních chirurgů po celém světě. Přes uplatnění řady opatření v podobě profylaktické aplikace antibiotik, šetrných operačních technik i postoperačního managementu, dochází ke komplikovanému hojení ran po operacích gastrointestinálního traktu v 10 % - 37 % případech (Durward-Akhurst et al., 2013; Dziubinski et al., 2020; Isgren et al., 2018).

V etiologii pooperačních infekcí se nezdá uplatňují nozokomiální multirezistentní mikroorganismy (s rezistencí ke třem a více skupinám antimikrobik), konkrétně meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, bakterie řádu *Enterobacterales* produkující širokospektré betalaktamázy (ESBL-E), *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, či *Acinetobacter baumannii*. Obvykle jde navíc o smíšené infekce, kdy lze v ranách identifikovat kombinace výše uvedených agens případně za spoluúčasti mikrobů kolonizujících různé tělesné kompartmenty (koaguláza negativní stafylokoky, streptokoky, gramnegativní anaeroby, nerezistentní enterobakterie) či environmentálních mikrobů (bacily) (Dziubinski et al., 2020; Zendri et al., 2023).

Rozvoj incizních komplikací ovlivňuje množství rizikových faktorů souvisejících se stavem samotného pacienta, rizika však vzhází také z vedení vlastního zákroku a následné pooperační péče. Významnými se jeví zejména věk, váha a imunokompetence koně. Z chirurgického aspektu je to potom délka operace, počet lidí přítomných na operačním sále a zkušenosti operátora, předoperační příprava operačního pole, stav operované tkáně a úroveň její kontaminace, typ incize a metoda uzavření rány společně s použitým šicím materiálem. V neposlední řadě jde také o pooperační management a celkovou délku hospitalizace. Vliv má dokonce i roční období (Eugster et al., 2004, Isgren et al., 2017; Isgren et al., 2020). Mezi nejčastější incizní komplikace patří bezesporu infekce rány (u 40 % koní po operaci na střevech), tvorba otoku, seromu nebo hematomu v oblasti rány, popřípadě nehojící se rána. Mezi závažnější komplikace patří dehiscence (prevalence 3 – 5 %) až selhání sutury rány, tvorba adhezí mezi břišní stěnou v oblasti rány a orgány dutiny břišní, tvorba hernie (6 – 17%). (Robson et al., 2016)

Vzhledem k tomu, že Klinika chorob koní VETUNI Brno zajišťuje pohotovost v režimu 24/7, počet pacientů, u kterých je nutno vykonat laparotomický zákrok, roste. V posledních letech však bohužel narůstá také počet operantů s komplikovaným hojením ran, který přesáhl 40 % případů. Hlavním cílem naší studie proto bylo vyhodnocení incidence incizních komplikací po laparotomických výkonech provedených na našem pracovišti v průběhu roku 2023 se zaměřením na identifikaci bakteriálních patogenů a stanovení jejich citlivosti k antibiotikům běžně využívaným k léčbě infekcí koní. Dílčí cíl spočíval v posouzení uplatnění vybraných rizikových faktorů na vzniku a průběhu pooperačních komplikací.

### **Materiál a metodika**

Do studie bylo zahrnuto celkem 24 koní, kteří na KCHK podstoupili laparotomickou operaci v období mezi březnem a srpnem roku 2023. Stáří pacientů se pohybovalo mezi jedním měsícem a 29 lety. Anamnéza, klinické vyšetření, předoperační péče, vlastní zákrok a pooperační péče byly vykonány za dodržení standardních postupů Kliniky chorob koní a podrobně dokumentovány.

V den hospitalizace byl od každého koně odebrán vzorek nazálního (NV1) a rektálního výtěru (RV1) a vzorek stěru kůže v oblasti předpokládané incize (vzorek č. 0). Další odběry následovaly v průběhu vlastní operace. Konkrétně byl proveden stěr rukou chirurga po umytí před nasazením sterilních rukavic (vzorek A) a stěr z rukavic chirurga po dokončení operace (vzorek B). Souběžně se odebíraly stěry pacienta: z kůže po oholení srsti před desinfekcí operačního pole (vzorek č. 1), z kůže po desinfekci a zarouškování těsně před incizí (vzorek č. 2), z kůže v okolí incize před suturou (vzorek č. 3) a z kůže po sutuře před sterilním zakrytí rány (vzorek č. 4). Vzorek z incize č. 5 byl setřen při prvním převazu současně s odstraněním stentu první pooperační den, vzorek č. 6 při druhém převazu rány odebraném do 5. dne po operaci, vzorek č. 7 při třetí výměně krytí v době po 5. dni od operace a vzorek č. 8 bezprostředně po vyjmutí kožních stehů 10. pooperační den, popřípadě v den odjezdu pacienta z kliniky (pokud se tak stalo ještě před vytažením stehů z rány). Při propouštění pacienta byly jako poslední odebrány vzorky nosního a rektálního výtěru (NV2, RV2).

Veškerý získaný biologický materiál byl neprodleně transportován do laboratoří Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie v komerčních odběrových soupravách obsahujících médium dle Amiese (Dispolab, ČR). Zde navázalo mikrobiologické vyšetření všech vzorků pomocí bakteriologické kultivace na Columbia blood agaru, McConkey agaru a dále pro izolaci ESBL pozitivních enterobakterií navíc na McConkey agaru (všechny půdy Oxoid, VB) suplementovaném cefalosporinem 3. generace cefotaximem (Sigma Aldrich, VB) v koncentraci 2 mg.L<sup>-1</sup>. Definitivní identifikace mikroorganismů proběhla metodou MALDI-TOF MS na přístroji Microflex LT (Bruker

Daltonics, Německo). Bakterie identifikované jako *S. aureus* jsme dále vyšetřily diskovým difúzním testem (DDT) na citlivost k penicilinu, ko-amoxicilinu, cefalotinu, cefoxitinu, ceftiofuru, cefchinomu, gentamicinu, rifaximinu, erytromycinu, tetracyklinu, doxycyklinu, ko-trimetoprimu, a enrofloxacinu. U izolátů *E. coli* byla vyšetřena citlivost DDT k ampicilinu, cefoxitinu, cefchinomu, chloramfenikolu, florfenikolu, ciprofloxacinu, enrofloxacinu, marbofloxacinu, gentamicinu, ko-trimetoprimu, tetracyklinu, doxycyklinu a oxytetracyklinu. U *E. coli* izolovaných na půdě s přídatkem cefotaximu byl navíc zařazen Double disc synergy test (DDST) pro průkaz produkce širokospektrých betalaktamáz. Všechny izoláty *S. aureus* a *E. coli* byly zamrazeny při -80 °C pro budoucí izolaci DNA za účelem celogenomového sekvenování (WGS). Data získaná z WGS pak budou podkladem pro vyhodnocení epidemiologické příbuznosti vyšetřených izolátů a jejich možného nozokomiálního původu.

## Výsledky

K incizním komplikacím došlo u 11 koní z celkem 24 zařazených do sledovaného souboru (46 %), charakter změn zahrnoval otok, nebo secernaci z rány různého charakteru (hemoragickou, purulentní), či otok i secernaci současně, obvykle doprovázené bolestivostí. Míra závažnosti těchto komplikací byla při převazech rány hodnocena jako mírná (7/11 pacientů; 64 %), střední (2/11; 18 %) či intenzivní (2/11; 18 %). Přítomnost patogenních bakterií v ráně se prokázala u 16 ze všech 24 pacientů (67 %), u osmi koní nebyl v průběhu hospitalizace vykultivován žádný patogen. Konkrétně byly identifikovány: *E. coli* produkující širokospektré betalaktamázy či neprodukující ESBL, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* a *Staphylococcus aureus* včetně kmenů meticilin rezistentních. Pouze jeden z těchto obligátních patogenů byl diagnostikován u osmi z 16 pozitivních koní (50 %), kombinace dvou u sedmi (7/16; 44 %) a dokonce tři patogenů v ráně současně u jednoho jedince (6 %). Kromě výše jmenovaných druhů mikroorganismů jsme ze stěrů kůže a ran vykultivovali mikroby přirozeně kolonizující kůži koní a/nebo environmentální bakterie, z nichž se některé řadí mezi potenciální, nebo oportunní původce (koaguláza negativní stafylokoky, *Corynebacterium* spp., *Pantoea* spp., *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Acinetobacter* spp., *Raoultella* spp., *Enterococcus* spp., *Myroides* spp., *Arthrobacter* spp., *Comamonas* spp., *Moraxella* spp., *Rahnella* spp., *Paenibacillus* spp. a další.

Zaměříme-li se výhradně na jedenáct pacientů s diagnózou IK, patogen byl vykultivován z ran u deseti z nich (91 %), přičemž u osmi koní zde figurovala *E. coli*, u pěti z nich šlo dokonce o kmeny produkující ESBL. *E. coli* samotná byla prokázána u dvou koní, u ostatních šesti v kombinaci s jiným/jinými patogenem/patogeny. Konkrétně nejčastěji (3x) společně s *Enterobacter cloacae*,

jednou s *Enterococcus faecium*, 1x s *Acinetobacter baumannii* a 1x s *Pseudomonas aeruginosa* i MRSA. U zbývajících dvou operantů s IK byl u jednoho izolován *A. baumannii* a u druhého citlivý *S. aureus*. Ve skupině 13 koní bez pooperačních komplikací s hojením byl patogen v ráně identifikován u 6 z nich (46 %). Třikrát šlo o monoinfekci *E. faecium* a jednou o monoinfekci ESBL *E. coli*. U zbylých dvou koní byla prokázána smíšená infekce ESBL *E. coli* a *Klebsiella pneumoniae*, respektive *E. cloacae* a *K. pneumoniae*.

V rámci sledování možné kolonizace nozokomiálními patogeny MRSA a ESBL v průběhu hospitalizace na KCHK jsme odebírali vzorky nosních a rektálních výtěrů jednak v den hospitalizace (NV1, RV1) a následně v den propuštění (NV2, RV2). Negativní na MRSA a ESBL byly první nosní výtěry 23 pacientů u jednoho koně byla vykultivována ESBL produkující *E. coli*. Při propuštění nebyli vzorkováni tři koně, jeden z důvodu eutanázie, dva byli opomenuti. Z 21 NV2 bylo negativních devět (43 %), pozitivních pak dvanáct koní (57 %). Pět koní mělo při odchodu z kliniky dutinu nosní kolonizovanou meticilin rezistentním *S. aureus* (5/12; 42 %), 3 ESBL *E. coli* (25 %), v druhém nosním výtěru čtyř koní jsme našli MRSA i ESBL *E. coli* současně (4/12; 33 %). Rektální výtěry získané v den hospitalizace byly negativní u 18 koní (75 %), u šesti jsme diagnostikovali ESBL *E. coli* (25 %). V den propuštění jsme ESBL *E. coli* našli u 20 z 22 (u dvou koní nebyl odběr RV2 proveden) vzorkovaných koní (91 %). Budeme-li posuzovat negativitu v obou sledovaných patogenech současně, potom negativní první nosní i rektální výtěr mělo 18 koní z 24 (75 %), u jednoho z těchto negativních koní nebyl proveden závěrečný nosní výtěr. Ani jeden z původně MRSA a ESBL *E. coli* negativních koní nezůstal negativní i při odchodu. MRSA v nozdrách negativních, ale s nálezem ESBL *E. coli* v rektálním výtěru bylo 6 ze 17 koní (35 %), dva jiní byli negativní na ESBL *E. coli* v RV2, ale zato z nozder jednoho koně jsme vykultivovali MRSA a z druhého ESBL *E. coli*. Pozitivní záchyt z NV2 i RV2 současně jsme zaznamenali u devíti (z původně zcela negativních pacientů (9/17; 53 %), a dokonce čtyři koně měli v nose nález jak MRSA, tak ESBL *E. coli*.

Při plnění cílů naší studie jsme získali 40 izolátů ESBL *E. coli*, všechny kultivací vzorků odebraných od koní, nikoliv z rukou operátora a 12 izolátů MRSA, přičemž jeden pocházel z rukavic chirurga po ukončení zákroku. Všechny *E. coli* i MRSA vykazaly multirezistenci, sedm *E. coli* bylo dokonce rezistentních ke všem testovaným antibiotikům.

## Diskuze a závěr

Výsledky naší práce potvrdily, že incizní komplikace následující po laparotomických operacích představují na KCHK FVL VETUNI Brno stále velký problém. Z 24 sledovaných koní se IK rozvinuly až u 46 procent. Toto množství přesahuje horní hranici 37 % uváděných v recentních

vědeckých publikacích zaměřených na problematiku pooperačních infekcí u koní ([Dziubinski et al., 2020](#)).

Rizikových faktorů, které se uplatňují v etologii IK je velké množství. Na hojení postoperační rány má vliv množství vnějších i vnitřních faktorů, které společně ovlivňují rozvoj postoperačních komplikací. Rozvoj komplikací závisí na stavu pacienta a faktorech, kterým je vystaven v předoperačním období, během operace a v pooperačním období. Mezi hlavní rizikové faktory pacienta podílející se na rozvoji IK lze zařadit věk, chronická onemocnění, dehydratace, zvýšený hematokrit, hypoproteinemie, obezita. Během operace pak hrají roli v rozvoji IK příprava operačního pole a účinnost použité dezinfekce, technika provedení incize, sutury a použitý šicí materiál, tah působící na suturu, délka celkové anestezie, hypovolémie, provedení enterotomie či enteroektomie během zákroku atd. V pooperačním období hraje roli kontaminace (obzvláště důležitá je řádná sanitace recovery boxů), intraabdominální tlak, přítomnost původců nazokomiálních infekcí atd. ([Robson et al., 2016](#); [Freeman, Rötting et al., 2002](#))

Z mikrobiologických dat vyplynulo, že riziko pro rozvoj IK představuje především izolace (ESBL) *E. coli* z ran více než průkaz jiných patogenů. Naopak izolace *Enterococcus faecium*, který se řadí mezi typické původce infekcí ran, nezpůsobil komplikace hojení u tří koní, u nichž byl po operaci identifikován.

Naše práce dále přinesla podstatnou informaci o vysoké míře kolonizace trávicího traktu a horních cest dýchacích pacientů nozokomiálními patogeny, ke které dochází v průběhu hospitalizace na KCHK. Na rozdíl od humánní medicíny jsou informace o výskytu nozokomiálních infekcí získaných během pobytu ve veterinárních zařízeních stále značně limitované, přesto počet publikací na toto téma narůstá ([Zendri et al., 2023](#)). Nemocniční patogeny zde prokazované bývají různé etiologie, obvykle jsou však vysoce rezistentní a často zoonotické. V konečném důsledku negativně ovlivňují nejen uzdravení hospitalizovaných zvířat, ale mohou vést k infekci a onemocnění také veterinárního personálu a majitelů zvířat ([Weese et al., 2006](#)). Pro posouzení míry kolonizace koní nozokomiálními patogeny během hospitalizace na našem pracovišti jsme zvolili bakterie *E. coli* a *S. aureus*. Ukázalo se, že až sto procent koní, u nichž nebyly při příjmu z nosních ani rektálních výtěrů vykultivovány bakterie druhů *E. coli* a *S. aureus* s fenotypem rezistence k širokospektrým betalaktamázám či k meticilinu, bylo propuštěno s pozitivní kultivací. Jak bylo dále zjištěno, v rektálním výtěru 25 % koní z našeho souboru odebraných bezprostředně po přijetí, byly přítomny izoláty ESBL pozitivních *E. coli*. Do prostředí stájí se tedy s největší pravděpodobností dostává s trusem kolonizovaných zvířat značné množství těchto mikrobů a jejich eliminace z prostor kliniky je extrémně obtížná. Je zřejmé, že vyřešení tohoto problému bude vyžadovat rozsáhlá a komplexní

asanační opatření společně s navýšením rutinních úkonů zahrnujících desinfekci/sterilizaci veškerého materiálu a pomůcek, které přichází do kontaktu s hospitalizovanými pacienty.

### Citovaná literatura

Dziubinski, N., Mählmann, K., Lübke-Becker, A., Lischer, Ch. Retrospective Identification of Bacterial Isolates From Emergency Laparotomy Surgical Site Infections in Horses. *J Equine Vet Sci.* 2020;87:102927. doi: 10.1016/j.jevs.2020.102927.

Durward-Akhurst, S.A., Mair, T.S., Boston, R., Dunkel, B. Comparison of two antimicrobial regimens on the prevalence of incisional infections after colic surgery. *Vet Rec.* 2013;172(11):287. doi: 10.1136/vr.101186.

Eugster, S., Schawalder, P., Gaschen, F., Boerlin, P. A prospective study of postoperative surgical site infections in dogs and cats. *Vet Sur.* 2004;33(5):542–550. doi: 10.1111/j.1532-950X.2004.04076.x.

Freeman, D. E., Rotting, A. K., & Inoue, O. J. Abdominal Closure and Complications. In *Clinical Techniques in Equine Practice*, 2002. pp. 174-187.

Gehlen, H., Klein, K.S., Merle, R., Lübke-Becker, A., Stoeckle, et al. colonization with MRSA, ESBL - producing Enterobacteriaceae, and/or Acinetobacter baumannii - increase the risk for postoperative surgical site infection? *Vet Med Sci.* 2023;9(2):729-737. doi: 10.1002/vms3.1073.

Isgreen, C.M., Salem, S.E., Archer, D.C., Worsman, F.C.F., Townsend, N.B. Risk factors for surgical site infection following laparotomy: Effect of season and perioperative variables and reporting of bacterial isolates in 287 horses. *Equine Vet J.* 2017;49(1):39-44. doi: 10.1111/evj.12564.

Isgreen, C.M., Salem, S.E., Townsend, N.B., Timofte, D., Maddox, T.W., et al. Sequential bacterial sampling of the midline in horses undergoing exploratory laparotomy. *Equine Vet J.* 2018;51:38e44. doi.org/10.1111/evj.12958

Isgreen, C.M., Williams, N.J., Fletcher, O.D., Timofte, D., Newton, R.J. et al. Antimicrobial resistance in clinical bacterial isolates from horses in the UK. *Equine Vet J.* 2022;54(2):390-414. doi: 10.1111/evj.13437.

Mair, T., Smith, L. Survival and complication rates in 300 horses undergoing surgical treatment of colic. Part 2: short-term complications. *Equine Vet J.* 2005;37(4):303–309. doi: 10.2746/0425164054529364.

Robson, K., Cripps, P., Bardell, D., Lack of association between arterial oxygen tensions in horses during exploratory coeliotomy and post-operative incisional complications: A retrospective study. *The Veterinary Journal*, 2016; 210, 24-29. ISSN 1090-0233. doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.10.058.

Weese, J.S., Rousseau, J., Willey, B.M., Archambault, M., McGeer, A., et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in horses at a Veterinary Teaching Hospital: Frequency, characterization, and association with clinical disease. *J Veter Inter Med.* 2006;20:182-186. doi: 10.1111/j.1939-1676.2006.tb02839.

Zendri, F., Isgren, C.M., Devaney, J., Schmidt, V., Rachel Rankin, R., et al. Resistome-based surveillance identifies ESKAPE pathogens as the predominant gram-negative organisms circulating in veterinary hospitals. *Front Microbiol.* 2023;14:1252216. doi: 10.3389/fmicb.2023.1252216.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 112/2023/FVL.***



## **Výskyt *Helicobacter* spp. v trávicím traktu psů s příznaky gastrointestinálního onemocnění**

Martin Hošek<sup>1</sup>, Michal Crha<sup>1</sup>, Anna Malá<sup>2</sup>, Miloš Vávra<sup>1</sup>, Michaela Nesvadbová<sup>3</sup> Michaela Simonová<sup>4</sup>, Petra Pušová<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Oddělení vnitřních chorob, Klinika chorob psů a koček, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno, <sup>2</sup> Ústav patologické morfologie a parazitologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno, <sup>3</sup> Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, Fakulta hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, <sup>4</sup> Magisterský studijní program, Fakulta veterinárního lékařství, <sup>5</sup> Magisterský studijní program, Fakulta veterinární hygieny a ekologie

### **Úvod**

Z gastrointestinálního traktu psů bylo doposud izolováno několik různých druhů *Helicobacter* spp. V humánní medicíně byl prokázán vliv *Helicobacter pylori* na rozvoj onemocnění zažívacího traktu mimo jiné i onkologických stavů žaludku. Je publikováno pouze omezené množství studií zabývajících se problematikou vlivu zástupců *Helicobacter* spp. na rozvoj onemocnění zažívacího traktu psů. Předmětem řešení projektu je sledování výskytu jednotlivých druhů *Helicobacter* spp. v gastrointestinálním traktu psů v České republice a zhodnocení jejich potenciálního vlivu na rozvoj patologických lézí GIT.

### **Materiál a metodika**

Do projektu byly zařazeny vzorky od jedinců se zažívacími potížemi. Všichni tito pacienti byly nejprve klinicky vyšetřeni, byli alespoň po dobu 14 dní před odebráním vzorku krmeni veterinární dietou (RC gastrointestinal/RC senzitivity control/RC hypoallergenic/ RC Anallergenic, popříp. ekvivalent od jiné firmy (Hill's, Purina). U všech těchto pacientů bylo provedeno koprologické vyšetření s negativním výsledkem. Dále u těchto pacientů bylo provedeno biochemické a hematologické vyšetření krve a koprologické vyšetření s negativním výsledkem.

Jako negativní kontrola kontrolní skupina byly odebrány vzorky od pacientů Kliniky chorob psů a koček, kteří podstoupili plánované ošetření v celkové anestezii z jiného důvodu (rhinoskopické vyšetření). U těchto pacientů byly vzorky odebrány na základě písemného souhlasu majitele. Před odběrem vzorku u pacientů bylo provedeno klinické vyšetření a biochemické a hematologické vyšetření krve.

V rámci endoskopického vyšetření GIT byly odebrány bioptické vzorky sliznice žaludku a duodena.

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. Od každého jedince byl nejprve proveden oplach sliznice duodena a žaludku pomocí aqua pro injectione pomocí endoskopické oplachové kanyly a následně bylo dále odebráno celkem 4 až 7 bioptátů sliznice žaludku a 3 až 6 bioptátů sliznice duodena pomocí endoskopických bioptických kleštíček.

Část bioptických vzorků byla fixována v 10% pufrovaném formalínu a zpracovány parafínovou technikou. Pro zhodnocení míry kolonizace sliznice spirálovitými bakteriemi morfologicky odpovídajícími *Helicobacter spp.* a přítomnosti a intenzity potenciálních zánětlivých změn ve vyšetřovaných vzorcích byly histologické řezy barvené přehledným barvením hematoxylin-eozinem.

Část bioptických vzorků byla odebrána do aqua pro injectione a dopravena do laboratoře pro následnou extrakci DNA a PCR vyšetření s použitím rodově specifických primerů (C05, C97). Pro extrakci DNA byly provedeny oplachy sliznice žaludku a duodena pomocí endoskopické kanyly.

## Výsledky

Histopatologický nález ve vyšetřovaných řezech bioptátů žaludku zahrnoval normální sliznici, mírnější (hyperémie, subepiteliální hemoragie, ložisková fibróza) až závažnější (ložisková nekróza/ulcerace) alterace sliznice, zánětlivé změny zahrnovaly mírnou až středně výraznou lymfoplasmocytární gastritidu, chronickou aktivní gastritidu a mírnou akutní erozivní gastritidu. V jednom případě byl ve vzorku žaludku zjištěn tubulární adenokarcinom. Přítomnost spirálovitých bakterií morfologicky odpovídajících *Helicobacter spp.* byla zjištěna v osmi z dvanácti (66,67 %) vzorků sliznice žaludku.

Ve vyšetřovaných řezech bioptátů duodena zjištěna ve dvou případech normální sliznice, zánětlivé změny byly v rozsahu od mírné po výraznou lymfoplasmocytární duodenitidu. V žádném vyšetřovaném řezu bioptátů duodena nebyla zjištěna přítomnost spirálovitých bakterií morfologicky odpovídajících *Helicobacter spp.*

Ve vyšetřovaných vzorcích oplachu výsledek detekce PCR přítomnosti *Helicobacter spp.* koreluje s histopatologickým nálezem pozitivních nálezů. Pozitivní určení přítomnosti *Helicobacter*

spp. byl vyšší v případě oplachu sliznice oproti bioptickým vzorkům (66 % oproti 50 %). Oplach sliznice se zdá být vhodnější metodou pro detekci přítomnosti *Helicobacter* spp. Pozitivní PCR nález *Helicobacter* spp. je potřeba korelovat s histologickým nálezem změn GIT pro potřebu vyloučení falešné positivity s ohledem na možnou pasáž *Helicobacter* spp. bez negativního vlivu na zažívací trakt.

Parazitologické vyšetření vyšlo negativní ve všech dvanácti případech.

Případ č.	Plemeno	Pohlaví	Věk	Histopatologický nález		Morfologická přítomnost <i>Helicobacter</i> spp.	
				Žaludek	Duodenum	Žaludek	Duodenum
1	anglický buldok	samec	0,7	hyperémie, subepiteliální hemoragie	normální sliznice	+	-
2	velký švýcarský salašnický	samice	0,7	mírná akutní erozivní gastritida	středně výrazná LP duodenitida	+	-
3	francouzský buldoček	samec	5	mírná LP gastritida	mírná až středně výrazná LP duodenitida	+	-
4	labrador	samec	12	normální sliznice	mírná až středně výrazná LP duodenitida	-	-
5	irský setr	samice	8,6	Ložisková nekróza/ulcerace sliznice pyloru	středně výrazná LP duodenitida	+	-
6	anglický bulteriér	samec	11	mírná chronická aktivní gastritida, tubulární ACA	středně výrazná až výrazná LP duodenitida	-	-
7	toy pudl	samec	3,8	ložisková fibróza sliznice	normální sliznice	+	-
8	labrador	samice	9,5	normální sliznice	mírná LP duodenitida	+	-
9	francouzský buldoček	samec	1,4	ložisková mírná LP gastritida	difúzní středně výrazná LP duodenitida	-	-
10	labrador	samec	2,3	ložisková mírná LP gastritida	difúzní středně výrazná LP duodenitida	+	-
11	kříženec	samec	3,2	normální sliznice	difúzní středně výrazná LP duodenitida	+	-
12	kříženec	samice	6	mírná až ložiskově středně výrazná LP gastritida	ložiskově mírná až středně výrazná LP duodenitida	-	-

Případ č.	Plemeno	Pohlaví	Věk	Parazitologické vyšetření	PCR - OPLACH		PCR - biopsie	
					žaludek	duodenum	žaludek	duodenum
1	anglický buldok	samec	0,7	negativní	+	-	+	-

2	velký švýcarský salašnický	samice	0,7	negativní	+	-	-	-
3	francouzský buldoček	samec	5	negativní	+	-	+	-
4	labrador	samec	12	negativní	-	-	-	-
5	irský setr	samice	8,6	negativní	+	-	+	-
6	anglický bulteriér	samec	11	negativní	-	-	-	-
7	toy pudl	samec	3,8	negativní	+	-	+	-
8	labrador	samice	9,5	negativní	+	-	+	-
9	francouzský buldoček	samec	1,4	negativní	-	-	-	-
10	labrador	samec	2,3	negativní	+	-	+	-
11	kříženec	samec	3,2	negativní	+	-	-	-
12	kříženec	samice	6	negativní	-	-	-	-

### Seznam literatury:

1. Castiglioni, V., Facchini, R. V., Mattiello, S., Luini, M., Gualdi, V., Scanziani, E., & Recordati, C. (2012). Enterohepatic *Helicobacter* spp. in colonic biopsies of dogs: molecular, histopathological and immunohistochemical investigations. *Veterinary microbiology*, 159(1- 2), 107-114.
2. Fox, J. G. (2002). The non-*H pylori* helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut*, 50(2), 273-283.
3. Kiehlbauch, J. A., Brenner, D. J., Cameron, D. N., Steigerwalt, A. G., Makowski, J. M., Baker, C. N., ... & Wachsmuth, I. K. (1995). Genotypic and phenotypic characterization of *Helicobacter cinaedi* and *Helicobacter fennelliae* strains isolated from humans and animals. *Journal of clinical microbiology*, 33(11), 2940-2947.
4. Recordati, C., Gualdi, V., Craven, M., Sala, L., Luini, M., Lanzoni, A., ... & Scanziani, E. (2009). Spatial distribution of *Helicobacter* spp. in the gastrointestinal tract of dogs. *Helicobacter*, 14(3), 180-191.

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 117/2023/FVL*

## Citlivost nejvýznamnějších parodontopatogenů psa k nanočásticím stříbra

Tomáš Fichtel<sup>1</sup>, Alena Šabatová (Pompová)<sup>1</sup>, Nina Čavojová<sup>2</sup>

1 - Oddělení chirurgie a ortopedie, Klinika chorob psů a koček, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno, 2 - Magisterský studijní program – 6. ročník, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno

### Úvod

Onemocnění parodontu je nejčastěji diagnostikovaným onemocněním v klinické praxi psů a koček. Jelikož se zprvu neprojevuje závažnými klinickými příznaky, k jeho řešení často dochází až v pokročilých stavech. Parodontitida může vyústit v oronasální fistuly, endodontické onemocnění, patologické fraktury čelisti, onemocnění očí nebo osteomyelitidu. Parodontální onemocnění ale ovlivňuje i jiné orgánové systémy. Negativně ovlivňuje například funkci ledvin, jater, srdce nebo plic (Niemec, 2008). Parodontální onemocnění je výsledkem interakcí bakterií zubního plaku a imunitního systému pacienta. Bakterie se zachycují a množí v zubním plaku, následně produkují toxiny, které poškozují závěsný aparát zubu. U lidí je hlavním parodontopatogenem bakterie *Porphyromonas gingivalis*. U psů a koček bývá vykultivována *P. gulae* (Fournier, 2001) a další druhy. Imunitní systém hostitele reaguje na přítomnost bakterií vysláním neutrofilů, které bakterie pohlcují a rozkládají. Při tom dochází k uvolňování bakteriálních toxinů a destruktivních enzymů, které nadále přispívají k destrukci parodontu (Reiter and Harvey, 2010). V posledních letech vznikly studie, které zkoumaly složení bakterií v zubním plaku u psů s parodontitidou metodou PCR. Nejčastěji byly prokázány následující bakterie: *Porphyromonas gingivalis* (88-100 %), *Prevotella nigrescens* (57 %), *Porphyromonas gulae* (39 %). Výsledky studií se značně liší v případě bakterie *Tannerella forsythia* (4 % vs. 100 %). Jedna ze studií také zmiňuje výskyt bakterií rodu *Treponema* spp. (64 %), jednalo se o bakterie *Treponema denticola* (28,5 %) a *Treponema putidum* (42,9 %). Soubor těchto bakterií je tedy nyní dáván do souvislosti s parodontitidou psa. Nicméně některé z těchto druhů lze kultivovat také ze psů, kteří nemají klinické příznaky parodontálního onemocnění (Kačírová et al, 2022; Özavci, 2019). Terapií parodontálního onemocnění je profesionální čištění zubů (odstranění supragingiválního i subgingiválního zubního plaku, leštění zubní skloviny) provedené v celkové anestezii veterinárním lékařem. Na to však musí navazovat denní domácí péče ze strany majitele. Jako nejefektivnější se ukázalo denní čištění zubů vhodným

zubním kartáčkem, jehož důsledkem je při pravidelném a řádném provedení redukce zubního plaku. Jedná se tak o prevenci progresu parodontálního onemocnění.

Naše zkušenost z klinické praxe je taková, že majitelé nejsou v preventivním čištění zubů důslední. Pravidelné odstranění zubního plaku nahradit nelze, nicméně rádi bychom samotné čištění doplnili další metodou, která by snahu majitelů podpořila. Nanočástice stříbra mají obecně antiseptický účinek. Jejich roztoky by tedy měly mít inhibiční případně i baktericidní účinek na bakterie kolonizující dutinu ústní psa, včetně těch, které považujeme za parodontopatogeny.

### **Materiály a metodika**

#### *(i) Studie výskytu bakterií, které jsou považovány za parodontopatogeny.*

U obou skupin (psi trpící parodontitidou a psi bez klinických příznaků parodontitidy) byly odebrány vzorky zubního plaku sterilními papírovým čepý a tampony a byly přeneseny do 0,5 ml redukovaného pufru ve zkumavce typu Eppendorf. V pufru byly vzorky po dobu 1 minuty homogenizovány intenzivním třením tamponu o stěnu zkumavky a do 30 minut byly přeneseny ke kultivačnímu vyšetření, které probíhalo v anaerobním boxu. Jeden díl vzorku byl v anaerobním boxu přenesen do sterilní redukované plastové zkumavky a následně zamražen a uchováván při -80 °C pro zjištění druhového zastoupení bakterií metagenomickým vyšetřením. Druhý díl vzorku byl zpracován kultivačně s využitím selektivních anaerobních agarů vhodných k izolaci bakterií z rodu *Porphyromonas* a *Prevotella*. Získané izoláty byly subkultivovány, identifikovány hmotnostní spektrometrií MALDI TOF (Bruker, Německo) a uchovány v anaerobním kryoprotektivním médiu při -80 °C pro další analýzy. Z uchovaných vzorků byla pomocí NucleoSpin®Tissue Kit (Roche) izolovaná DNA. Tato byla následně použita jako templát pro RT PCR. Pro každý vzorek bylo připraveno 5 PCR – jedna pro každý druh bakterie. RT PCR následně proběhla v LightCycler® 480 (Roche).

#### *(ii) Stanovení citlivosti izolátů vůči nanočásticím stříbra in vitro*

Vybrané izoláty bakterií z rodu *Porphyromonas* a *Prevotella* jsou testovány mikrodiluční metodou na citlivost vůči nanočásticím stříbra. Ke stanovení citlivosti jsou využity metodiky mikrodilučního stanovení MIC a MBC (VET01, CLSI, 2020). Výchozí roztok nano stříbra (5000 p.p.m.) ve Wilkins-Chalgrenově bujónu (Oxoid, VB) v redukovaných mikrotitračních destičkách a zaočkován multiinokulátorem na denzitu  $1 \times 10^5$  KTJ příslušného bakteriálního kmene včetně typového kmene

*Porphyromonas gingivalis*. Hodnoty MIC budou odečteny jako nejnižší koncentrace potlačující množení testované kultury.

(iii) Stanovení citlivosti ke koloidnímu roztoku nanočástic stříbra *in vivo*

Majitelé psů, u kterých byl takto vzorek odebrán, aplikovali po adekvátním parodontálním ošetření komerční mukoadhezivní gel podle instrukcí příbalového letáku. Kontrolní stěr dásní a zubů za účelem ověření přítomnosti sledovaných parodontopatogenů metodou RT PCR byl proveden po 4 týdnech.

## Výsledky

Celkem bylo prozatím otestováno 25 psů obou pohlaví, různého věku a patřícím k různým plemenům (20 s parodontitidou, 5 bez klinických příznaků). Testy některých odebraných vzorků pro dlouhodobou kultivaci zatím ještě probíhají a nemohly být vyhodnoceny.

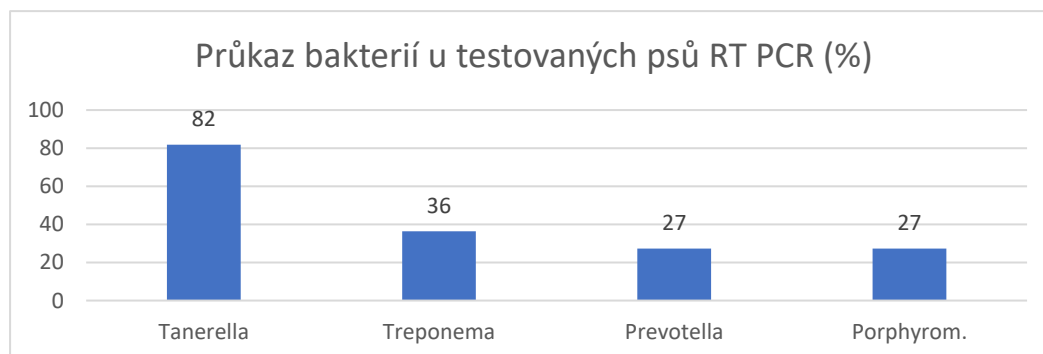
Majitelé psů ze skupiny s onemocněním parodontu, kteří souhlasili s účastí na tomto projektu, aplikovali po adekvátním parodontálním ošetření psa komerční mukoadhezivní gel podle instrukcí příbalového letáku. Kontrolní stěr dásní a zubů za účelem kultivačního průkazu parodontopatogenů byl proveden po 4 týdnech, pokud se dostavili na přislíbenou kontrolu.

Hodnocení výsledků stanovení citlivosti izolátů vůči nanočásticím stříbra *in vitro* nebylo doposud ukončeno. Komerčně vyráběné mukoadhezivní gely obsahují 0,02 % nanočástic stříbra.

Kultivačně se podařilo u psů s parodontálním onemocněním prozatím prokázat přítomnost *Porphyromonas gulae*, *Porphyromonas macacae*, *Prevotella nigrificans* a *Veilonella parvula*. U části psů s parodontálním onemocněním kultivace námi hledané bakterie neodhalila. Kvantifikace při kultivaci naznačuje, že se zvyšujícím se stupněm parodontitidy, se také zvyšuje počet bakterií daného druhu. U kontrolní skupiny byla provedena kontrola metodou RT PCR.

Metodou RT PCR jsme ve vzorcích vyšetřovali přítomnost bakterií *Tanerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella nigriscens* a bakterie rodu *Porphyromonas*. Výskyt bakterie *Tanerella forsythia* byl prozatím potvrzen u 18 pacientů (14 psů s parodontálním onemocněním, 4 psi z kontrolní skupiny). Po aplikaci gelu bylo vyšetření prozatím zopakováno u 4 pacientů. U všech se tato bakterie v dutině ústní nadále vyskytovala. Přítomnost bakterie *Treponema denticola* byla metodou RT PCR zjištěna prozatím u 8 testovaných psů (7 psů s parodontálním onemocněním, 1 pes z kontrolní skupiny) z nichž kontrolní odběr doposud absolvoval jeden pes – s negativním výsledkem. *Prevotella nigriscens* byla detekována u 6 psů (5 psů s parodontálním onemocněním, 1 pes z kontrolní skupiny).

Na kontrolní odběr se z těchto psů prozatím dostavil 1–s negativním výsledkem. Bakterie z rodu *Porphyromonas* byly metodou PCR detekovány u 6 psů (5 psů s parodontálním onemocněním, 1 pes z kontrolní skupiny). Vyšetření kontrolních stěrů pozitivních psů prozatím nemáme k dispozici.



### Závěr

U všech psů, kteří trpí parodontálním onemocněním se nám kultivačně, nebo pomocí PCR podařilo potvrdit přítomnost bakterií, které dle aktuální literatury mohou parodontitidu způsobovat. Se zvyšujícím se stupněm parodontitidy pozorujeme ve výsledcích zvyšující se počet kolonií stanovených bakterií (kultivace). U psů trpících parodontitidou pozorujeme častěji kombinace více sledovaných bakterií. Pokud se tyto bakterie objevili v kontrolní skupině, jednalo se většinou o nález pouze jednoho sledovaného druhu. V případě jednoho psa z kontrolní skupiny se vyskytovaly dva různé druhy bakterií. Nanočástice stříbra se v dekolonizaci těchto bakterií z dutin ústní psů jeví slibně, nicméně potřebujeme více času pro odběr kontrolních vzorků (náročnost kultivace) a nasbírání více pacientů do studie. Pouze bakterie *Tanerella forsythia* se po aplikaci stále vyskytovala ve všech kontrolních vzorcích a použití nanočástic stříbra na její odstranění z dutiny ústní nejspíš nemá vliv.

### Seznam literatury

- Özavci V, Erbas G, Parin U, Yüksel HT, Kirkan Ş. Molecular detection of feline and canine periodontal pathogens. *Vet Anim Sci.* 2019 Aug 27;8:100069. doi: 10.1016/j.vas.2019.100069. PMID: 32734086; PMCID: PMC7386636.
- Kačírová J, Sondorová M, Mađari A, Styková E, Mucha R, Nemcová R, Marečáková N, Farbáková J, Mađar M. Detection of Periodontal Pathogens from Dental Plaques of Dogs with and without Periodontal Disease. *Pathogens.* 2022 Apr 17;11(4):480. doi: 10.3390/pathogens11040480. PMID: 35456155; PMCID: PMC9032899.
- Niemiec BA. Periodontal disease. *Top Companion Anim Med.* 2008 May;23(2):72-80. doi: 10.1053/j.tcam.2008.02.003. PMID: 18482707.
- BSAVA manual of canine and feline dentistry and oral surgery / editors: Alexander M. Reiter, Margherita Gracis. Fourth edition. Quedgeley, Gloucester : British Small Animal Veterinary Association, 2018. vi, 384 stran : ilustrace (převážně barevné); 30 cm (BSAVA manuals series) ISBN:978-1-905319-60-2

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 113/2023/FVL.***



# Možnosti přímého a nepřímého průkazu alfaherpesviru koní 1 a mapování výskytu reaktivací viru v souvislosti s přidruženými infekcemi dýchacích cest

Dobromila Molinková<sup>1</sup>, Eva Šamonilová<sup>2</sup>, Veronika Soprová<sup>3</sup>, Tereza Linková<sup>3</sup>, Dominika Polcrová<sup>3</sup>

*Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno<sup>1</sup>,  
Klinika chorob koní, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno<sup>2</sup>, Studentky MSP (6.  
ročník, 5. ročník), Veterinární univerzita Brno<sup>3</sup>*

## Úvod

Alfaherpesviry koní jsou ubikvitárně rozšířené. Nejzávažnější je Equine herpesvirus-1 (EHV-1), který způsobuje respirační onemocnění, neurologické poruchy a aborty. Herpesviry přecházejí do stádia latentní infekce, z tohoto důvodu je jejich eradikace z koňské populace nepravděpodobná (Khusro et al., 2020). U latentně infikovaných koní dochází k periodické reaktivaci viru v důsledku stresu nebo gravidity a tím představují riziko pro ostatní vnímavé jedince (OIE, 2018). Gamaherpesviry koní jsou rozšířeny celosvětově (Hartley et al., 2013) a mohou způsobovat různá onemocnění dýchacích cest i asymptomatickou infekci. To komplikuje jednoznačné zařazení těchto virů mezi patogeny (Landolt, 2019). Onemocnění způsobená mykoplazmaty jsou u koní poměrně vzácná. Druh *Mycoplasma felis* může způsobovat onemocnění dýchacích cest u koní (Kinoshita et al., Cuomo, 2020).

Přímý průkaz v podobě PCR (polymerázová řetězová reakce) se stal velmi využívanou diagnostickou metodou pro EHV a *Mycoplasma felis* (Söderlund et al., 2011) díky své vysoké citlivosti a specificitě. Odebírá se nosní stěr nebo nasofaryngeální laváž (Davis, 2018), krev nebo tkáň (Slater, 2014).

Pro nepřímý průkaz v podobě testů pro detekci protilátek proti EHV-1/4 lze použít virus neutralizační test (VNT), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) a komplement fixační test (CFT). Jednotná, mezinárodně standardizovaná technika provádění sérologických metod pro detekci protilátek proti EHV-1/4 není popsána (OIE, 2018).

Cílem práce bylo sledovat výskyt equinních herpesvirů a *Mycoplasma felis* v populaci koní na území ČR pomocí přímého průkazu s akcentem na výskyt EHV-1 a srovnat výskyt v jednotlivých skupinách. Cílem sérologické části práce bylo optimalizovat VNT, zavést metodiku na pracovišti virologie ÚICHM a porovnat jej s diskriminační a nediskriminační ELISA. Pomocí zmíněných testů pak zjistit séroprevalenci a odvodit frekvenci reaktivace EHV-1/4.

## Materiál a metodika

Vzorky byly odebrány od 3 skupin koní (n=240). První skupinu tvořili koně hospitalizovaní na Klinice chorob koní na Veterinární univerzitě Brno (VETUNI Brno) (n=121). Druhou skupinu tvořili koně reprezentující běžnou populaci koní (n=80). Třetí skupinu tvořili koně ze soukromé stáje v

Praze, kde došlo k outbreaku EHV-1 (n=78, 39 párových vzorků). U všech koní byla zaznamenána informace o jejich pohlaví, věku, očkování a plemeni.

Přímým průkazem bylo testováno 201 vzorků od 163 koní. Pro extrakci DNA z tamponových nosních stěrů a nesrážlivé krve byl použit komerční kit NucleoSpin Blood DNA (Marcherey-Nagel, Německo). Následně byla provedena real-time PCR. Vzorky byly testovány na přítomnost DNA virů EHV-1, 2, 4, 5 a bakterie *Mycoplasma felis*. Příprava reakčních směsí probíhala dle návodu výrobce (Luna Universal Probe, NEB, USA). Nepřímým průkazem bylo vyšetřeno 86 koní. VNT byl prováděn v 96 jamkových destičkách. Vyšetřované plazmy byly inaktivovány a v triplicátech dvojnásobně naředěny v kultivačním mediu DMEM (Sigma-Aldrich, USA), následovala hodinová inkubace s 500 TCID<sub>50</sub> (poloviční infekční dávka) viru EHV-1 a pak třídní inkubace (37 °C/5 % CO<sub>2</sub>) s buňkami MDBK (Madin-Darby bovine kidney). Po fixaci a obarvení buněk krystalovou violetí byla stanovena ND<sub>50</sub> (poloviční neutralizační dávka). Plazmy byly rovněž vyšetřeny testem ELISA SVANOVIR® EHV1/EHV4-Ab (Svanova, Švédsko) a testem ELISA Ingezim Rinopneumonitis 480 (Ingenasa, Španělsko) dle návodu výrobce.

## Výsledky

Přímým průkazem (Tab. č. 1) byla nejčastěji prokázána aktivní infekce EHV-5, pak EHV-2, *Mycoplasma felis*, EHV-4 a nejméně EHV-1 (pouze u jednoho koně bez koinfekce: valach, platně očkovaný, 4-letý, anglický plnokrevník, hospitalizace - ortopedie). Vakcinovaní koně vykazují nižší záchyt herpesvirů, ale vyšší záchyt *Mycoplasma felis* v porovnání s nevakcinovanými.

**Tabulka č. 1: Výsledky přímého průkazu (PCR)**

Testovaná infekce	Výsledek	Výsledek (počet koní)			Výsledek (%)		
		Celkem	Nevakcinovaný	Vakcinovaný	Celkem	Nevakcinovaný	Vakcinovaný
EHV-1	negativní	162	72	90	99,4	100	98,9
	pozitivní	1	0	1	0,6	0	1,1
EHV-2	negativní	127	49	78	77,9	68,1	85,7
	pozitivní	36	23	13	22,1	31,9	14,3
EHV-4	negativní	159	69	90	97,5	95,8	98,9
	pozitivní	4	3	1	2,5	4,2	1,1
EHV-5	negativní	99	40	59	60,7	55,6	64,8
	pozitivní	64	32	32	39,3	44,4	35,2
MF	negativní	152	70	82	93,3	97,2	90,1
	pozitivní	11	2	9	6,7	2,8	9,9

Byla prokázána významná korelace mezi věkem nad 15 let a výskytem EHV-5. Virus EHV-2 se vyskytoval významně častěji u koní nevakcinovaných proti EHV-1/4. U hospitalizovaných koní byl zvýšený záchyt všech sledovaných EHV. Záchyt *Mycoplasma felis* byl srovnatelný u zdravých i hospitalizovaných koní.

Metodami nepřímého průkazu byla prokázána vyšší séroprevalence EHV-4 než 1 (Tab. č. 2).

**Tabulka č. 2: Séroprevalence viru EHV-1 a EHV-4 v populaci českých koní – diskriminační ELISA**

	Počet vyšetřených koní	Séroprevalence EHV-1	Séroprevalence EHV-4
SVANOVIR®	86	30,20 %	87,20 %

Vyšetření párových sér ze stáje s propuknutím neurologického onemocnění po infekci EHV-1 (Tab. č. 3) potvrdilo dostatečnou sérokonverzi pouze u jednoho koně, pouze ve VNT.

**Tabulka č. 3: Stáj s herpesvirovou myeloencefalopatií – sérokonverze**

	VNT	Ingezim Rinopneumonitis	SVANOVIR® EHV-1	SVANOVIR® EHV-4
Sérokonverze 1-1,49	32	19	5	7
Sérokonverze 1,5-3,49	3	7	3	1
Sérokonverze 3,5<	1	0	0	0

Z vyzkoušených sérologických testů byl na základě bodového hodnocení (Tab. č. 4) vybrán pro další použití na řešitelském pracovišti test Ingezim Rinopneumonitis 480 (Ingenasa, Španělsko).

**Tabulka č. 4: Zhodnocení testů pro nepřímý průkaz**

	Pracnost	Čas	Cena párový test	Specifičnost	Opakovatelnost výsledku	Výsledek
VNT	4	2 (2 h)	1 (53 Kč)	2	3	12
Ingezim Rinop.	2	2 (2,5 h)	2 (176 Kč)	3	2	11
SVANOVIR®	2	4 (4 hod)	5 (2630 Kč)	1	2	14

Při porovnání výsledků použitých sérologických testů byla konstatována nejlepší shoda mezi testem Ingezim Rinopneumonitis 480 a VNT (Tab. č. 5)

**Tabulka č. 5: Korelace výsledků testů pro nepřímý průkaz**

	Ingezim Rinopneumonitis	VNT	SVANOVIR® EHV-1	SVANOVIR® EHV-4
Ingezim Rinop.		p<0,01	p>0,05	p<0,01
VNT	p<0,01		p<0,05	p<0,05
SVANOVIR® EHV-1	p>0,05	p<0,05		p>0,05
SVANOVIR® EHV-4	p<0,01	p<0,05	p>0,05	

Při použití testu Ingezim Rinopneumonitis (Tab. č. 8.) byla zjištěna séropozitivita EHV-1/4 častěji u vakcinovaných než u nevakcinovaných koní. Testování pomocí SVANOVIR® EHV-1 a SVANOVIR® EHV-4 prokázalo (Tab. č. 8), že všichni koně vakcinovaní proti EHV-1/4 mají protilátky proti EHV-4. To ovšem neplatí pro EHV-1, kde je vyšší počet pozitivních ve skupině neočkovaných.

**Tabulka č. 6: Procentuální zastoupení pozitivních výsledků ve skupinách vakcinovaných a nevakcinovaných koní: test Ingezim Rinopneumonitis, testy SVANOVIR® EHV-1 a SVANOVIR® EHV-4**

	Celkový počet vzorků – test Ingezim Rinopneumonitis	Pozitivní výsledek Ingezim Rinopneumonitis	Celkový počet vzorků – testy SVANOVIR® EHV-1, EHV-4	Pozitivní výsledek SVANOVIR® EHV-1	Pozitivní výsledek SVANOVIR® EHV-4
Vakcinovaní koně	73	63,01 %	49	26,53 %	100,00 %
Nevakcinovaní koně	111	26,13 %	37	35,14 %	70,27 %

## Závěr

Předmětem prezentované práce bylo sledování výskytu herpesvirů koní (1, 2, 4, 5) a *Mycoplasma felis* v populaci koní na území ČR pomocí přímého a nepřímého průkazu s důrazem na výskyt EHV-1. Ten byl metodou přímého průkazu detekován pouze u jednoho koně (0,6 %). Naopak u gamaherpesvirů bylo prokázáno, že jejich aktivní přítomnost na sliznicích dýchacích cest koní je častá (61,4 %). Všechny sledované herpesviry se vyskytovaly častěji u hospitalizovaných koní. Zklamáním byly nízké postvakační titry protilátek proti EHV-1 u koní vakcinovaných v posledním půl roce proti EHV-1/4. Pro další pokračování sérologické diagnostiky na ÚICHM, FVL, VETUNI Brno byl díky tomuto projektu vybrán pomocí několika hodnotících kritérií nediskriminativní test ELISA.

### Seznam literatury

1. DAVIS, Elizabeth, 2018. Disorders of the Respiratory System. In: REED, Stephen M; BAYLY, Warwick M a SELLON, Debra C. Equine Internal Medicine. Fourth edition. USA: Saunders, s. 313-386. ISBN 978-0-323-44329-6.
2. HARTLEY, Carol A.; DYNON, Kemperly J.; MEKURIA, Zelalem H.; EL-HAGE, Charles M.; HOLLOWAY, Steven A. et al., 2013. Equine gammaherpesviruses: perfect parasites? Online. Veterinary Microbiology. Č. 167, s. 86-92. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.05.031>.
3. KHUSRO, Ameer; AARTI, Chirom; RIVAS-CACERES, Raymundo Rene a BARBAROSA-PLIEGO, Alberto, 2020. Equine Herpesvirus-I Infection in Horses: Recent Updates on its Pathogenicity, Vaccination, and Preventive Management Strategies. Journal of Equine Veterinary Science. Č. 87, s. 1-2. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.102923>
4. KINOSHITA, Yuta; NIWA, Hidekazu; UCHIDA-FUJII, Eri a NUKADA, Toshio, CUOMO, Christina A. (ed.), 2020. Complete Genome Sequence of Mycoplasma felis Strain Myco- 2, Isolated from an Equine Tracheal Wash Sample in Japan. Online. Microbiology Resource Announcements. Č. 9, article 9. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/MRA.00057-20>.
5. LANDOLT, Gabriele A., 2019. Equine Respiratory System: Equine Respiratory Viruses. In: SMITH, Bradford P.; VAN METRE, David C. a PUSTERLA, Nicola. Large Animal Internal Medicine. Sixth Edition. Saunders, s. 526-636. ISBN 978-0-323-55445-9.
6. OIE, 2018. Equine Rhinopneumonitis (Infection with Equid Herpesvirus-1 and -4). In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 8th Edition. S. 1320–1322. ISBN 978-92-95108-18-9.
7. SLATER, John, 2014. Equine Herpesviruses. In: SELLON, Debra C. a LONG, Maureen T. Equine Infectious Diseases. Second Edition. Saunders, s. 151-168. ISBN 9781455751150.
8. SÖDERLUND, Robert; BÖLSKE, Göran; HOLST, Bodil Ström a ASPÁN, Anna, 2011. Development and evaluation of a real-time polymerase chain reaction method for the detection of Mycoplasma felis. Online. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. Č. 23, article 5, s. 890-893. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1040638711407479>. [cit. 2023-11-01].

**Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 114/2023/FVL.**

## **Diagnostika a terapie respiračních onemocnění u potkanů chovaných ze záliby**

Anna Piskovská<sup>1,2</sup>, Vladimír Jekl<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Ústav farmakologie a farmacie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno,*

<sup>2</sup>*Veterinární Klinika Jekl & Hauptman, Mojžírovo náměstí 6a, Brno*

### **Úvod**

Respirační onemocnění patří mezi nejčastější onemocnění, se kterými se setkáváme u potkanů chovaných ze záliby. Plicní léze až abscesy jsou důsledky závažné infekce, která vede k destrukci respiračních buněk a fibrózní tkáně. Diagnóza respiračních onemocnění může být vyslovena na základně anamnézy a klinického vyšetření. Auskultace hrudníku obvykle odhalí šelesty až vrzoty (Benato, 2012). Bez podrobnějšího zobrazovacího vyšetření ale není možné odhalit původ onemocnění a v případě průkazu infekčního původu je nezbytné identifikovat původce pro zvolení efektivní terapie.

Rentgenogramy hrudníku jsou obvykle považovány jako zásadní krok v diagnostice plicního onemocnění, nicméně toto vyšetření má své limity (Reissig a kol., 2012). Vyšetření pomocí počítačové tomografie bývá nazýváno zlatým standardem, nicméně stejně jako pro rentgenologické vyšetření dutiny hrudní je i pro toto vyšetření nezbytné uvést pacienta do celkové anestezie. Hrudní sonografie se v posledních letech stává metodou volby pro dyspnoické pacienty vzhledem k její diagnostické přesnosti, neinvazivitě a opakovatelnosti. Výsledky srovnávacích studií přikládají hrudní sonografii stejný význam jako počítačové tomografii (Nazerian a kol., 2015, Lovrenski a kol., 2016, Ma a kol., 2016, Mathis, 2018, Mayo a kol., 2019, Najgrodzka a kol., 2019).

Bronchoalveolární laváž (BAL) je velmi užitečný diagnostický prvek pro diagnostiku plicních onemocnění. Odebraná tekutina obsahuje biochemické a cytologické indikátory buněčné odpovědi na infekci a v neposlední řadě patogeny zapříčínující dané onemocnění (Song a kol., 2010).

### **Materiál a metodika**

Do studie bylo zařazeno 250 potkanů, u kterých bylo provedeno vyšetření metodou RATTUS (Rat thoracic ultrasound). Vyšetřovaná zvířata vážila od 97 g do 885 g (průměr±SD 465±125,24 g) a jejich věk se pohyboval v rozmezí od 3 do 29 měsíců (21±3,6 měsíců).

RATTUS byl proveden bez celkové anestezie. Za využití multifrekvenční sondy (SonoScape S22, 8-14 MHz) bylo provedeno skenování obou hemithoraxů, které byly rozděleny na dvě linie – od axilární linie po skapulární linii a druhá od skapulární linie po paravertebrální svaly. Následně bylo

provedeno hodnocení substernálním přístupem. Srst pacientů nebyla holena, kontakt sondy s povrchem byl zajištěn dostatečným množstvím sonografického gelu.

Mezi znaky pneumonie byly zařazeny typické sonograficky zobrazitelné znaky: nálezy konsolidací, C linií, B linií, znak zmačkaného papíru (shred sign), případně přítomnost pleurální efuze nebo translobární konsolidace včetně hodnocení vzduchového/s tekutinou/dynamického/statického bronchogramu.

U 16 z těchto zvířat (8 samic, 8 samců; hmotnost od 330 g do 720 g průměr±SD 526.9±109.25 g, stáří od 9 do 29 měsíců 16.6±7.5 měsíců) bylo dle pozitivního sonografického průkazu pneumonie provedeno BAL, hematologické a sérologické vyšetření. Tato zvířata byla uvedena do celkové inhalační anestezie isofluranem (Isoflutek 1000 mg/g, Laboratorios Karizoo, S.A., Španělsko). Nejprve byl proveden odběr 0,4 ml krve z *vena cava cranialis*, která byla umístěna do sterilní zkumavky s EDTA (Idexx, Německo) k hematologickému vyšetření. Dalších 0,6 ml krve bylo odebráno do sterilní zkumavky bez antikoagulans, centrifugováno a získané sérum bylo udržováno zamražené (-18°C) do sérologického vyšetření v laboratoři (Anlab, Česká republika). Zde byly vyšetřeny následující parametry: RCV/SDAV, RTV, KRV, H-1, RPV, RMV, NS-1, SEND, MAD 1+2, REO3, PVM, HANT, CARB, MPUL, IFA PCAR, IFA MPUL. Následně byl použit sterilní močový katetr (Sterilní kočičí katetr 1,0x110 mm, Polnet, Polsko), který byl pod otoskopickou kontrolou umístěn do trachey a následně do plic a bylo aplikováno 0,2 ml temperovaného fyziologického roztoku, který byl několikrát aspirován zpět a opět aplikován. Během této procedury byla anestezie ukončena, aby na konci BAL docházelo k probouzení pacienta a ten mohl případně snadno vykašlat reziduální obsah fyziologického roztoku. Následovala post-oxygenace do úplného probuzení.

Vzorek BAL byl umístěn do sterilní zkumavky bez antikoagulans a odeslán pro provedení mikrobiologického vyšetření včetně antibiogramu. Část vzorku byla aplikována na selektivní média (ClearMilk test, LabMediaServis s.r.o., Česká republika) pro ozkoušení rychlejších varianty in-house výsledků. Kultivace a antibiogram byly provedeny akreditovanou laboratoří (SynLab, Česká republika).

### Výsledky

Bakterie, které byly vykultivovány z BAL jsou prezentovány v tabulce (Tab. 1), a to včetně jejich citlivosti na antibiotika.

*Staphylococcus aureus* byl nalezen u 4/16 (25 %) potkanů, 1/16 (6.25 %) byl Meth/Oxa rezistentní. *Rodentibacter rattii* byl nalezen u 3/16 (18.75 %) potkanů, *Muribacter muris* byl nalezen u 3/16 (18.75 %) potkanů, *Corynebacterium mastitidis* bylo nalezeno u 1/16 (6.25 %) potkanů, *Corynebacterium iowii* bylo nalezeno u 1/16 (6.25 %) potkanů, *Corynebacterium tuberculostearicum*

bylo nalezeno u 1/16 (6.25 %) potkanů, *Streptococcus suis* byl nalezen u 2/16 (12.5 %) potkanů, *Streptococcus intermedius* byl nalezen u 1/16 (6.25 %) potkanů, alpha-hemolytický *Streptococcus* byl nalezen u 1/16 (6.25 %) potkanů, *Streptococcus mitis* byl nalezen u 1/16 (6.25 %) potkanů, *Haemophilus haemolyticus* byl nalezen u 1/16 (6.25 %) potkanů, *Enterobacter kobei* byl nalezen u 1/16 (6.25 %) potkanů, *Enterobacter hormaechei* byl nalezen u 1/16 (6.25 %) potkanů, *Enterococcus faecalis* byl nalezen 2/16 (12.5 %) potkanů, *Brevundimonas diminuta* byla nalezena u 1/16 (6.25 %) potkanů, *Acinetobacter sp.* byl nalezen u 3/16 (18.75 %) potkanů, *Neisseria flavescens* byla nalezena u 2/16 (12.5 %) potkanů a *Escherichia coli* byla nalezena u 7/16 (43.75 %) potkanů.

U 9/16 (56 %) zvířat byla přítomna koinfekce několika bakteriemi.

Zlepšení zdravotního stavu po zacílené antibiotické terapii bylo prokázáno u 14/16 zvířat (87,5 %), 1/16 (6,25 %) zvíře bylo utraceno před kontrolou. U 7/16 (43,8 %) potkanů pomohla BAL zacílit antibiotika po neúspěšné předchozí antibiotické terapii „na slepo“.

Nálezy RATTUS nebyly specifické pro daná bakteriální onemocnění, ale závažnost typických znaků pneumonie souhlasila se závažností nálezů BAL. U 3/16 (18,75 %) případů s mírnými příznaky pneumonie, kde byla BAL provedena po předchozí antibiotické terapii, byl zaznamenán pouhý mírný nárůst bakterií, což odpovídá nálezů „hojící se“ pneumonie.

Z výsledků sérologického vyšetření dominovala přítomnost protilátek proti *Mycoplasma pulmonis* (MPUL; 17/18, 94,4 % testovaných zvířat), cilia-associated respiratory bacillus (CARB; 18/18, 100 % testovaných zvířat), a *Pneumocystis carinii* (PCAR; 17/18, 94,4 % testovaných zvířat). U 11/18 (61,1 %) zvířat byl nález pozitivní pro Rat theilovirus (RTV), ostatní výsledky jsou shrnuty v Tab. 2.

**Tab. 1:** Výsledky kultivace bakterií včetně antibiogramu

BAKTERIE	OXACILIN	CLINDAMYCIN	TETRACYCLIN	CEFUROXIM	MARBOFLOXACIN	ERYTHROMYCIN(AZATHROMYCIN)	TRIMETHOPRIM+SULFADIAZIN	AMOXICILIN	ENROFLOXACIN	GENTAMICIN	PENICILIN	CHLORAMFENIKOL	BACITRACIN
Staphylococcus aureus	C	C	C	C	C	C	C	C	C		R		
	C	C	C	C	C	C	C	C	C		R		
	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C			
MRSA	R	R	R		R	R	C		R	R		C	C
Rodentibacter rattii			R	C	R	R	C	C	R				
			C	C	C	R		C	C		R		
			R	C	C		C	C	C	C	R		
Muribacter muris			C	C	R		C	C	R		R	C	R
			C	C	C	I	C	C	C	C	R	C	
			R	C	C		C	C	C	C	C		

Cornebacterium mastitidis		C	C		R				R		R		
Corynebacterium iowii		R	R		R		C	C	R		R	c	c
Streptococcus suis		C	R		C	C	C		C		C		
		R	C		C	C	C		C		C		
Streptococcus intermedius		C	C	C	C	C	C	C	C		C	C	R
Streptococcus hyointestinalis		R	R		R	R	C		R	R	c	C	
		C	C		R	C	C	C	R	R	C	C	C
		C	C	C	R	C	C	C	R	R	C		
Streptococcus mitis		C	C		R	C	C		R	R		C	
Haemophilus haemolyticus			C	C	C	I	C	I	C	C		C	
Enterobacter kobei			I	R	C		C	R	C				
Enterobacter hormaechei			C	R	C		C	R	C				
Enterococcus faecalis			C		C				C				
			R		R			C	R	C		C	C
Brevundimonas diminuta			C	C	C		C	C	C				
Acinetobacter sp.					C		C		C	C			
					C		C		C	C			
			R	R	C		C	R	C		R		
Neisseria flavescens													
			C	C	C	R	R	C	I	C		C	
E. coli			R	C	C		C	C	C				
			C	C	C		C	C	C				
			C	C	C		C	C	C				
			C	C	C		C	C	C				
			C	C	C		C	C	C	C		C	R
	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C		
	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C		



**Tab. 2:** Výsledky sérologického profilu (RCV – rat coronavirus, RTV – rat theilovirus, KRV – Kilham rat virus, RPV – rat parvovirus, RMV – rat murine virus, NS-1 protein parvoviru, SEND – sandai virus, MAD 1+2 – mouse adenovirus, REO 3 – reovirus, PVM – pneumonia virus of mice, HANT – hantaan virus, CARB – cilia-associated respiratory bacillus, MPUL – *Mycoplasma pulmonis*, PCAR – *Pneumocystys carinii*)

	RCV/SDA V	RT V	KR V	RP V	RM V	NS- 1	SEN D	MA D 1+2	REO 3	PV M	HAN T	CAR B	MPU L	PCA R
počet pozitivních pacientů	0	11	0	1	4	3	0	1	0	0	0	18	17	17

### Závěr

Prezentovaná studie prokázala, že RATTUS je efektivní diagnostickou metodou v klinické medicíně potkanů pro diagnostiku respiračních onemocnění. BAL a serologické vyšetření krve patří mezi zásadní diagnostické kroky při diagnostice pneumonie, a to především díky přesnému mikrobiologickému průkazu a stanovení antibiogramu a tím zacílení antibiotické terapie. Využití „in-house“ diagnostiky se zdá být jako nepříliš dobrá varianta vzhledem k velké variabilitě jednotlivých bakterií co se týče rezistence na antibiotika.

### Seznam použité literatury:

1. Benato, L. (2012) respiratory diseases in rats. *Companion Animals*.17:47-50.
2. Lovrenski, J., Petrović, S., Balj-Barbir, S., Jokić, R., & Vilotijević-Dautović, G. (2016). Stethoscope vs. ultrasound probe-which is more reliable in children with suspected pneumonia?. *Acta Med Acad*, 45(1), 39-50.
3. Ma, H., Huang, D., Guo, L., Chen, Q., Zhong, W., Geng, Q., Zhang, M. (2016) Strong correlation between lung ultrasound and chest computerized tomography imaging for the detection of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome in rats. *J Thorac Dis.*;8:1443-8.
4. Mathis, G. (2018). Pneumonia: Does ultrasound replace chest X-ray?. *Praxis*, 107(23), 1283-1287.
5. Mayo, P. H., Copetti, R., Feller-Kopman, D., Mathis, G., Maury, E., Mongodi, S., ... & Zanobetti, M. (2019). Thoracic ultrasonography: a narrative review. *Intensive care medicine*, 45, 1200-1211.

6. Nazerian P, Volpicelli G, Vanni S, Gigli C, Betti L, Bartolucci M, Zanobetti M, Ermini FR, Iannello C, Grifoni S (2015) Accuracy of lung ultrasound for the diagnosis of consolidations when compared to chest computed tomography. *Am J Emerg Med* 33:620–625
7. Najgrodzka, P., Buda, N., Zamojska, A., Marciniwicz, E., & Lewandowicz-Uszynska, A. (2019). Lung ultrasonography in the diagnosis of pneumonia in children—a metaanalysis and a review of pediatric lung imaging. *Ultrasound quarterly*, 35(2), 157-163.
8. Reissig A, Copetti R, Mathis G, Mempel C, Schuler A, Zechner P, Aliberti S, Neumann R, Kroegel C, Hoyer H. (2012) Lung ultrasound in the diagnosis and follow-up of community-acquired pneumonia: a prospective, multicenter, diagnostic accuracy study. *Chest*. 142:965-972.

### **Již vydané publikace a aktivní účast řešitele na konferenci**

#### **Publikace v odborných časopisech**

Piskovská A., Hauptman K., Jekl V. Ultrasonografické vyšetření pleurálního prostoru a plic u potkanů. *Veterinářství* 2023;73(6):309-319.

#### **Fulltexty ve sbornících**

Piskovská A., Jekl V., Hauptman K. Zobrazovací metody při diagnostice onemocnění dutiny hrudní u potkanů. Anestézie, analgezie a zobrazovací metody u drobných savců. Sborník Vefair 2023 pro malou praxi (ISBN 978-80-87157-31-2), Hradec Králové 14.-15. 4.2023, 2023:222-225 (věnováno IGA VETUNI 105/2023/FVL)

#### **Aktivní účast na konferenci**

Piskovská A., Jekl V., Hauptman K. Zobrazovací metody při diagnostice onemocnění dutiny hrudní u potkanů. Anestézie, analgezie a zobrazovací metody u drobných savců. Vefair 2023 pro malou praxi, Hradec Králové 14.-15. 4.2023 (věnováno IGA VETUNI 105/2023/FVL)

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 105/2023/FVL***

## **Role volně žijících vlků evropských jako sentinelových hostitelů *Toxoplasma gondii*.**

Jana Juránková<sup>1</sup>, Stefan Pavlović<sup>1</sup>

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

### **Úvod**

*Toxoplasma gondii* je celosvětově rozšířeným parazitem, infikujícím všechny teplokrevné obratlovce včetně člověka. Informace o cirkulaci *T. gondii* mezi volně žijícími zvířaty ve střední Evropě jsou omezené především na serologické studie, případně PCR detekci indikující infekci *T. gondii* u řady druhů volně žijících zvířat v roli mezihostitelů (Kornacka-Stackonis, 2022). Volně žijící psovité šelmy jako je vlk obecný (*Canis lupus*) mohou v sylvatických cyklech *T. gondii* figurovat jako významné sentinelové druhy v případech přenosu parazita z jednoho hostitele na dalšího v důsledku karnivorismu a požití tkáňových cyst s bradyzoity. Vlci v současné střední Evropě včetně České republiky zaznamenávají úspěšný návrat a nárůst populací, což má nesporný vliv na celý ekosystém, včetně jeho parazitární složky, jež je jeho nedílnou součástí. Mezi typickou kořistí vlků ve střední Evropě se řadí jelenovití a divoká prasata (Wagner et al. 2012), kteří figuruji jako relativně častí mezihostitelé *T. gondii* v sylvatickém prostředí. Metaanalýza dat zabývající se seroprevalencí *T. gondii* u evropských jelenů (*Cervus elaphus*) a srnců (*Capreolus capreolus*) odhalila průměrné hodnoty prevalence 29 % u srnců a 15 % u jelenů (Fanelli et al, 2021), data z ČR ukazují 45 % prevalence u jelenů a 24 % u srnců (Bártová a Sedlák, 2012). U divokých prasat v ČR byla zjištěna až 59 % prevalence (Račka et al, 2015). Recentní výsledky studie zabývající se *T. gondii* u vlků žijících v Národním Parku Yellowstone v USA naznačují významný význam tohoto parazita ovlivňujícího chování nakažených jedinců, což má v konečném důsledku vliv na celý ekosystém (Meyer et al, 2022). Studie mapující výskyt *T. gondii* v populacích vlků na území ČR dosud nebyly provedeny, zároveň jsou k dispozici pouze velmi omezené informace o genetické variabilitě *T. gondii* kolující v sylvatických cyklech ve střední Evropě. Cílem stávajícího projektu je proto zjištění výskytu *T. gondii* u volně žijících vlků na území ČR pomocí molekulárních metod a následná genotypizace ve spolupráci se špičkovým pracovištěm Institute of Epidemiology na Friedrich-Loeffler-Institute v Německu. Tento projekt je koncipován jako pilotní pro připravovanou rozsáhlou studii zabývající se *T. gondii* u volně žijících masožravců. V konečném důsledku mohou mít získaná data dopad i na ochranu lidského zdraví v důsledku možnosti prolínání sylvatických a domestikálních cyklů tohoto parazita při relativně hustém zalidnění v antropogenních podmínkách střední Evropy, kdy dochází ke stále častějším kontaktům volně žijících zvířat s civilizací.

## Materiál a metodika

### Vzorky tkání

Díky dobře fungující spolupráci s Agenturou ochrany přírody a krajiny byla na pracovišti řešitelů provedena pitevni vyšetření vzácných volně žijících šelem vlků obecných z území České republiky, při kterých byly odebrány vzorky tkání za účelem molekulárních analýz *T. gondii*. Pro účely projektu byly k dispozici zamrazené tkáně kosterní svaloviny, plic a srdeční svaloviny, u některých jedinců i tkáň mozku z 20 jedinců vlků. Pro vyšší výtěžnost izolace DNA byly analyzovány tkáňové vzorky o hmotnosti 20 – 50g.

### Magnetic capture a real-time PCR

Vzorky tkání o hmotnosti 20 až 50g byly lyzovány v lyzačním pufru s proteinázou K a byl získán hrubý extrakt. Z extraktu byl vyváznán biotin přirozeně se vyskytující v tkáních a do vzorku jsou přidány *T. gondii* specifické oligonukleotidy značené biotinem (Tox-CapF a Tox-CapR), které hybridizují s DNA *T. gondii*. Následně byly do směsi přidány magnetické kuličky pokryté streptavidinem. Prostřednictvím vazby streptavidinu a biotinu se na kuličky navázal hybrid značených oligonukleotidů a DNA *T. gondii*. Komplex se pak zachytil pomocí magnetu DynaMag-15 na stěně zkumavky a byl odsán supernatant, čímž se odstranila DNA hostitele. Po denuraci se DNA *T. gondii* navázaná v komplexu s magnetickou kuličkou uvolnila, zbytek komplexu se zachytil na stěně zkumavky magnetem DynaMag-2 a roztok s uvolněnou DNA *T. gondii* byl odsán do nové zkumavky (Opsteegh et al., 2010). Takto získané vzorky DNA byly vyšetřeny pomocí real-time PCR s použitím specifických primerů Tox-9F a Tox-11R amplifikujících 529 bp repeat elementu a BHQ-FAM značené sondy Tox-TP1 (Homan et al., 2000). Fluorescence byla odečítána při 530 nm (Tox-TP1). Byla provedena kvantifikace zoitů na gram tkáně na základě odečtených hodnot Cp.

## Výsledky

Celkem bylo vyšetřeno 34 vzorků tkání z 12 jedinců s využitím izolace DNA pomocí magnetic capture, u kterých byla provedena kvantitativní PCR. V případě 7 jedinců byly vyšetřeny vzorky srdeční svaloviny, plic a kosterní svaloviny, u jednoho jedince byly k dispozici pouze vzorky srdce a plic a u jednoho vzorek kosterní svaloviny. Z 12 vlků testovaných byli zjištěni 4 jedinci pozitivní na přítomnost zoitů *Toxoplasma gondii* ve vyšetřovaných tkáních. U dvou jedinců byly pozitivní pouze vzorky srdeční svaloviny, u jednoho vlka byl pozitivní vzorek kosterní svaloviny a v případě jednoho jedince byly pozitivní vzorky srdce a kosterní svaloviny. Všechny vzorky plicní tkáně byly negativní

na přítomnost *T. gondii*. Prevalence *T. gondii* u dosud vyšetřených vlků činí 33,3 %. Pozitivní jedinci byli nalezeni v blízkosti obcí Nažidla (okres Český Krumlov), Prostřední Bečva (okres Vsetín), Metylovice (okres Frýden-Místek) a Šonov (okres Náchod). V případě tří jedinců bylo příčinou smrti polytrauma způsobené srážkou s dopravním prostředkem, u jednoho zvířete bylo zjištěno trauma hrudní končetiny zřejmě po uvíznutí v drátěném oku, dehydratace a hladovění. Z dosažených výsledků se jeví jako nejvhodnější tkáň pro detekci *T. gondii* u vlků srdeční svalovina, která byla nejčastěji zjištěnou pozitivní tkání a při kvantifikaci v ní byly zjištěny nejvyšší počty zoitů/g tkáně (tabulka 1). Výsledky zatím nejsou kompletní, budou provedena vyšetření dalších osmi jedinců, u pozitivních vzorků bude provedena genotypizace a v kompletním setu vzorků bude provedeno statistické vyhodnocení.

Označení zvířete:	Počet zoitů na gram tkáně			
	CL241	CL256	CL257	CL258
Srdce:	1,12	28,45	294,56	
Plíce:				
Kosterní sval:			89,84	2,31

Tabulka 1 Výsledky kvantifikace zoitů na gram vyšetřené tkáně

### Seznam literatury:

Bártová E, Sedlák K (2012): Toxoplasmosis in Animals in the Czech Republic – The Last Ten Years in Toxoplasmosis: Recent Advances. Books on Demand ISBN 9535107461, 9789535107460

Fanelli A, Battisti E, Zanet S, Trisciuglio A, Ferroglio E (2021): A systematic review and meta-analysis of *Toxoplasma gondii* in roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) in Europe. *Zoonoses and Public Health* 68/3: 182-193.

Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, Verschoren H (2000): Identification of a 200-to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *International Journal for Parasitology*, 30: 69–75.

Kornacka-Stackonis (2022): *Toxoplasma gondii* infection in wild omnivorous and carnivorous animals in Centra Europe – A brief overview. *Veterinary Parasitology* 304:

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2022.109701>

Opsteegh M, Langelaar M, Sprong H, Hartog L, De Craeye S, Bokken G, Ajzenberg D, Kijlstra A, Giessen Van Der, J (2010): Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR. *International Journal of Food Microbiology* 139: 193-201.

Račka K, Bártová E, Budíková M, Vodrážka P (2015): Survey of *Toxoplasma gondii* antibodies in meat juice of wild boar (*Sus scrofa*) in several districts of the Czech Republic. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 22/2: 231–235.

Wagner C, Holzapfel M, Kluth G, Reinhardt I, Ansorge H (2012): Wolf (*Canis lupus*) feeding habits during the first eight years of its occurrence in Germany. *Mammalian Biology* 77:196-203.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 102/2023/FVL.***

# Vliv infekce hlísticí *Angiostrongylus cantonensis* na vybrané fyziologické funkce definitivních hostitelů

Jana Kačmaříková<sup>1</sup>, Helena Stříbrná<sup>1</sup>, Vivienne Velič<sup>2</sup>

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

## Úvod

Hlístice *Angiostrongylus cantonensis* je příčinou eosinofilní meningoencefalitidy se závažnými následky u lidí a dalších teplokrevných obratlovců a má globálně charakter emerging disease. Přírodním definitivním hostitelem jsou potkani a krysy, u nichž jsou dospělci lokalizováni v plicních cévách, a jako mezihostitelé fungují různé druhy plžů. Pro pochopení epidemiologie a šíření onemocnění je potřeba porozumět, jak parazit ovlivňuje svého hostitele, a to jak na bázi přímého působení na tkáně a vznikajících patologických změn, tak na úrovni změn chování a způsobu života. Po infekci larvy migrují ze střev do centrální nervové soustavy (CNS), kde několik týdnů probíhá vývoj a následně larvy opět migrují do plicních cév, kde se rozmnožují. Během fáze v CNS dochází ke vzniku meningitidy, která může výrazně ovlivnit kognitivní funkce jako např. prostorovou orientaci a paměť. Plicní fáze infekce pak může negativně ovlivňovat kardiovaskulární a respirační funkce a tím pádem fyzický výkon hostitele. Změny těchto fyziologických funkcí tedy mohou ovlivňovat schopnost shánět potravu či unikat před predátory nebo také reprodukční chování, což má v důsledku vliv na epidemiologii onemocnění. Intravitální parametry byly studovány spíše omezeně a studie fyziologické povahy nebyly provedeny vůbec. Průkaz parazita při mikro-CT vyšetření v nervové fázi by mohl pomoci při diagnostice u náhodných hostitelů (psů, koček) nakažených tímto patogenem.

## Materiál a metodika

### Laboratorní zvířata

Do pokusu je zapojeno 30 samců potkana laboratorního kmene Wistar (*Rattus norvegicus* var. *alba*) s dlouhodobou aklimatizací na používané přístroje, postupy a manipulaci. Zvířata jsou rozdělena do 3 skupin, kdy jedna skupina slouží jako negativní kontrola a další dvě skupiny byly infikovány různými infekčními dávkami: 40 L3 a 80 L3.

### Bludiště tvaru Y

Pro hodnocení prostorové paměti byli potkani podrobeni testu spontánní alternace v bludišti tvaru Y, při kterém se snímají vstupy potkana do jednotlivých ramen na videozáznam. Při následném

zpracování se hodnotí jednotlivé vstupy do ramen, lokomoční aktivita potkana a úspěšnost zvířete střídat postupně všechna tři ramena a tvořit tak tzv. triády, ke kterým nedochází v případě alterace prostorové paměti u testovaných subjektů. Test se opakuje každé 2 měsíce pro zjištění případného dlouhodobého vlivu infekce na prostorovou paměť.

#### Hodnocení fyziologických parametrů v závislosti na aktivitě

Vliv infekce na klinický stav zvířat je hodnocen pravidelně každých 20 dní. Jedná se o souhrn měření dechové frekvence, tepové frekvence a saturace krve kyslíkem v klidové fázi a následně opakování měření po fyzické aktivitě, kterou je běh na upraveném běžícím páse v pěti intervalech po 20 sekundách o rychlosti 1 km/h. Pro měření saturace kyslíkem a tepovou frekvenci je používán pulzní oxymetr na bázi ocasu. Pro zjištění dechové frekvence je proveden videozáznam, ze kterého je počet dechů následně odečten na základě pohybu hrudní stěny.

#### Mikro CT vyšetření

Pro vizualizaci lézí způsobené parazity byly využity orgány uhynulých potkanů impregnované roztokem molekulárního jódu ve 100% methanolu. Skenovány byly mozky a plíce dvou potkanů uhynulých v průběhu pokusu (8 dpi, 27 dpi) a konzervované plíce potkana v chronické fázi infekce (cca 8 měsíců po infekci). Před dvoudenní impregnací jódem byly orgány fixovány v 10% formalínu a následně prošly alkoholovou řadou (30%, 50%, 70%, 80% a 90% ethanolu, vždy na 24 hodin). Vzorky byly dále skenovány na zařízení SkyScan2376 CMOS firmy Bruker na Výzkumném ústavu veterinárního lékařství.

## Výsledky

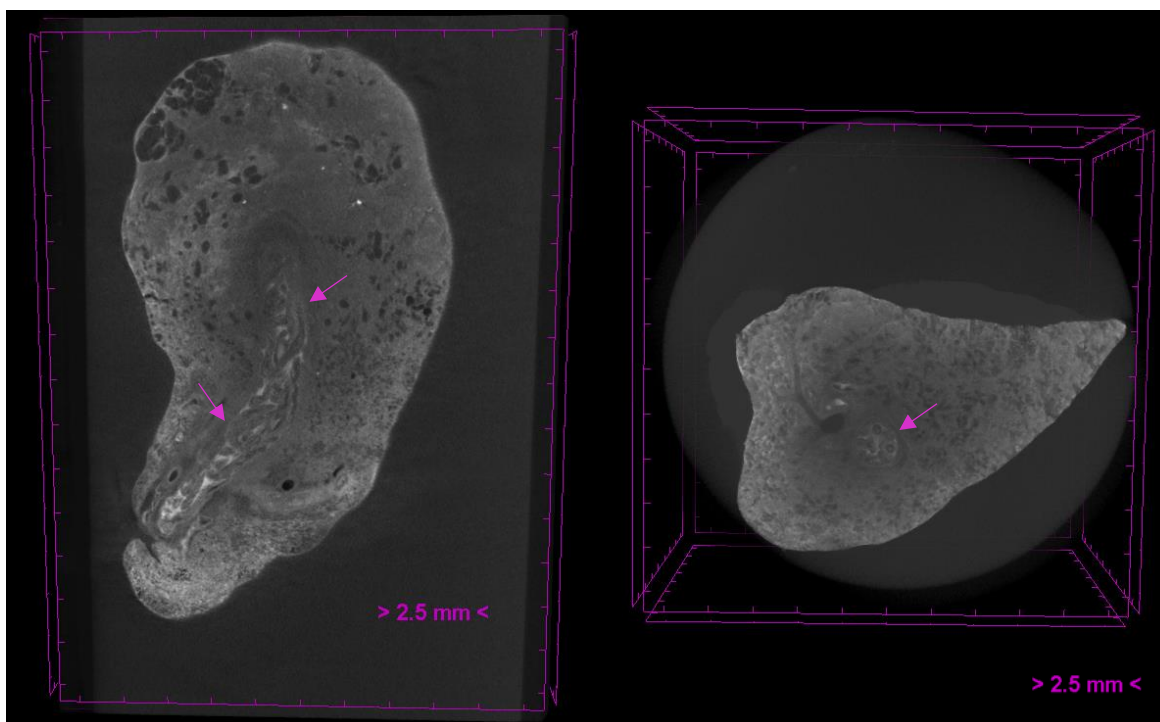
Již během prvních stádií infekce byl prokázán statisticky významný rozdíl ( $p=0,02$ ) mezi testovanou skupinou s vyšší infekční dávkou a kontrolní skupinou v parametru saturace kyslíkem po fyzické aktivitě. Vzhledem ke stále probíhajícímu pokusu se dá předpokládat, že rozdíl mezi testovanými zvířaty a kontrolní skupinou bude v průběhu času dále narůstat.

Po zhodnocení krátkodobé prostorové paměti pomocí bludiště tvaru Y byly rovněž dokumentovány odchylky procentuální úspěšnosti alternace ramen testované skupiny oproti kontrolní, které se mohou v průběhu pokusu měnit. Také lokomoční aktivita, tj. pohyb v rámci bludiště a počet navštívených ramen, se lišila mezi potkany v kontrolní a testované skupině potkanů s mozkovou fází infekce. U infikovaných zvířat byl průměrný počet navštívených ramen 16, u infikovaných zvířat 22.



Mikro-CT vyšetření mozků uhynulých potkanů v lebce bez impregnace jodem neprokázalo přítomnost parazitů, přestože v jednom případě (27 dpi) byl při následném vyjmutí mozku nalezen 1 dospělec v subarachnoidálním prostoru. Při následném skenování po impregnaci mozku jódem ve snaze zaznamenat nižší vývojová stádia larev v mozkovém parenchymu jsme také nezaznamenali pozitivní výsledek. Nicméně tato metodika byla zatím testována na nízkém počtu vzorků a další výsledky očekáváme.

Při *ex vivo* Mikro-CT vyšetření levého plicního laloku chronicky infikovaného potkana bylo objeveno ložisko naplněné dospělci *A. cantonensis* o velikosti  $18,8 \times 2,5$  mm, přestože jeho klinický stav podobnému obrazu nenasvědčoval. Z tohoto důvodu je potřeba dále pokračovat v hodnocení vlivu infekce na definitivní hostitele a sledovat tento vliv i v dlouhodobém měřítku, vzhledem k omezeným dosavadním informacím.



Obrázek 1. Snímek Mikro-CT vyšetření levého plicního laloku chronicky infikovaného potkana, ohraničená léze s parazitickou hlísticí označena šipkou.

### Seznam literatury:

Wun MK, Davies S, Spielman D, Lee R, Hayward D, Malik R. Gross, microscopic, radiologic, echocardiographic and haematological findings in rats experimentally infected

with *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitology*. 2021 Feb;148(2):159-166. doi: 10.1017/S0031182020001420. Epub 2020 Aug 3. PMID: 32741388.

Ji L, Yiyue X, Xujin H, Minghui Z, Mengying Z, Yue H, Yanqi W, Langui S, Xian Z, Datao L, Shuo W, Huanqin Z, Zhongdao W, Zhiyue L. Study on the tolerance and adaptation of rats to *Angiostrongylus cantonensis* infection. *Parasitol Res*. 2017 Jul;116(7):1937-1945. doi: 10.1007/s00436-017-5472-4. Epub 2017 May 11. PMID: 28493001.

Červená B, Modrý D, Fecková B, Hrazdilová K, Foronda P, Alonso AM, Lee R, Walker J, Niebuhr CN, Malik R, Šlapeta J. Low diversity of *Angiostrongylus cantonensis* complete mitochondrial DNA sequences from Australia, Hawaii, French Polynesia and the Canary Islands revealed using whole genome next-generation sequencing. *Parasit Vectors*. 2019 May 16;12(1):241. doi: 10.1186/s13071-019-3491-y. PMID: 31097040; PMCID: PMC6524341.

Barratt J, Chan D, Sandaradura I, Malik R, Spielman D, Lee R, Marriott D, Harkness J, Ellis J, Stark D. *Angiostrongylus cantonensis*: a review of its distribution, molecular biology and clinical significance as a human pathogen. *Parasitology*. 2016 Aug; 143(9):1087-1118. doi: 10.1017/S0031182016000652. Epub 2016 May 26. Erratum in: *Parasitology*. 2019 Sep;146(10):1360. PMID: 27225800.

Shyu, L. Y., Tsai, H. H., Lin, D. P., Chang, H. H., Tyan, Y. S., & Weng, J. C. An 8-week Brain MRI Follow-up Analysis of Rat Eosinophilic Meningitis Caused by *Angiostrongylus cantonensis* Infection. *Zoonoses and Public Health*, 2013 Apr; 61(6), 411–419. doi:10.1111/zph.12087.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 150/2023/FVL***

# Zavedení síťovací techniky k detekci a následné genotypizaci vajíček tasemnic v trusu volně žijících masožravců

Jana Juránková<sup>1</sup>, David Kiss<sup>1</sup>

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

## Úvod

Od konce dvacátého století je ve střední Evropě včetně České republiky zaznamenáván návrat populací velkých šelem, konkrétně 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, částečně i díky reintrodukcí. Nejvýraznější expanzi v rámci ČR zaznamenáváme u vlků. Tento fenomén představuje v kulturní krajině střední Evropy potenciál pro blízký kontakt těchto predátorů s domácími zvířaty a člověkem, při němž může mimo jiné docházet k prolínání sylvatických a domestikálních cyklů některých druhů parazitů. Důležitou skupinou takovýchto parazitů jsou tasemnice čeledi Taeniidae, zahrnující rody *Taenia* a *Echinococcus*, významné z hlediska veterinární i humánní medicíny. Oba tyto rody byly opakovaně detekovány u volně žijících vlků obecných ve střední Evropě (Lesniak et al., 2017). Vzhledem k chráněnému statusu těchto šelem je snaha maximálně využívat neinvazivně získané biologické vzorky, např. vzorky trusu. Vhodnou metodou pro koprologické vyšetření trusu zaměřené na detekci vajíček tasemnic je tzv. následné síťování, umožňující využití vzorků pro molekulární analýzy.

Cílem projektu bylo určení druhového spektra taeniidních tasemnic ze vzorků trusu vlků obecných z NP Šumava, a to na základě molekulárních dat u vzorků vyšetřených pomocí následného síťování.

## Materiál a metodika

### Vzorkování a koprologické metody

Vzorky trusu využitě v projektu byly sbírány pracovníky NP Šumava v rámci monitoringu vlků obecných na území národního parku, dříve vyšetřené standardními koprologickými metodami (flotace, sedimentace, larvoskopie) na přítomnost endoparazitů. K iniciálnímu vyšetření vzorků použitých v projektu byla zvolena metoda následného síťování, která pomocí sít o dané velikosti ok (105, 38 a 21  $\mu\text{m}$ ) umožní separaci různých vývojových stádií endoparazitů a přichystá je k navazujícímu molekulárnímu vyšetření (Mathis et al., 1996).

## Molekulární analýzy

Celková DNA ze vzorků přichystaných následným síťováním byla izolována pomocí alkalické lýzy a komerčního izolačního kitu (Štefanić et al., 2004). Pro druhové určení tasemnic byla vybrána kombinace mitochondriálních markerů podjednotky 1 cytochrom c oxidázy (COI) a podjednotky 1 NADH dehydrogenázy (NAD1). V obou případech byly využity protokoly nested PCR. U COI byly pro projekt navrženy vnější primery a jako vnitřní byly využity univerzální primery JB3 a JB4.5 (Bowles et al., 1992). Pro detekci NAD1 byly využity primery JB11 a JB12 (Bowles et al., 1993) v kombinaci s primery NAD1-T Fw a NAD1-T Rv (Armua-Fernandez et al., 2011). Výsledné produkty byly vizualizovány pomocí elektroforézy na 2% agarózovém gelu obarveném Midori Green Advance (Elisabeth Pharmakon, 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>).

## Výsledky a diskuze

Celkově bylo v rámci projektu vyšetřeno 155 vzorků trusu metodou následného síťování. Porovnáním s flotačním vyšetřením vyplývá, že se jedná o senzitivnější metodu. Zároveň však nejvyššího záchyty bylo dosaženo při kombinaci výsledků obou metod (Tabulka 1). Ze síťovaných vzorků byla zatím u 48 z nich izolována DNA a provedeno PCR zaměřené jak na COI, tak na NAD1. Prvotní výsledky odhalily přítomnost DNA taeniidních tasemnic u 10 vzorků. Konkrétně byly zachyceny druhy *Taenia hydatigena* (7), *T. krabbei* (2) a *T. lynciscapreoli* (1). Tyto druhy jsou u volně žijících predátorů střední Evropy běžné. Zajímavostí je i záchyt *Eurotaenia gracilis*, což je tasemnice drobných volně žijících hlodavců a je příkladem pseudoparasitismu. Molekulární analýzy budou nadále pokračovat s cílem spektrum taeniidních tasemnic v populaci šumavských vlků.

Použitá metodika	Počet vyšetřených vzorků	Pozitivní vzorky (%)
Flotační vyšetření	155	20 (12,9)
Následné síťování	155	27 (17,4)
Kombinace obou vyšetření	155	34 (29,1)

Tabulka 1 Srovnání koprologických metod

## Seznam literatury:

ARMUA-FERNANDEZ, M. T., NONAKA, N., SAKURAI, T., NAKAMURA, S., GOTTSTEIN, B., DEPLAZES, P., PHIRI, I. G., KATAKURA, K., OKU, Y., (2011). Development of PCR/dot blot assay for specific detection and differentiation of taeniid cestode eggs in canids. *Parasitol Int*;60(1):84-9.

BOWLES, J., BLAIR, D., MCMANUS, D., (1992). NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *Int J Parasitol*;23(7):969–972.

BOWLES, J., MCMANUS, D., (1993). Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular and biochemical parasitology*. 54. 165-73.

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., DUEA, M. (2017): Výskyt velkých šelem – rysa ostrovida (*Lynx lynx*), vlka obecného (*Canis lupus*) a medvěda hnědého (*Ursus arctos*) – a kočky divoké (*Felis silvestris*) v České republice a na západním Slovensku v letech 2012–2016 (Carnivora). *Lynx, n.s.* (Praha), 48: 93-107.

LESNIAK, I., HECKMANN, I., HEITLINGER, E., SZENTIKS, C., NOWAK, C., HARMS, V., JARAUSCH, A., REINHARDT, I., KLUTH, G., HOFER, H., KRONE, O. (2017): Population expansion and individual age affect endoparasite richness and diversity in a recolonising large carnivore population. *Scientific Reports*. 7. 41730. 10.1038/srep41730.

MATHIS, A., DEPLAZES, P., ECKERT, J., (1996). An improved test system for PCR-based specific detection of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Journal of Helminthology*, 70, 219-222.

ŠTEFANIĆ, S., SHAIKENOV, B. S., DEPLAZES, P., DINKEL, A., TORGESON, P. R., MATHIS, A., (2004). Polymerase chain reaction for detection of patent infections of *Echinococcus granulosus* (“sheep strain”) in naturally infected dogs. *Parasitology Research*, 92, 347-351.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 103/2023/FVL***

# **Porovnání diagnostických algoritmů při vyšetření magnetickou rezonancí v ortopedii a neurochirurgii malých zvířat**

Laura Staňková, Michal Radó, Jan Mazánek, Robert Srnec

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

## **Úvod**

Použití magnetické rezonance (MRI) v klinické praxi se datuje do 80tých let minulého století, největšího rozvoje však tato modalita dosahuje až v posledních několika letech. V humánní medicíně se jedná o metodu volby u pacientů s mnoha ortopedickými i neurologickými abnormalitami, vrozenými vadami i získanými nemocemi pohybového aparátu. Magnetická rezonance je v současné době moderním trendem ve veterinární medicíně, který se stává zlatým standardem v neurologické a neurochirurgické diagnostice onemocnění psů a koček. V České republice ve veterinární medicíně není tato metoda rutinně využívána pro zobrazení ortopedických a neurologických abnormalit z důvodu její omezené dostupnosti. Navíc, jednotlivé přístroje se liší ve výkonu a kvalitě zobrazení, což může mít vliv na klinickou interpretaci výsledků. Vzhledem k rozdílům ve velikosti humánních a veterinárních pacientů, stejně jako rozdílům mezi plemeny jednoho zvířecího druhu (čivava versus německá doga), není možné jednoduše převést zavedené protokoly z humánní medicíny do medicíny veterinární. Proto je nutná optimalizace zavedených protokolů. Díky rozvoji kvality veterinární péče a veterinární medicíny všeobecně je stále více kladen důraz na optimalizaci diagnostických postupů při vyšetření MRI tak, aby byla výtěžnost daného vyšetření co největší vzhledem k jeho časové náročnosti a s ním spojených rizik celkové anestezie, která je nutnou podmínkou pro MRI vyšetření pacientů ve veterinární medicíně.

## **Materiál a metodika**

Studie proběhla na Klinice chorob psů a koček VETUNI Brno. Do studie byly zařazeny kadavery psů ve dvou hmotnostních skupinách: pět kadaverů o hmotnosti 5 až 15 kg reprezentujících skupinu malých plemen psů a pět kadaverů o hmotnosti 25 kg a více, reprezentujících velké plemena psů. U všech kadaverů byla provedena magnetická rezonance se zaměřením na nejčastější anatomické lokalizace ortopedických a hlavně neurochirurgických onemocnění. Magnetická rezonance byla prováděna na 0,35T přístroji s permanentním magnetickým polem Magnetom C (Siemens).

Pro každou anatomickou lokalizaci jsme nejprve využili standardní protokol magnetické rezonance, který byl zvolen tak, aby korespondoval s běžnými klinickými postupy a umožnil srovnání s již existujícími daty. Zároveň se jednalo o přednastavený protokol v systému syngo C15. Po prvním zhodnocení obrazů došlo k úpravě algoritmu vyšetření s cílem optimalizovat poměr mezi rychlostí skenování a kvalitou získaných obrazů. Naším záměrem bylo dosáhnout maximální diagnostické výtěžnosti v co nejkratším možném čase vyšetření, což je klíčové v klinické praxi, kde čas představuje často omezený zdroj.

Následně byly zhodnoceny nálezy a algoritmus vyšetření byl dále upraven s ohledem na rychlost a výtěžnost, aby bylo možné dosáhnout alternativního protokolu pro vyšetření. V průběhu studie byla zkoumána různá nastavení parametrů MRI, včetně echo času (TE), opakovacího času (TR), tloušťky řezu a velikosti zorného pole (FOV). Výsledky z různých nastavení byly vzájemně porovnávány a hodnoceny s důrazem na kvalitu obrazu, detailnost zobrazení a schopnost identifikovat patologické změny v tkáních.

Výsledky z různých nastavení byly vzájemně porovnány s cílem identifikovat nejefektivnější nastavení MRI, které by v kontextu časové náročnosti poskytovalo nejlepší diagnostickou výtěžnost.

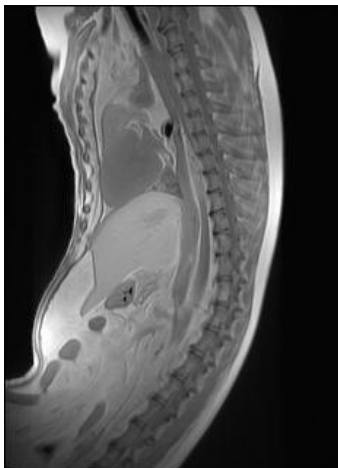
## Výsledky

V rámci naší studie byla provedena magnetická rezonance (MRI) na deseti kadaverech psů, rozdělených do dvou hmotnostních kategorií. Zaměřili jsme se na vyšetření ramene, lokte, kolena a páteře. Zaměření bylo hlavně na anatomické struktury klíčové pro dané oblasti. V oblasti ortopedie bylo zjištěno, že velikost pacienta je hlavním omezujícím faktorem, jelikož protokoly vyšetření vybraných oblastí vyžadovaly dlouhou dobu – přibližně průměrně 35 minut u menších plemen a 45 minut u větších. V porovnání s počítačovou tomografií (CT) je to výrazně delší a pro různé diagnózy by byly potřeba odlišné protokoly. Na druhou stranu je MR vyšetření senzitivnější pro některé onemocnění v porovnání s CT.

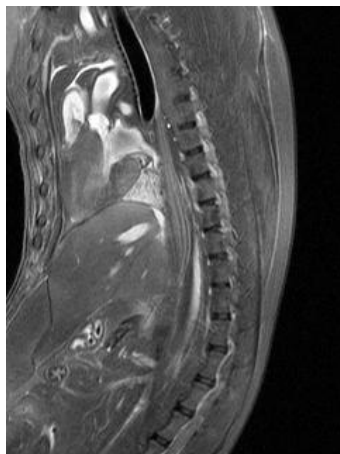
Byly použity primárně T2 vážené (T2W) a T1 vážené (T1W) sekvence v režimu Turbo Spin Echo (TSE). Během studie byl zkoumán vliv zvýšení počtu excitací (NEX) na poměr signálu k šumu (SNR) a tím i na rozlišení jednotlivých snímků. Zjistili jsme, že zvýšení NEX zlepšuje SNR, což vede k lepšímu rozlišení obrazu, ale zároveň prodlužuje dobu vyšetření. Proto bylo nutné najít rovnováhu mezi časem vyšetření a kvalitou obrazu, aby bylo možné dosáhnout optimálních diagnostických výsledků.

V neurochirurgické části studie bylo hlavním zaměřením páteř, se speciálním důrazem na meziobratlové disky a míchu. V této oblasti jsme dosáhli lepších výsledků, a to i u menších plemen, kde se nám podařilo získat snímky dostatečné kvality. Pro skenování byla klíčová pečlivá volba a umístění cívek. Jelikož veterinární cívky pro použitý přístroj neexistují, museli jsme pro jednotlivé regiony otestovat a určit cívky určené pro použití v humánní medicíně. Menší cívky umístěné co nejbližší zkoumanému objektu výrazně zlepšovaly signál. Správné umístění kadaverů bylo rovněž esenciální, přičemž jsme testovali všechny dostupné metody a pozice, aby bylo dosaženo co nejlepšího signálu.

V rámci studie byla zkoumána různá nastavení parametrů MRI, včetně velikosti zorného pole (FoV), echo času (TE), opakovacího času (TR) a počtu excitací (NEX). Hlavním cílem bylo dosáhnout optimálního poměru mezi rychlostí zobrazování a kvalitou obrazu. Výsledky různých nastavení byly vzájemně porovnány s důrazem na kvalitu obrazu, detailnost zobrazení a schopnost identifikovat patologické změny, zejména v meziobratlových discích.



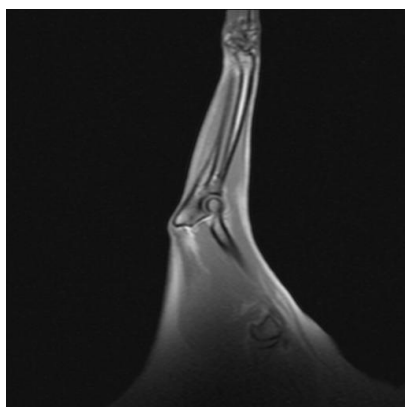
Obr. č1: T1W SNR = 1,70



Obr. č2: T2W SNR = 1,70



Obr. č3: T2W SNR = 0,70



č4: T1W SNR = 1,45



Obr. č5: T1W SNR = 0,90

Obr.

### Závěr

Výsledky našeho výzkumného projektu poskytly cenné poznatky v oblasti využití MRI v diagnostice ortopedických a neurochirurgických onemocnění u malých zvířat. Ačkoliv byly dosažené výsledky přínosné, zdůrazňují také omezení, která jsou spojena s používáním kadaverů. Hlavními omezeními jsou absence krvení, imunitních reakcí a nemožnost použití intravenózního kontrastu. Tyto faktory hrají klíčovou roli v diagnostice a nelze je plně modelovat pomocí kadaverů.

Je tedy nezbytné rozšířit výzkum i na živé pacienty, což umožní lepší simulaci reálných klinických situací a poskytne další důležité informace pro optimalizaci MRI protokolů. Výzkum na živých



zvířatech nám také umožní lépe pochopit dynamiku krvení, imunitních reakcí a efekt intravenózního kontrastu na kvalitu obrazu v MRI.

Tento další krok bude klíčový pro rozvoj efektivních a přesných diagnostických metod, které budou moci být aplikovány v reálné klinické praxi. Výsledky tohoto rozšířeného výzkumu budou mít potenciál nejen zlepšit diagnostické schopnosti veterinárních klinik, ale také přispět k lepšímu pochopení patologických procesů u malých zvířat, což povede k efektivnější léčbě a zlepšení kvality života našich zvířecích pacientů.

### **Seznam literatury:**

1. Pujol E, Van Bree H, Cauzinille L, *et al.* Anatomic study of the canine stifle using low-field magnetic resonance imaging (MRI) and MRI arthrography. *Vet Surg* 2011;40(4): 395–401.
2. Baeumlin Y, De Rycke L, Van Caelenberg A, *et al.* Magnetic resonance imaging of the canine elbow: an anatomic study. *Vet Surg* 2010;39(5):566–573.
3. Ober CP, Freeman LE. Computed tomographic, magnetic resonance imaging, and cross-sectional anatomic features of the manus in cadavers of dogs without forelimb disease. *Am J Vet Res* 2009;70(12):1450–1458.
4. Marino DJ, Loughin CA. Diagnostic imaging of the canine stifle: a review. *Vet Surg* 2010;39(3):284–295.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 150/2023/FVL.***

# **Farmakokinetika torasemidu a zhodnocení jeho dlouhodobého podání na funkci ledvin a plazmatickou elektrolytovou rovnováhu u králíka domácího (*Oryctolagus cuniculus*)**

Zuzana Tomiczková, Vladimír Jekl

*Ústav farmakologie a farmacie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno*

## **Úvod**

Onemocnění srdce je u králíků chovaných ze záliby stále častějším klinickým nálezem (Ozawa a kol. 2021, Jekl a kol. 2022, Müller and Mancinelli 2022). Králík je také modelovým zvířetem onemocnění srdce u člověka. Pro terapii onemocnění srdce se většina dávek léčiv odvozuje od dávek pro psa nebo kočku (Müller and Mancinelli 2022). Diuretika hrají zásadní roli v terapii kardiovaskulárních onemocnění, především kongestivního srdečního selhání či edematózních stavů. Torasemid (někdy označován jako torsemid) je stejně jako furosemid kličkové diuretikum, které způsobuje inhibici kotransportu sodíkových, draselných a chloridových iontů. Tohoto efektu je dosaženo především účinkem na ascendentní část Henleovy kličky. Vyvolání salurezy (zvýšené vylučování NaCl) souvisí se změnou osmolarity v dřeni ledvin. Právě zvýšená osmolarita snižuje zpětnou reabsorpci vody a vyvolává exkreci moči. Účinek kličkových diuretik je ve srovnání s jinými diuretiky výrazně rychlejší. Kličková diuretika se dají tedy využít při edémech z příčin kardiálních, renálních i hepatálních. Další vlastnosti kličkových diuretik je zvýšení eliminace vápenatých a hořečnatých iontů ledvinami. Torasemid byl vyvinut jako diuretikum s delším poločasem rozpadu, tedy delší dobou účinku a vyšší biologickou dostupností ve srovnání s častěji používaným kličkovým diuretikem furosemidem. Některými autory je uváděn až 10 x silnější efekt torasemidu ve srovnání s furosemidem (Papich 2021). V minulosti byl popsán také jeho antialdosteronový a vazodilatační efekt. Torasemid by měl dosahovat svého efektu s minimálními nežádoucími účinky. Resorbuje se spolehlivě z více než 80 % na rozdíl od furosemidu, u kterého se může resorpce snížit až na 30 % podávané dávky. U králíků byla farmakokinetika a farmakodynamika torasemidu publikována pouze po jeho intravenózním podání, a to zejména u novorozených králíků Kim et al. 2004). Dlouhodobý vliv torasemidu na funkci ledvin a případných elektrolytovým imbalancech popsán dosud není.

## **Materiál a metodika**

V rámci projektu byla stanovena farmakokinetika torasemidu u králíků po jeho jednorázovém orálním podání ve dvou dávkách – 0,3 a 0,6 mg/kg. V této fázi bylo použito 14 králíků náhodně rozdělených do 2 skupin + kontrolní skupina (negativní kontrola – 7ks), které byl podán fyziologický roztok.

Po aklimatizační fázi byl králíkům aplikován torasemid (UpCard 0,75 mg tablety, Vetoquinol SA, Francie). Tyto tablety byly rozdrceny, rozpuštěny s malým množstvím vody, aplikovány perorálně stříkačkou do tlamy králíkům a následně jim bylo podáno dostatečné množství vody tak, aby došlo k úplnému polknutí tablety.

Odběry vzorků krve byly u králíků prováděny před aplikací torasemidu a dále po jeho aplikaci 30 min., 60 min, 2 hod., 6 hod., 8 hod., 12 hod, 24 hod. a 36 hod. Byl prováděn střídavý odběr z levé a pravé ušní cévy (a. auricularis centralis) tak, jak je popsán v jiných vědeckých publikacích s maximální opatrností a prevencí vzniku hematomu. Zvířata během odběrů nebyla sedována, ale pouze fixována odborně způsobilým personálem tak, aby docházelo k co nejmenšímu stresu a byl zachován refinement (v rámci koncepce 3 R). Krev byla odebírána na heparin a následně centrifugována pro získání plazmy. Vzorky určené pro stanovení farmakokinetiky byly okamžitě po získání označeny, zamrazeny a následně dopraveny do laboratoře na suchém ledu.

Kromě stanovení farmakokinetických parametrů byla v krvi sledována hladina celkové bílkoviny, albuminu, močoviny, kreatininu, elektrolytů, vápníku a fosforu. Před aplikací torasemidu i v průběhu experimentu byla odebírána moč (spontánní mikce), kde byla po její centrifugaci kontrolována koncentrace torasemidu, měřena specifická hmotnost (refraktometricky) a zároveň byla tato moč orientačně vyšetřována indikátorovými papírky. Moč byla průběžně slévána z tácu pod rošty a měřena její produkce.

Během celého experimentu bylo také měřeno množství přijatých tekutin (pitná voda) podávaných v keramických miskách a průběžně kontrolován zdravotní stav zvířat. Zařazení jedinci byli po kontrole zdravotního stavu nabídnuti k adopci za dodržení veterinárních podmínek.

## Výsledky

U dávky 0,3 mg/kg došlo k maximální diuréze do 2,5 h po perorálním podání torasemidu a následně množství produkované moči klesalo.

U dávky 0,6 mg/kg se tato doba maximální produkce moči zdvojnásobila a začala klesat po 5 hodinách.

Společně se zvyšující se diurézou docházelo k růstu hodnoty pH moči a nepřímou úměrou k poklesu její specifické hmotnosti, což bylo prokázáno jak indikátorovými močovými papírky, tak refraktometricky.

U hypostenurické moči (v době maximální diurézy) byla prokázána diagnostickými proužky přítomnost dusitanů u obou podaných dávek a dále přítomnost bílkovin, které se ovšem u druhů se zásaditým pH moči běžně prokáží (jedná se o falešně pozitivní informaci). Přítomnost leukocytů, glukózy, ketonů, urobilinogenu, bilirubinu či krve nebyla prokázána ani u jednoho vzorku v průběhu pokusu.

V plasmě byl během nástupu účinku zaznamenán nárůst celkové bílkoviny, albuminu, močoviny, kreatininu, vápníku, fosforu a zároveň pokles vápníku a draslíku.

Farmakokinetika byla stanovena z odebíraných vzorků krve a moči v akreditované laboratoři (BIOPHARM, Výzkumný ústav biofarmacie a veterinárních léčiv a.s., CZ-254 01, Jílové u Prahy, CZECH REPUBLIC) a následně zde provedena analytická a statistická část studie.

### **Seznam literatury:**

1. Jekl V, Agudelo CF, Hauptman K. Cardiology in Rodents, Rabbits, and Small Exotic Mammals-Diagnostic Workup. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2022 May;25(2):503-524.
2. Kim YC, Lee MG, Ko SH, Kim SH. Effect of intravenous infusion time on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the same total dose of torasemide in rabbits. *Biopharm Drug Dispos.* 2004;25(5):211-8
3. Ozawa S, Guzman DS, Keel K, Gunther-Harrington C. Clinical and pathological findings in rabbits with cardiovascular disease: 59 cases (2001-2018). *J Am Vet Med Assoc.* 2021;259(7):764-776.
4. Müller K, Mancinelli E. Cardiology in Rabbits and Rodents-Common Cardiac Diseases, Therapeutic Options, and Limitations. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2022 May;25(2):525-540.
5. Papich MG. *Papich Handbook of veterinary drugs.* Fifth edition. North Carolina: Elsevier, 2021. ISBN 978-0-323-70957-6.

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 107/2023/FVL*

## **Příspěvky**

**Fakulty veterinární hygieny a ekologie**

## **Analýza cest šíření aviární patogenní *Escherichia coli* z různých zdrojů**

Jarmila Laušová<sup>1,2</sup>, Kristína Nešporová<sup>2</sup>, Iva Sukkar<sup>2</sup>, Jana Palkovičová<sup>2</sup>, Monika Dolejská<sup>1,2</sup>

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

### **Úvod**

Kolibacilóza je považována za nejčastější onemocnění v ptačích chovech v posledním desetiletí, jedná se o lokální nebo systémové infekční onemocnění způsobené aviární patogenní *Escherichia coli* (APEC).<sup>1</sup> Stejně jako ostatní extraintestinální patogenní *E. coli* je APEC komenzálem střevní mikroflóry, přesto se za určitých podmínek vyvine v patogen způsobující různě závažné infekce. Mezi terapeutické možnosti léčby APEC infekcí patří použití antibiotik (tetracyklinů, sulfonamidů a aminoglykosidů), ačkoliv je dokumentován zvyšující se výskyt rezistentních APEC kmenů k celé škále antibiotik.<sup>1,2</sup> Velmi závažné je zjištění recentních studií, které označují APEC jako potenciální zoonotický alimentární patogen a zdroj extraintestinálních infekcí pro člověka.<sup>2</sup> Kontrolovat onemocnění způsobená APEC kmeny je velmi obtížné, neboť žádný jednotlivý gen, plazmid, fág či ostrov patogenity nebyl spojen výlučně s rozvojem patogenity APEC.<sup>1</sup> APEC kmeny využívají širokou škálu faktorů virulence a patogeneze k vyvolání onemocnění kuřat, jedná se především o adhesiny, invaziny, protektiny, systémy pro příjem železa a toxiny. Rozvoj technologie celogenomového sekvenování je velkou příležitostí pro detailní populační genomiku evoluce APEC kmenů. V této studii jsme provedly detailní genomickou a fylogenetickou analýzu rozsáhlého souboru kmenů z významné linie ST744 s cílem zhodnotit obsah genů rezistence k antibiotikům a virulence a šíření mezi člověkem a zvířaty.

### **Materiál a metodika**

V rámci projektu byla charakterizována sbírka 30 izolátů *E. coli* ST744, které pocházely z České republiky (pacienti, maso z tržní sítě, odpadní voda, racek). U této sbírky byly již z předchozích studií dostupné výsledky fenotypové rezistence k antibiotikům a celogenomové sekvence technologií krátkých čtení. V rámci řešeného projektu bylo u všech izolátů provedeno celogenomové sekvenování technologií dlouhých čtení (MinION, Oxford Nanopore Technologies) a byly tak získány kompletní souvislé nukleotidové sekvence. Tyto sekvence byly následně v druhém kroku kombinovány se sekvencemi z krátkého čtení z Illumina sekvenování. K izolaci celogenomové DNA byl použit kit Genfind V3 (Beckman Coulter, USA), DNA knihovny byly připraveny kitem SQK-RBK004 rapid barcoding 1D kit a sekvenovány na flow cell (FLO-MIN106 R9.4 SpotON) po dobu

48 hodin. Data byla zpracována včetně base calling programem Guppy v4.2.2, pro odstranění adaptorů a nekvalitních čtení byl využit program BBDuk a pro demultiplexování program Porechop v0.2.4. Pro získání kompletní nukleotidové sekvence jak chromozomu, tak plazmidů bylo provedeno hybridní assembly pomocí programů Ratatosk, Unicycler v0.4.8 a Flye v2.6.

Následující analýzy byly rozšířeny o genomy z databáze Enterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) čítající přibližně 884 genomů studované linie ST744. U genomů byly provedeny analýzy pro identifikaci genetických elementů odpovědných za úspěšnost a patogenitu APEC se zaměřením na genetické okolí genů rezistence, faktory virulence, a plazmidy. Vytvořením fylogenetických stromů na základě jedno nukleotidových polymorfizmů v core genomu bakterií byly definovány možné cesty šíření kmenů mezi zvířaty, člověkem a prostředím.

## Výsledky

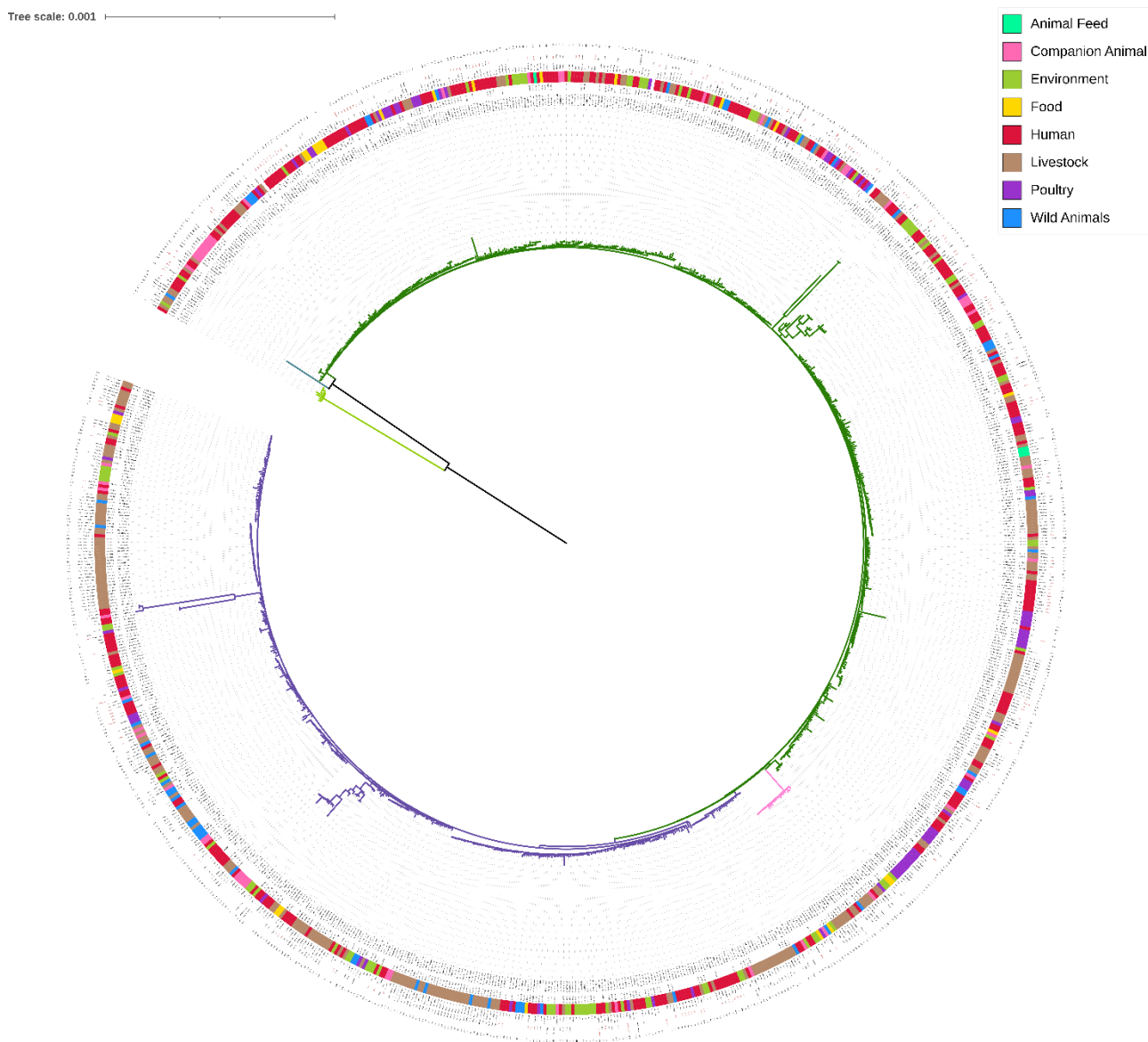
### Fylogenetická analýza

Soubor *E. coli* ST744 pocházel z 51 zemí a různých zdrojů (potravinová zvířata, jídlo, domácí mazlíčci, člověk, prostředí, volně žijící zvířata). Fylogenetická analýza rozčlenila izoláty na základě serotypu do tří hlavních větví (Obrázek 1): a) serotyp H9:O101 (zelená větev) – dominantní klaster s nejvyšším počtem zástupců b) serotyp H10:O101 (fialová větev) – druhý nejčastější, c) serotyp H25:O101 (růžová větev) – malý klaster s pouze dvaceti izoláty. Klinické izoláty byly nejčastější a byly rozmístěny napříč fylogenetickým stromem. Nebylo prokázáno sdružení žádného z klasteru s konkrétním zdrojem izolátu. Celková genetická diverzita izolátů byla vysoká a jednotlivé genomy se od sebe lišily v průměru v 580 SNP (z angl. single nucleotide polymorphism). Byly nalezeny izoláty z různého zdroje a země původu, které se lišily maximálně v 50 SNP, což ukazuje na jejich evoluční příbuznost.

### Rezistence k antibiotikům, virulence a plazmidy

Většina izolátů vykazovala vysokou míru rezistence k různým skupinám antibiotik, pouze 35 z 914 studovaných genomů neslo geny pro rezistence k jedné nebo dvěma skupinám antibiotik a zbylé izoláty byly multirezistentní. Izoláty nesly klinicky významné a plazmidy přenosné mechanismy rezistence k cefalosporinům, karbapenemům, kolistinu a fluorochinolonům. Velká část izolátů nesla geny rezistence rovněž na bakteriálním chromozomu. Vedle rezistence k antibiotikům se v jejich genomu frekventně nacházel *mer* operon pro rezistenci ke rtuti. Z hlediska patogenity ukázala analýza globální sbírky ST744 příslušnost k liniím s nízkým obsahem genů virulence (32-67 detekovaných genů virulence pro jednotlivé izoláty, medián 45) v porovnání s jinými patogenními liniemi. Většina

izolátů nesla geny pro produkci kapsuly, fimbrií, adhezínů a geny pro invaziny. V genomu izolátů byly identifikovány specifické geny pro metabolismus, které budou v budoucnu podrobeny funkčnímu studiu. Třetina izolátů nesla ve svém genomu různé plasmidy typu ColV sružené s APEC kmeny, přičemž plasmidy typu C4:A:-B1 byly nejčastější.



**Obrázek 1. Fylogenetický strom souboru izolátů *E. coli* ST744 z různých zdrojů**

### **Závěr**

*E. coli* ST744 je celosvětově rozšířená linie patogenní *E. coli* sružená s různými infekcemi člověka i zvířat, ale rovněž rozšířená v prostředí. Blízce příbuzné izoláty byly prokázány v různých zdrojích (animální/humánní/environmentální) a různých zemích, což ukazuje na komplexní cesty šíření této



linie. Většina příslušníků této linie je vysoce rezistentní k antimikrobiálním látkám, vykazuje multirezistence, ale má obecně nízký obsah genů virulence v porovnání s jinými patogenními liniemi.

**Seznam literatury:**

[1] MEHAT, Jai W, et al. The Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) pathotype is comprised of multiple distinct, independent genotypes. *Avian Pathology*, 2021, 50(5): 402-416.

[2] KATHAYAT, Dipak, et al. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC): an overview of virulence and pathogenesis factors, zoonotic potential, and control strategies. *Pathogens*, 2021, 10(4): 467.

***Tato práce byla financována grantem IGA VETUNI 206/2023/FVHE***

# VLIV FORTIFIKACE ROSTLINNÝMI PŘÍDAVKY NA VLASTNOSTI MÝDLA VYROBENÉHO Z POUŽITÉHO OLEJE

*Kateřina Boháčková, Dani Dordevic, Simona Dordevic, Bohuslava Tremlová*

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

*Veterinární univerzita Brno*

## ÚVOD

S narůstajícím počtem populace a zájmu o smažené jídlo se zvedá i množství přepáleného tuku. Oleje použité na zpracování nejrůznějších druhů potravin při teplotě 160 až 200 °C již nadále nejsou pro člověka požitelné a představují tak velký zdroj odpadu. Při zahřívání oleje dochází k mnoha reakcím, jako je hydrolyza, termální degradace, oxidace a polymerizace, které mohou být důsledkem toxických produktů (Panadare et al., 2015). Podle Greenea v Evropské unii 51 % odpadu z přepáleného oleje pochází z domácností a pouze malé procento je sesbíráno. Většina těchto olejů pak skončí v odpadních vodách a způsobují environmentální a ekonomický problém (Hillairet et al., 2016). V dnešní době mají oleje velký potenciál ve výrobě biopaliva, pryskyřice, mýdel a mnoho dalších (Panadare et al., 2015; Gökalp et al., 2019). Obohacení těchto mýdel o složky kávové sedliny nebo pomerančového prášku by mohlo mít pozitivní vliv nejen na senzorické vlastnosti.

## MATERIÁLY A METODIKY

### Příprava vzorků mýdla

Pro přípravu vzorků mýdla byl použit přepálený řepkový olej z restaurací. Mýdlo se vyrábělo lehce upravenou studenou saponifikací, kterou uvádí Adigun et al. (2019). Olej o hmotnosti 130 g byl smíchán s 66,92 g 26 % vodného roztoku NaOH za pomoci mixéru (3-5 min). Směs se poté nalila do forem a nechala se 24 hodin tuhnout. Následně se mýdlo vytáhlo z forem a nechalo dozrát na vzduchu. Po 4 týdnech se mýdla podrobila analýze.

Hodnota pH byla změřena v 1% roztoku mýdla v destilované vodě za pomoci pH metru Orion 4 star (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Pro zjištění vlhkosti se v sušárně usušilo 5 g mýdla za teploty 105 °C po dosažení konstantní hmotnosti. Vzorek byl před a po usušení zvážen na analytických vahách ALS 250-4A (Kern, Frankfurt am Main, Germany). Zásaditost se určila pomocí titrace (ČSN 68 1148, 1994).

Celkový obsah polyfenolů byl měřen pomocí metody Folin-Ciocalteu metodice. Vzorky byly míchány po dobu 10 minut a následně byl odebrán 1 ml do 25 ml odměrné baňky, ke vzorku bylo přidáno 5 ml roztoku Folin Ciocalteu (naředěného 1:10) a 4 ml 7,5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Absorbance byla změřena při 765 nm (Tomadoni et al., 2016). Celkový počet flavonoidů byl změřen při 510 nm (Pekal and Pyrzynska, 2014). Pro stanovení antioxidační aktivity ABTS se do tmavých vialek navážilo 0,1 g vzorku, 20 ml ethanolu a vody a celek se homogenizoval. Následně se smíchál s 10 ml 0,007 M

ABTS roztoku a 10 ml 0,00245 M persíranu draselného a nechá se reagovat. Tento roztok se poté ředil do absorpance 0,7 při vlnové délce 735 nm (Thaipong et al., 2006). Pro provádění statistické analýzy byl použit software IBM SPSS.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Hodnoty pH uvedené v Tabulce č. 1 jsou podobné u všech vzorků v rozmezí od 10,25 u vzorku Pom 5% po 10,38 u vzorku Káva 1%. Statisticky významný rozdíl od kontroly byl zaznamenán pouze u vzorku Pom 5%. Komerční mýdla testovaná v práci Tauruna et. al. (2014) měla hodnotu 9-10. Po porovnání hodnot s prací od Antonic et. al. (2021), kde se pH pohybovalo v rozmezí 9,5 až 10,2, se hodnoty pH mýdla po přidavku kávové sedliny a pomerančového prášku mírně zvýšily. Normální lidská kůže má pH pohybující se mezi 5,4 až 5,9 a jakékoliv vystavení mýdla s vyšším obsahem pH může ovlivnit ochrannou funkci kůže a jejího biomu (Tarun et al., 2014). Celkové množství alkálií vyšlo v záporných hodnotách, proto je vše rovno nule. Pěnivost je jedna z nejdůležitějších schopností, která se podílí na čistících vlastnostech mýdla (Awang et al.). Největší pěnivost byla zaznamenána u vzorku s přidavkem 1 % pomerančového prášku 148 % a nejnižší po přidavku 2,5 % kávové sedliny (105 %). Vlhkost znázorněná v Tabulce č. 2 se pohybovala od 4,10 % u vzorku Káva 1% po 5,87 % u vzorku Pom 5%. Mezi těmito hodnotami nebyl objeven statisticky významný rozdíl. Obohacení mýdla o zmíněné složky tedy nemělo vliv na jeho vlhkost. Rozpustnost byla u všech vzorků stoprocentní.

Tabulka č. 1. pH a celkové alkálie ve vzorcích mýdel

Vzorky	pH (-)	Celkové alkálie (%)
Kontrola	10,37 ± 0,06 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00
Pom 1%	10,29 ± 0,05 <sup>acd</sup>	0.00 ± 0.00
Pom 2.5%	10,29 ± 0,04 <sup>acd</sup>	0.00 ± 0.00
Pom 5%	10,25 ± 0,02 <sup>d</sup>	0.00 ± 0.00
Káva 1%	10,38 ± 0,03 <sup>ae</sup>	0.00 ± 0.00
Káva 2.5%	10,32 ± 0,03 <sup>acd</sup>	0.00 ± 0.00
Káva 5%	10,36 ± 0,01 <sup>acd</sup>	0.00 ± 0.00
Kávová sedlina	5,23 ± 0,02 <sup>b</sup>	
Pomerančový prášek	6,03 ± 0,04 <sup>f</sup>	

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

Tabulka č. 2. Pěnivost, vlhkost a rozpustnost mýdel

Vzorky	Pěnivost (%)	Vlhkost (%)	Rozpustnost (%)
Controls	129 ± 27	5,43 ± 0,34 <sup>a</sup>	100
Pom 1%	148 ± 27,53	4,98 ± 0,26 <sup>a</sup>	100
Pom 2,5%	123 ± 16,58	5,62 ± 1,08 <sup>a</sup>	100
Pom 5%	126 ± 23,93	5,87 ± 0,54 <sup>a</sup>	100
Káva 1%	125 ± 9,128	4,10 ± 0,32 <sup>a</sup>	100
Káva 2.5%	105 ± 16,83	5,74 ± 0,05 <sup>a</sup>	100
Káva 5%	125 ± 33,41	5,71 ± 0,63 <sup>a</sup>	100
Kávová sedlina		7,45 ± 0,35 <sup>a</sup>	
Pomerančový prášek		10,9 ± 0,46 <sup>b</sup>	

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

Tabulka č. 3. Antioxidační vlastnosti mýdel

Vzorky	Celkový počet polyfenolů (mg gallic acid/g)	Celkový počet flavonoidů (mg epikatechinu/g)	ABTS (%)
Control	5,16 ± 7,36 <sup>acdf</sup>	0,08 ± 0,00 <sup>a</sup>	3,54 ± 0,54 <sup>ac</sup>
Pom 1%	4,30 ± 0,50 <sup>ad</sup>	0,25 ± 0,03 <sup>cf</sup>	4,07 ± 1,07 <sup>cd</sup>
Pom 2.5%	3,64 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>cdf</sup>	5,07 ± 0,51 <sup>d</sup>
Pom 5%	4,03 ± 0,82 <sup>ad</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>e</sup>	5,43 ± 0,35 <sup>d</sup>
Káva 1%	3,23 ± 0,06 <sup>ac</sup>	0,27 ± 0,03 <sup>fg</sup>	4,72 ± 0,59 <sup>cd</sup>
Káva 2.5%	4,12 ± 0,36 <sup>ab</sup>	0,31 ± 0,01 <sup>g</sup>	5,33 ± 0,74 <sup>d</sup>
Káva 5%	4,81 ± 0,30 <sup>bd</sup>	0,31 ± 0,01 <sup>hg</sup>	6,29 ± 1,07 <sup>d</sup>
Kávová sedlina	23,53 ± 0,33 <sup>e</sup>	0,17 ± 0,00 <sup>i</sup>	30,61 ± 1,94 <sup>c</sup>
Pom. prášek	15,68 ± 0,16 <sup>f</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>j</sup>	22,86 ± 1,47 <sup>f</sup>

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

Hodnoty polyfenolů se pohybovaly v rozmezí od 5 mg/g do 3,5 mg/g. Nejvyšší hodnota byla naměřena u vzorku s přidavkem 5 % kávové sedliny 4,81 mg/g, u tohoto vzorku byl také zjištěn nejvyšší statistický rozdíl od kontroly. Flavonoidy do mýdla přidávají antibakteriální účinky (Febriani et al., 2020). Všechny zjištěné hodnoty se statisticky významně lišily od kontroly. U hodnot ABTS si lze všimnout statisticky významných rozdílů pouze u dvou vzorků. U vzorku s přidavkem 1 % kávové sedliny a vzorku s přidavkem 1 % pomerančového prášku.

### ZÁVĚR

V závěru studie lze konstatovat, že přidavky kávové sedliny a pomerančového prášku ovlivnily fyzikální a chemické vlastnosti mýdla. Pěnivost, rozpustnost, obsah polyfenolů a flavonoidů vykazaly statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými vzorky mýdla. Tato studie zdůrazňuje, že přidavky kávové sedliny a pomerančového prášku do mýdla nejen obohacují jeho antioxidační vlastnosti, ale mohou také přinášet ekologické výhody.

### SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ADIGUN, O., MANFUL, C., PRIETO VIDAL, N., MUMTAZ, A., PHAM, T.H., STEWART, P., Nadeem, M., Keough, D. and Thomas, R. 2019. Use of natural antioxidants from newfoundland wild berries to improve the shelf life of natural herbal soaps. *Antioxidants*, 8(11), p.536.
- ANTONIC, B., DORDEVIC, D., JANCIKOVA, S., TREMLLOVA, B., NEJEZCHLEBOVA, M., GOLDOVÁ, K. AND TREML, J. 2021. Reused plant fried oil: A case study with home-made soaps. *Processes*, 9(3), p.529.
- AWANG, R., AHMAD, S., GHAZALI, R. 2001. Properties of sodium soap derived from palm-based dihydroxystearic acid. *Journal of Oil Palm Research*, 13: 33-38.
- ČSN 68 1148 Methods of Test for Surfactants and Detergents-Surfactants-Analysis of Soaps-Determination of Free Corrosive Alkalies; (Translated by Google Translate); Czech Standards Institute: Prague, Czech Republic, 1994.

- FEBRIANI, A., SYAFRIANA, V., AFRIYANDO, H. AND DJUHARIAH, Y.S. 2020, September. The utilization of oil palm leaves (*Elaeis guineensis* Jacq.) waste as an antibacterial solid bar soap. In IOP conference series: earth and environmental science (Vol. 572, No. 1, p. 012038). IOP Publishing.
- GÖKALP, İ. and UZ, V. E. 2019. Utilizing of Waste Vegetable Cooking Oil in bitumen: Zero tolerance aging approach. *Construction and Building Materials*, 227: 116695.
- HILLAIRET, F.; ALLEMANDOU, V.; GOLAB, K. 2016. Analysis of the current development of household UCO collection systems in the EU. *GREENEA: Coivert, France*, 2016.
- PANADARE, D.C., 2015. Applications of waste cooking oil other than biodiesel: a review. *Iranian Journal of Chemical Engineering (IJChE)*, 12(3), pp.55-76.
- PEKAL, A. AND PYRZYNSKA, K. 2014. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*, 7, pp.1776-1782.
- TARUN, J., SUSAN, J., SURIA, J., SUSAN, V.J. CRITON, S. 2014. Evaluation of pH of bathing soaps and shampoos for skin and hair care. *Indian journal of dermatology*, 59(5), p.442.
- THAIPONG, K., BOONPRAKOB, U., CROSBY, K., CISNEROS-ZEVALLOS, L. AND BYRNE, D.H. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, 19(6-7), pp.669-675.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 214/2023/FVHE.***

## Rezidua pesticidů a léčiv jako významný faktor ovlivnění welfare a zdraví vodních organismů

Hesová R.<sup>1</sup>, Riesová B.<sup>1</sup>, Svobodová, Z.<sup>1</sup>, Doubková, V.<sup>1</sup>, Zicarelli G.<sup>2</sup>, Lakdawala, P.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche, ed Ambientali – Università di Messina, Italia

### Úvod

Znečištění životního prostředí různorodou směsí kontaminantů je významným celosvětovým problémem. Globálně rostoucí populace s sebou přináší tlak na zvýšení produkce potravin a tím na používání přípravků na ochranu zemědělských plodin. Azolové pesticidy jsou pro své vlastnosti nepostradatelnou součástí fungicidní ochrany rostlin a zemědělských plodin. Jsou účinné na široké spektrum patogenů a lze je aplikovat preventivně i kurativně. Jejich široké používání je však bohužel i příčinou toho, že se rezidua těchto látek dostávají do vodního prostředí a mohou pak vzhledem ke své potenciální toxicitě představovat riziko pro necílové organismy vodního prostředí, kumulovat se v sedimentech, kontaminovat podzemní vody a mnohé z nich mají i potenciál biomagnifikace v potravním řetězci (Peris et al., 2022). Například Nataraj et al. (2023) sledovali vliv azolového fungicidu difenokonazolu na labeo avanské (*Labeo rohita*). V pokusu byly ryby vystaveny dvěma subletálními koncentracím (0,45 mg/L a 0,9 mg/L) této látky po dobu 21 dnů. Na konci pokusu bylo zaznamenáno významné snížení aktivity enzymů superoxidodismutázy a katalázy v žábkách, játrech a ledvinách ryb ve srovnání s kontrolními skupinami.

S růstem a stárnutím globální populace je rovněž spojena zvyšující se spotřeba léčivých přípravků, která opět vede ke kontaminaci vodního prostředí. Gabapentin (GBP) se řadí mezi antikonvulzivní léčiva, která se využívají k léčbě epilepsie a neuropatické bolesti. Při používání GBP nedochází v lidském organismu k úplné metabolizaci, a proto je tento lék spojen s vysokou rychlostí vylučování a snadno se dostává do odpadních vod. Čistírny odpadních vod pak dosahují velmi nízké účinnosti v odstraňování tohoto léčiva z odpadních vod (Li et al., 2018). Přítomnost reziduí GBP ve vodním prostředí byla detekována v mnoha státech celého světa. Za posledních 10 let se spotřeba GBP v České republice téměř zdvojnásobila (za rok 2022 spotřebováno 17 tun) a trend jeho spotřeby je rostoucí (SÚKL, 2023). Mimo teratogenity u myší byl pak v roce 2018 zkoumán vliv GBP na raná vývojová stadia dávného pruhovaného (*Danio rerio*) a jeho antioxidační systém. Z negativních vlivů plynoucích z přítomnosti GBP ve vodním prostředí byla popsána malformace embryí, hemaglutinace a perikardiální edém, dále bylo zjištěno významné zvýšení srdeční frekvence, výskyt malformací orgánů a abnormální pohyby (Li et al., 2018).

## Materiál a metodika

První část projektu byla orientována na testy embryonální toxicity, které byly provedeny dle modifikované metodiky OECD č. 236 s přidáním subletálních endpointů. V této části projektu byly využity modelové druhy kapr obecný (*Cyprinus carpio*) a dánío pruhované (*Danio rerio*), jež byly exponovány různým koncentracím léčiv ze skupiny antiepileptik (gabapentin a lamotrigin) a azolových fungicidů (tebukonazol, difenokonazol a jejich metabolit 1,2,4 triazol). Gabapentin byl testován v koncentracích 0,3; 1,5; 10; 100; 1 000 a 100 000 µg/L, lamotrigin v koncentracích 0,1; 1; 10; 100; 1 000 a 100 000 µg/L, tebukonazol v koncentracích 0,5; 5; 50; 500; 5 000 a 10 000 (a u kapra obecného ještě 15 000) µg/L, difenokonazol v koncentracích 0,1; 1; 100; 1 000 a 5 000 µg/L a 1,2,4- triazol v koncentracích 0,1; 1; 100; 1 000; 10 000 a 100 000 µg/L. Nejnižší testovaná koncentrace každé látky vždy odpovídala koncentraci environmentální. Testy byly provedeny v mikrotitračních deskách a každých 24 hodin byly pozorovány ukazatele mortality, ale i subletální endpointy, jako jsou morfologické abnormality a rychlost vývoje. Při ukončení testu (96 hodin po oplození jiker) byly odebrány vzorky na hodnocení změn genové exprese vybraných genů zodpovědných za vývoj orgánových soustav.

Druhou částí projektu byl test embryo-larvální toxicity, který byl proveden dle metodiky OECD č. 210 na kapru obecném (*C. carpio*) semistatickou metodou. Testy embryo-larvální toxicity byly provedeny jak s léčivem gabapentinem, tak s fungicidem tebukonazolem. GBP byl testován v koncentracích 1; 10; 100; 1000; 10000 µg/L a tebukonazol v koncentracích 0,1; 1; 10; 100; 1000 µg/L). Délka trvání pokusu byla podmíněna ukončením larválního vývojového stádia (tj. 28 dní po vylíhnutí). Experiment byl ukončen předávkováním larválních stádií ryb anestetikem tricain methanosulfonátem (MS 222). Po ukončení testu byly odebrány vzorky larev pro hodnocení změn genové exprese vybraných genů za pomoci metody qRT-PCR, vzorky pro stanovení ukazatelů oxidačního stresu a vzorky pro histopatologické vyšetření. Pro vyhodnocení efektů na biomarkery oxidačního stresu byly po ukončení testu stanoveny aktivity antioxidantních enzymů, dále bylo zhodnoceno lipoperoxidační poškození tkání, poškození proteinů a DNA, také byly posouzeny případné histopatologické změny. Na základě získaných výsledků byly stanoveny hodnoty nejvyšší koncentrace testovaného vzorku nevyvolávající žádné pozorovatelné účinky (NOEC) a nejnižší koncentrace testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky (LOEC).

## Výsledky

V rámci projektu byly provedeny testy akutní toxicity na embryonálních stádiích ryb s léčivými gabapentinem a lamotriginem a test subchronické toxicity (embryo-larvální test toxicity) s léčivem gabapentinem. Z výsledků testů akutní toxicity vyplývá, že gabapentin je pro embryonální stádia ryb toxičtější než lamotrigin a že embrya kapra obecného i dánia pruhovaného vykazují obdobnou citlivost vůči gabapentinu. U embryí kapra obecného exponovaných gabapentinu byla pozorována retardace vývoje (opožděné líhnutí) v čase 72 hodin po oplození ve všech exponovaných skupinách ve srovnání s kontrolou a dále zvýšený srdeční tep u všech exponovaných skupin s výjimkou nejnižší testované koncentrace 0,3 µg/L. Embrya exponovaná koncentrací 100 000 µg/L měla dále kratší délku těla ve srovnání s kontrolou. U embryí dánia pruhovaného exponovaných gabapentinu bylo opožděné líhnutí pozorováno u všech exponovaných skupin s výjimkou nejnižší testované koncentrace 0,3 µg/L a zrychlený srdeční tep ve srovnání s kontrolou byl pozorován u všech skupin. V testech embryonální toxicity s lamotriginem vykazoval kapr obecný vyšší citlivost ve srovnání s dániem. Retardace vývoje (opožděné líhnutí) bylo pozorováno v koncentracích 0,1; 1; 10; 1 000 a 100 000 µg/L a zrychlený srdeční tep ve všech exponovaných skupinách. U embryí dánia pruhovaného byla pozorováno pouze opožděné líhnutí v koncentracích 1 a 100 µg/L. V testu embryo-larvální toxicity s léčivem gabapentinem nebyl pozorován statisticky výrazný rozdíl v mortalitě ani rychlosti vývoje ve srovnání s kontrolou. Byla ale zaznamenána statisticky významně vyšší hmotnost i délka jedinců exponovaných koncentrací 10 000 µg/L ve srovnání s kontrolou.

Dále byly provedeny testy akutní toxicity na embryonálních stádiích kapra obecného a dánia pruhovaného s azolovými fungicidy tebukonazolem, difenokonazolem a jejich metabolitem 1,2,4-triazolem a test subchronické toxicity s tebukonazolem na raných vývojových stádiích kapra obecného. Z výsledků testů akutní toxicity vyplývá, že tebukonazol je toxičtější pro kapra obecného než pro dánio pruhované. U embryí kapra obecného byla pozorována zvýšená mortalita (v koncentraci 15 000 µg/L), opožděné líhnutí (v koncentracích 50; 5 000; 10 000 a 15 000 µg/L), zrychlený srdeční tep (v koncentraci 10 000 µg/L), zpomalený srdeční tep (v koncentracích 0,5 a 50 µg/L) a kratší délka těla (v 15 000 µg/L). U embryí dánia pruhovaného byla po expozici tebukonazolu pozorována kratší délka těla u všech jedinců ve srovnání s kontrolou. Rovněž výsledky testů embryonální toxicity s difenokonazolem naznačují, že je tato látka více toxická pro kapra obecného. U tohoto druhu byla během testu pozorována zvýšená mortalita (v 5000 µg/L), opožděné líhnutí (ve všech skupinách), zvýšená četnost malformací (v 5000 µg/L), snížená frekvence srdečního tepu (v 1000 a 5000 µg/L) a kratší délka těla (v 5000 µg/L). U embryí dánia pruhovaného bylo po expozici difenokonazolem pozorováno opožděné líhnutí (v 5000 µg/L), zvýšený výskyt malformací (v 5000 µg/L), zpomalený srdeční tep (v 1000 a 5000 µg/L) a kratší délka těla (v 5000 µg/L). Metabolit 1,2,4-



triazol je ve srovnání s tebukonazolem a difenokonazolem méně toxický. U embryí dánia pruhovaného však bylo pozorováno opožděné líhnutí u všech skupin s výjimkou koncentrace 10 000 µg/L. U embryí kapra obecného pak byla pozorována kratší délka těla v koncentraci 100 000 µg/L a opožděné líhnutí v koncentracích 10 000 a 100 000 µg/L. V testu embryo-larvální toxicity s ranými vývojovými formami kapra obecného byla pozorována pouze zvýšená mortalita v koncentracích 1, 100 a 1000 µg/L.

### **Závěr**

Cílem studie bylo zhodnocení účinků léčiv (gabapentin a lamotrigin) a azolových fungicidů (tebukonazol, difenokonazol a jejich metabolit 1,2,4 triazol) a jejich vzájemné kombinace na raná vývojová stádia ryb modelových druhů kapr obecný (*Cyprinus carpio*) a dáanio pruhované (*Danio rerio*). Výsledky předložené studie prokázaly, že testované látky mají významný vliv na mortalitu v nejvyšších koncentracích. Dále měly všechny látky negativní vliv na míru líhnutí vyjma tebukonazolu, jež byl testován na dániu, kde nebyl zaznamenán žádný statisticky signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolou. Srdeční tep a délka těl jedinců byla negativně ovlivněná také.

### **Seznam literatury:**

Nataraj, B., Hemalatha, D., Malafaia, G., Maharajan, K., Ramesh, M. "Fishcide" effect of the fungicide difenoconazole in freshwater fish (*Labeo rohita*): A multi-endpoint approach. *Science of The Total Environment*. 2023. 857 (2): 159425.

Peris, A., Barbieri, M.V., Postigo, C., Rambla-Alegre, M., López de Alda, M., Eljarrat, E. Pesticides in sediments of the Ebro River Delta cultivated area (NE Spain): Occurrence and risk assessment for aquatic organisms. *Environmental Pollution*. 2022. 305: 119239.

Li, X., Zhou, S., Qian, Y., Xu, Z., Yu, Y., Xu, Y., He, Y., Zhang, Y. The assessment of the ecotoxicological effect of gabapentin on early development of zebrafish and its antioxidant system. *The Royal Society of Chemistry Advances*. 2018. 8(40): 22777-22784.

Státní ústav pro kontrolu léčiv. Souhrnné údaje o dodávkách léčivých přípravků do lékáren a dalších zdravotnických zařízení [online]. [vid 23.7.2023]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/rok-2022>.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA 219/2023/FVHE***

# **Volba zastávek a překonávání přírodních bariér během migrací u telemetricky značených dravců v souvislosti s veterinárně hygienickými aspekty**

Šimon Krejčí<sup>1</sup>, Jan Škrábal<sup>1</sup>, Ivan Literák<sup>1</sup>

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

## **Úvod**

Migrující ptáci jsou během dálkových migrací nuceni překonávat různé formy biotických a abiotických překážek. U mnoha druhů dravců, jako například moták pochop (*Circus aeruginosus*) nebo luňák červený (*Milvus milvus*) mohou být migrační trasy výrazně ovlivněny měnícími se atmosférickými podmínkami (1). Výše zmíněné druhy jsou schopny migrovat na vzdálenosti globálních měřítek a zároveň se jedná o sociální druhy, které komunálně nocují na společných nocovištích v počtech desítek až stovek jedinců. Mimo jiné se také jedná o zástupce druhů, které se mohou přizpůsobit na skládkách komunálních odpadů, obzvláště v době zimování (1).

Volně žijící ptáci mohou působit jako vektor pro různé patogeny a rozšiřovat je v globálním hledisku. Zároveň také v sedentárních populacích mohou zastávat funkci rezervoáru pro některé patogeny. Příkladem může být přenos a udržování v populaci ptáků virus západonilské horečky, kde zejména dravci napříč Egyptem fungují jako rezervoár a mohou zapříčinit transmissi viru (2). Během programu monitoringu u volně žijících ptáků v severní Itálii, který probíhal od roku 2006 do roku 2021, byla zjištěna přítomnost larev *Trichinella pseudospiralis* u motáka pochopa. Tento druh hlístic může být přenosný na savce, včetně lidí (3). Na hnízdištích luňáků červených ve Francii byla u mláďat zjištěna přítomnost parazitů ze skupiny Hematozoa. Biotopy v této oblasti zároveň slouží jako zimoviště luňáků červených pocházejících ze střední Evropy. Ne všichni luňáci červení jsou tažní, na Iberském poloostrově zůstává i část populace sedentárně (4).

Hlavním cílem práce bylo zjistit migrační a časoprostorové strategie dravců, původem ze střední Evropy, při překonávání biotických a abiotických překážek pomocí moderních metod, jako je GPS-GSM telemetrie. Dalšími cíli bylo rozšířit počet telemetricky značených ptáků pro studium dálkových migrací a zpracování telemetrických dat.

## **Materiál a metodika**

V hnízdní sezóně 2023 byla pro rozšíření datasetu označena mláďata dravců původem ze střední Evropy vysílačkami OrniTrack, vyráběné firmou Ornitela. Mláďata byla označena na základě výjimky z ochranných podmínek zvláště chráněných živočichů stanovených v ust. § 5 odst.

2 zákona č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny na území České republiky, v případě zahraničních značení dle platných zákonů příslušného státu.

Získaná data byla zpracována pomocí licencovaných a freeware softwarů je ArcGIS, Google Earth Engine a R Studio Software. Byly zjišťovány časoprostorové aktivity motáků pochopů migrujících i sedentárních. Pro zjištění výběru zastávek u migrací přes abiotické překážky byla využita metoda dálkového průzkumu povrchu umožňující kvantifikovat data ze satelitních snímků v souvislosti s telemetrickými daty jednotlivých sledovaných jedinců. Pomocí programu Google Earth Engine byl zjištěn NDVI (Normalised Difference Vegetation Index) určující zelenost krajiny u zastávek migrujících dravců právě přes abiotické překážky severní Afriky. Dále byl pomocí GLMM (Generalized Linear Mixed Model) vypočítán predikovaný efekt NDVI na pravděpodobnost využití oblasti jako zastávky během migrace a následně bylo prozkoumáno časování zastávek během podzimní i jarní migrace.

Ke zjištění preferencí u dvou sedentárních motáků pochopů (značení v deltě řeky Evros, Řecko a na Iberském poloostrově, Portugalsko) byly využity metody ke kvantifikaci jejich domovských okrsků, biotopové preference a jejich vývoj v průběhu roku. Pro jedince byly vypočítány hodnoty MCP (Minimal Convex Polygon), KDE (Kernel Density Estimation), dBBMM (dynamic Brownian Bridge Movement Model) a dále byly jejich časoprostorové aktivity porovnány s volně dostupným mapovým podkladem CORINE Land Cover pro zjištění biotopových preferencí a případné možnosti využívání antropogenních oblastí pro získávání potravy.

## Výsledky

U migrujících motáků pochopů mezi lety 2007 a 2023 byla zjištěna statisticky významná pozitivní preference ( $p < 0.01$ ) pro oblasti s vyšší NDVI pro zastávky během migrací přes Saharu. Při zpracování GLMM modelu bylo zjištěno, že se zvyšující se hodnotou NDVI se zvyšuje i šance na využití dané oblasti pro zastávku během migrace. V případě modelů byl zjištěn vyšší význam NDVI při jarních migracích. Po prozkoumání načasování zastávek během jarní a podzimní migrace přes Saharu bylo zjištěno, že během jarních migrací (29 % ze zaznamenaných zastávek) motáci pochopi častěji využívali zastávky během dne oproti podzimním migracím (15 % ze zaznamenaných zastávek).

U sedentárního motáka pochopa v oblasti delty řeky Evros byl zjištěn domovský okrsek pomocí dBBMM 158 km<sup>2</sup>, zatímco u jedince obývajícího Iberský poloostrov 1488 km<sup>2</sup>. Jádrové oblasti měly rozlohu 21 km<sup>2</sup> u jedince značeného v Řecku a 314 km<sup>2</sup> u jedince značeného v portugalsku. Po propojení telemetrických dat s mapovým podkladem CORINE Land Cover bylo

zjištěno, že z hlediska dostupnosti habitatů, řecký jedinec preferoval nezavlažovanou ornou půdu a vodní toky významně více oproti ostatním dostupným habitatům. Oproti tomu využití rýžových polí a pastvin bylo mnohem nižší. Jedinec značený na Iberském poloostrově projevil preferenci ke slaniskům, vnitrozemním mokřadům a skládkám komunálních odpadů z hlediska dostupnosti těchto habitatů. Naopak bylo zjištěno vyhýbání se oblastem s trvalým zavlažováním, extenzivním hospodářským oblastem a dále také habitatům s nízkými keřovitými rostlinami.

### Závěr

Dálkový průzkum povrchu s využitím satelitů a propojení takto získaných informací s telemetrickými daty významně obohacuje informace o ekologii motáků pochopů. Data obohacená o údaje NDVI vyzdvihují nezastupitelnost vegetace během migračních zastávek při překonávání výrazných abiotických překážek, jako je například Sahara. Propojení habitatových podkladů CORINE Land Cover s telemetrickými daty ukázalo, že i v antropogenně pozměněné krajině jsou sedentární motáci schopni tyto oblasti tolerovat a dokonce z nich i profitovat. Tato data jsou velmi cenná pro přímou ochranu druhů a biotopů, které využívají.

### Seznam literatury:

- 1) FERGUSON-LEES, J.; CHRISTIE, D., A.; FRANKLIN, K.; MEAD, D.; BURTON, P: Raptors of the world. Helm Identification Guides. Houghton Mifflin Harcourt, 2001.
- 2) VIDAÑA, B.; BUSQUETS, N.; NAPP, S.; PÉREZ-RAMÍREZ, E.; JIMÉNEZ-CLAVERO, M., Á.; JOHNSON, N: The Role of Birds of Prey in West Nile Virus Epidemiology. *Vaccines* 2020, 8, 550. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030550>.
- 3) RUGNA, G.; MARUCCI, G.; BASSI, P.; GELMINI, L.; D'ANNUZIO, G.; TORREGGIANI, C.; PUPILLO, G.; RUBINI, S.; DI DONATO, A.; MAIOLI, G.; GARBARINO, C.; TAMBA, M. *Trichinella* surveillance program in wild birds, Emilia-Romagna (northern Italy), 2006-2021. First report of *Trichinella pseudospiralis* in western marsh harrier (*Circus aeruginosus*) in Italy. *The International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 2022, 30, 191–195. doi: 10.1016/j.ijppaw.2022.09.006.
- 4) COEURDASSIER, M.; BASSIN, N.; THIBAUT, P., CHRISTOPHE, M.; AFONSO E: Prevalence of hematozoan parasites in Red Kite nestlings from France. *Journal of Ornithology*, 2020, 162. doi: 10.1007/s10336-020-01838-w.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 204/2023/FVHE***

# Celogenomové sekvenování jako nástroj pro sledování cest šíření rezistentních kmenů

## *Klebsiella* spp. z odpadních vod do prostředí

Jarmila Laušová<sup>1,2</sup>, Lenka Davidová Geržová<sup>2</sup>, Iva Sukkar<sup>2</sup>, Pavlína Zakopalová<sup>1</sup>, Monika Dolejská<sup>1,2</sup>

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

### Úvod

V posledních desetiletích se antibiotická rezistence stala jednou z nejvýznamnějších hrozeb pro světové veřejné zdraví a potravinovou bezpečnost. Je příčinou delších hospitalizací v nemocnicích, vyšších nákladů na léčbu a také zvýšené úmrtnosti<sup>1</sup>. Bakteriální druhy patřící do rodu *Klebsiella*, zejména *Klebsiella pneumoniae*, jsou dobře známé oportunní nemocniční patogeny s potenciálem šířit se mimo nemocnice cestou odpadních vod. Jsou častou příčinou onemocnění vyžadujících hospitalizaci včetně pneumonií, infekcí močových cest a bakteriemií. Výskyt těchto bakterií v nemocnicích a v prostředí, a to zejména těch rezistentních na antibiotika, je významným problémem pro životní prostředí a veřejné zdraví<sup>2</sup>. Městské čistírny odpadních vod jsou místem, kde se odstraňují hlavní kontaminanty před návratem do přírodního prostředí. Během čištění však nejsou zcela odstraněny zbytky antibiotik, rezistentní bakterie a geny rezistence k antibiotikům a tyto kontaminanty jsou následně vypouštěny do okolního prostředí. Vodní prostředí funguje jako klíčové spojení mezi lidmi, zvířaty a přírodou, poskytující nejen neomezený zdroj živin, ale také vhodné prostředí pro šíření rezistentních bakterií<sup>3</sup>. V současné době je těžké říct, zda přítomnost patogenních rezistentních bakterií v nemocničních odpadních vodách představuje potenciálně větší riziko pro lidské zdraví než těch, které se vyskytují v komunálních odpadních vodách, což zdůrazňuje potřebu studií analyzujících jak nemocniční odpadní vody, tak i komunální odpadní vody a jejich následný vliv na vodní prostředí<sup>4</sup>

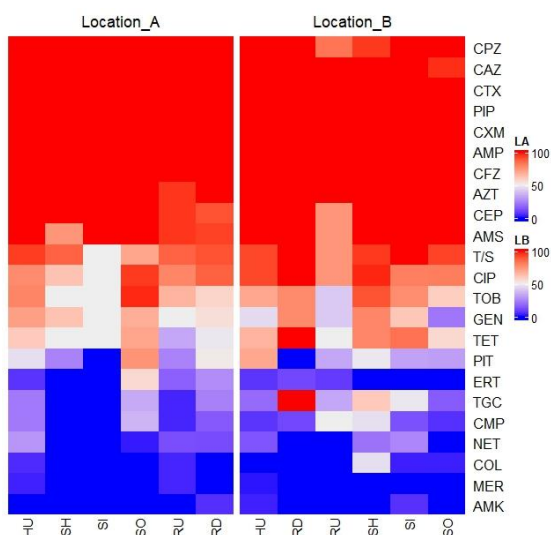
### Materiál a metodika

V roce 2020 a 2021 byly ve dvou různých termínech odebrány vzorky vod z čistíren odpadních vod (ČOV) a řek ve dvou lokalitách (A, B) v České republice. Bylo odebíráno 5 různých typů vod v každé lokalitě a termínu: 1. odpadní voda z nemocnic, 2. odpadní voda přitékající na ČOV, 3. přečištěná voda odtékající z ČOV, 4. voda z řeky nad ČOV a 5. voda z řeky pod výtokem z ČOV. Ve stejném období byly sbírány rezistentní izoláty *Klebsiella pneumoniae* od pacientů z nemocnic. Pomocí selektivní kultivace na miskách s *Klebsiella* ChromoSelect Selective agarem a MacConkeyho agarem s přídatkem cefotaximu v koncentraci 2 mg/l, nebo meropenemu v koncentraci 0,125 mg/l bylo získáno 374 čistých izolátů, které byly druhově upřesněny pomocí hmotnostní spektrometrie

MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) jako *Klebsiella pneumoniae* complex (KLPNc). U všech izolátů byla stanovena minimální inhibiční koncentrace k 24 antimikrobiálním látkám pomocí setu MIKROLATEST® MIC, od firmy Erba Lachema a zjištěna produkce širokospektrých beta-laktamáz (ESBL) a AmpC betalaktamáz pomocí MASTDISCS® Combi testu. U všech izolátů byla izolována celogenomová DNA pomocí kitu NucleoSpin Tissue od firmy Macherey-Nagel. Tato DNA byla sekvenována na platformě Illumina (HiSeq). Získaná sekvenační data byla assemblována prostřednictvím softwaru Trimmomatic 0.39 a SPAdes 3.13.1. Geny rezistence, typy plazmidů a sekvenční typ izolátu byly určeny pomocí volně dostupných CGE nástrojů ResFinder, PlasmidFinder, pMLST a MLST (<http://www.genomicepidemiology.org>). Fylogenetická příbuznost izolátů byla stanovena analýzou jednonukleotidových polymorfismů v core genomu bakterií použitím programů Prokka, PIRATE a RAxML, k vizualizaci fylogenetického stromu byl použit software iTOL 6.6.

## Výsledky

Celkem bylo získáno 374 izolátů KLPNc z nemocniční odpadní vody (n=95), přítoků (n=55) a odtoku (n=63) z městské ČOV, z řeky nad (n=13) a pod (n=17) ČOV a od pacientů z nemocnic (n=131). Testování citlivosti k antibiotikům ukázalo, že 95 % izolátů (n=354) je multirezistentních, přičemž nejčastěji byla zjištěna rezistence k cefalosporinům (100 %, n=374), trimetoprimu (91 %, n=340), ciprofloxacinu (86 %, n=323), aminoglykosidům (80 %, n=298) a tetracyklinům (67 %, n=251). Také byla pozorována rezistence k zásobním antibiotikům jako jsou karbapenemy (15 %, n=56) nebo kolistin (8 %, n=31) (Obrázek č. 1). Produkce širokospektrých beta-laktamáz byla zjištěna u 95 % izolátů.



Obrázek č. 1 Heatmapa: Znázornění citlivosti k antibiotikům v rámci lokalit a typu vzorků.

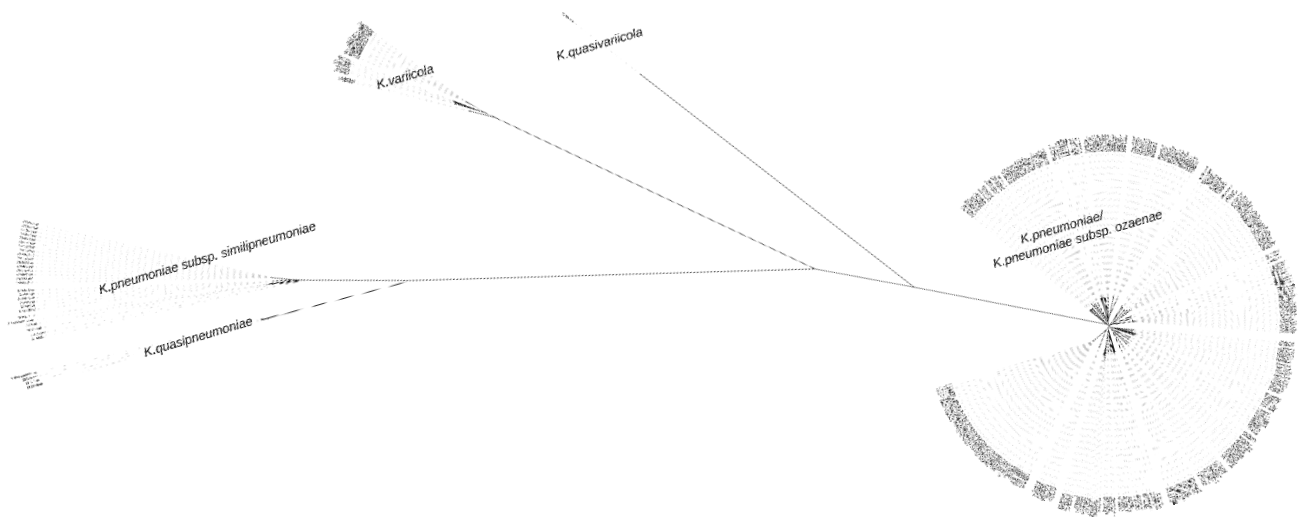
HU – pacienti; SH – nemocniční odpadní voda; SI – přítok na městskou ČOV, SO – odtok z městské ČOV, RU – řeka nad ČOV; RD – řeka pod ČOV

CPZ – cefoperazon; CAZ – ceftazidim; CTX – cefotaxim; PIP – piperacilin; CXM – cefuroxim; AMP – ampicilin; CFZ – cefazolin; AZT – aztreonam; CEP – cefepim; AMS – ampicilin/sulbaktam; T/S – trimetoprim/sulfometaxazol; CIP – ciprofloxacin; TOB – tobramycin; GEN – gentamycin; TET – tetracyklín; PIT – piperacilin/tazobaktam; ERT – ertapenem; TGC – tigecyklin; CMP – chloramfenikol; NET – netilmicin; COL – kolistin; MER – meropenem; AMK – amikacin

Z celogenomových sekvenačních dat bylo zjištěno, že rezistence k cefalosporinům byla kódovaná nejčastěji geny *bla*<sub>CTX-M</sub>, přičemž z 99 % variantou *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, u třech izolátů se jednalo o *bla*<sub>CTX-M-1</sub> a u dvou izolátů o *bla*<sub>CTX-M-55</sub>. Geny zodpovědné za rezistenci ke karbapenemům byly nalezeny u

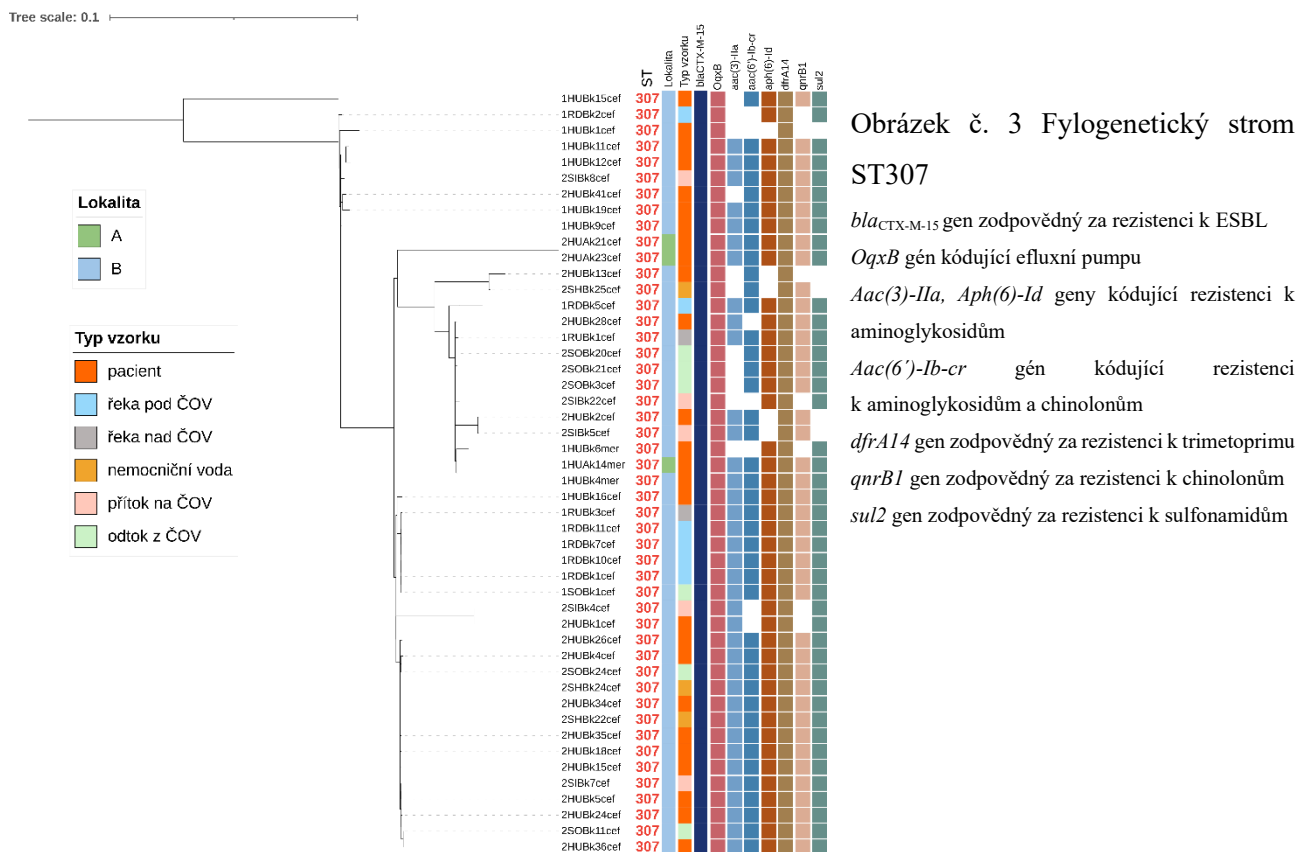
izolátů z obou lokalit a ze všech typů vzorků kromě říční vody, jednalo se o geny *bla*<sub>GES-5</sub> (n=10, přítok a odtok z ČOV), *bla*<sub>OXA-48</sub> (n=4, pacienti), *bla*<sub>NDM-1</sub> (n=4, nemocniční odpadní voda a pacient) a *bla*<sub>KPC-3</sub> (n=1, nemocniční odpadní voda). Mezi další často detekované geny patří *sul2* odpovědný za rezistenci k sulfonamidům, *aph(6)-I<sub>d</sub>* zajišťující rezistenci k aminoglykosidům nebo *qnrB1*, který poskytuje rezistenci k chinolonům.

KLPNc zahrnuje několik druhů a poddruhů *Klebsiella*. Pomocí analýzy sekvenčních typů a *in-situ* DNA-DNA hybridizace bylo možné rozčlenit izoláty do několika skupin: největší podíl, 58 %, tvořila skupina *K. pneumoniae sensu stricto*, menší skupina *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* tvořila 27 % a následovali skupiny *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* 7 %, *K. variicola* 7 %, dva izoláty *K. quasipneumoniae sensu stricto* a jeden izolát *K. quasivariicola* (Obrázek č. 2).



Obrázek č. 2 Fylogenetický strom příbuznosti druhů a poddruhů *Klebsiella* z *Klebsiella pneumoniae* komplexu

Celkem bylo identifikováno 78 sekvenčních typů (ST), přičemž nejčastěji detekovaným byl ST307 (n=52), který byl nalezen ve všech typech vzorků, nejčastěji z lokality B. Mezi další často identifikované ST patří ST405 (n=19), ST29 (n=17) a ST616 (n=17). Fylogenetická analýza a analýza jednonukleotidových polymorfismů (SNPs) potvrdila blízkou příbuznost izolátu linie ST307. Rozdíl v rozmezí 17-21 SNPs mezi izoláty z pacientů, přítoku na městskou ČOV a vodou v řece pod ČOV v lokalitě B z prvního odběru potvrzuje klonální šíření tohoto sekvenčního typu (Obrázek č. 3).



## Závěr

Cílem této studie bylo zjistit, zda se ESBL-produkující bakterie rodu *Klebsiella* mohou šířit z prostředí nemocnic do životního prostředí cestou odpadních vod. Výsledky studie potvrzují šíření těchto patogenních rezistentních bakterií z nemocnic, přes čistírny odpadních vod až do povrchových vod, odkud se můžou následně šířit dál do životního prostředí. Tato studie tak potvrzuje důležitost monitorování výskytu těchto bakterií v nemocničních a městských odpadních vodách.

## Seznam literatury:

- IRITI, M., VITALINI, S., VARONI, E. M.; Humans, animals, food and environment: One health approach against global antimicrobial resistance. *Antibiotics*. 2020, 9(6), 346.
- KING, T. L. B., SCHMIDT, S., ESSACK, S. Y.; Antibiotic resistant *Klebsiella* spp. from a hospital, hospital effluents and wastewater treatment plants in the uMgungundlovu District, KwaZulu-Natal, South Africa. *Science of The Total Environment*. 2020, 712, 135550.
- MIŁOBEDZKA, A., FERREIRA, C., VAZ-MOREIRA, I., CALDERÓN-FRANCO, D., GORECKI, A., PURKRTOVA, S., BARTACEK, J., DZIEWIT, L., SINGLETON, C. M., HALKJÆR NIELSEN, P., WEISSBRODT, D. G., MANAIA, C. M.; Monitoring antibiotic resistance genes in wastewater environments: The challenges of filling a gap in the One-Health cycle. *Journal of Hazardous Materials*. 2022, 424 (C), 127407.
- LARSSON, J., ANDREMONT, A., BENGTSSON-PALME, J., KOEFOED BRANDT, K., RODA HUSMAN, A. M., FAGERSTEDT, P., FICK, J., FLACH, C. F., GAZE, W. H., KURODA, M., KVINT, K., LAXMINARAYAN, R., MANAIA, C. M., NIELSEN, K. M., PLANT, L., PLOY, M. C., SEGOVIA, C., SIMONET, P., SMALLA, K., SNAPE, J., TOPP, E., HENGEL, A. J., VERNER-JEFFREYS, D. W., VIRTA, M. P. J., WELLINGTON, E. M., WERNERSSON, A. S.; Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance. *Environment International*. 2018, 117, 132-138.

**Tato práce byla financována grantem IGA VETUNI 212/2023/FVHE**



## Adaptace bakteriálních kmenů rezistentních ke karbapenemům a jejich interakce s mobilními genetickými elementy

Ivo Papoušek<sup>1</sup>, Jana Palkovičová<sup>2</sup>, Michaela Růžičková<sup>1,2</sup>, Pavlína Zakopalová<sup>1</sup>, Adam Valček<sup>2</sup>,  
Monika Dolejská<sup>1,2</sup>

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

### Úvod

Volně žijící zvířata představují důležitý rezervoár antibiotické rezistence. Předchozí studie demonstrovaly, že i klinické kmeny pocházející z nemocničních zařízení se mohou dostávat do prostředí a dále se šířit prostřednictvím volně žijících zvířat [1][2]. Mezi významná volně žijící zvířata přispívající k šíření rezistence patří volně žijící ptáci, zejména racci, kteří se živí snadno dostupnou potravou spojenou s antropogenními aktivitami.

Karbapenemy, považované za antibiotika poslední volby, patří mezi klinicky významné skupiny antibiotik. Z tohoto důvodu představuje šíření karbapenemáz, tj. enzymů, které karbapenemy štěpí, potenciální ohrožení veřejného zdraví. I přesto, že přenos karbapenemáz je úzce spjatý s nemocničními zařízeními, kmeny nesoucí geny pro karbapenemázy byly zaznamenány i mimo klinická zařízení. IMP-4 karbapenemáza byla v rámci předchozí studie identifikována u izolátů z racků australských (*Chroicocephalus novaehollandiae*) z kolonie Five Islands v Austrálii [2]. U zjištěných kmenů čeledi Enterobacteriaceae byla převážně kódovaná na plasmidech (72 %, 86/120), zejména plasmidech inkompatibilní (Inc) skupiny HI2 (IncHI2) schopných horizontálního přenosu. Při testování schopnosti konjugačního přenosu plazmidů nesoucích gen *bla*<sub>IMP-4</sub> byly pozorovány změny ve velikosti plazmidů [1].

Plasticita a dynamika mobilních genetických elementů (MGE), zejména plazmidů, může hrát významnou úlohu v adaptaci bakteriálních kmenů [3]. Proto bylo cílem tohoto projektu analyzovat mikroevoluční změny IncHI2 plazmidů schopných šířit gen *bla*<sub>IMP-4</sub>, který poskytuje rezistenci ke karbapenemům.

### Materiál a metodika

Na základě přítomnosti různých variant IncHI2 plazmidů kódujících IMP-4 karbapenemázu bylo ze sbírky izolátů z racků australských vybráno 42 izolátů (*Escherichia coli*, n=40; *Klebsiella pneumoniae*, n=1; *Salmonella enterica*, n=1). Tyto izoláty byly podrobeny sekvenování krátkými čteními na platformě NovaSeq 6000 (Illumina).

Předběžná analýza obsahu plazmidů z Illumina sekvenování ukázala, že plazmidy měnící velikost patří do sekvenčního typu 3 (IncHI2-ST3). Na základě genetického obsahu a příbuznosti izolátů zjištěných Illumina sekvenováním bylo vybráno 20 reprezentativních wild-type (WT) kmenů nesoucích IncHI2-ST3. Podle výsledků pulzní gelové elektroforézy (PFGE) z testování

konjugativního přenosu bylo vybráno 13 transkonjugantů (příslušných sedmi původním WT kmenům), jejichž IncHI2-ST3 plazmidy měnily velikost. Z těchto 33 vybraných kmenů byla extrahována celogenomová DNA pomocí Nanobind CBB Big DNA kitu (Circulomics), připraveny knihovny kitem SQK-RBK004 (Oxford Nanopore Technologies, ONT), a ty následně sekvenovány dlouhými čteními na platformě MinION Mk1b (ONT).

Primární data byla zpracována nástroji Guppy, Porechop a BBDuk. Ze zpracovaných dat byly pomocí programu Unicycler *de novo* poskládány genomy vybraných bakteriálních izolátů. V kompletních sekvencích byly identifikovány přítomnost a typ plazmidů, genů rezistence a determinant virulence nástrojem ABRicate s veřejně dostupnými databázemi PlasmidFinder, pMLST, ResFinder a VFDB. Tak bylo možné rovněž identifikovat lokalizace (chromozom, plazmidy) těchto genetických determinant.

Kompletní cirkulární sekvence plazmidů byly porovnány s výsledky PFGE pro ověření velikosti IncHI2-ST3. Plazmidy byly anotovány pomocí programu Geneious. Strukturní změny pozorované při přenosu 13 plazmidů IncHI2-ST3 z transkonjugantů byly analyzovány porovnáním se sedmi příslušnými WT kmeny pomocí nástroje Mauve a vizualizovány programem clinker. Pro potvrzení dlouhodobé stability variant IncHI2-ST3 plazmidů byl proveden dlouhodobý evoluční experiment (LTE, long-term evolution experiment) po dobu přibližně 360 bakteriálních generací.

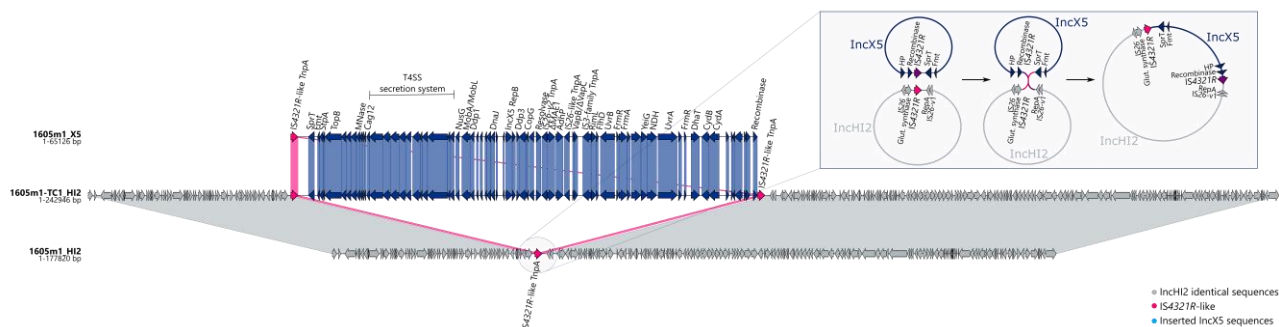
### Výsledky

Illumina sekvenování testovaných 42 WT izolátů identifikovalo přítomnost genetických determinant antibiotické rezistence pro pět a více skupin antibiotik. Bakteriální kmeny nesly plazmidové replikony různých Inc skupin, mezi nimi IncHI2, IncF-type, IncI1, IncN, IncP1, IncQ1, IncR, IncX1, IncX5 a IncY. Bylo zjištěno, že IncHI2 plazmidy, které kódují IMP-4 karbapenemázu a při konjugacním přenosu mění velikost, jsou IncHI2-ST3 plazmidy.

ONT sekvenování vybraných 33 izolátů ukázalo, že většina zjištěných determinant antibiotické rezistence se nachází na IncHI2-ST3 plazmidech. U většiny analyzovaných IncHI2-ST3 byly navíc detekovány geny pro neantibiotickou rezistenci: rezistence k těžkým kovům u 93,9 % (31/33) izolátů a k formaldehydu u 24,2 % (8/33) izolátů. Většina plazmidů (84,9 %, 28/33) měla v genomu pomocí inzerční sekvence (IS) 26-v1 (IS26-v1) začleněný plazmidový replikon IncN. Velikost původních IncHI2-ST3 ve WT kmenech byla 176 až 317 kilobází (kb) a při testování přenosu se jejich velikost zvyšovala či snižovala až o 150 kb.

Analýzou IncHI2-ST3 ze sedmi WT izolátů a 13 transkonjugantů byly identifikovány kointegrace s jinými plazmidy přítomnými v bakteriální buňce (viz Obr. 1). IncHI2-ST3 do své sekvence začleňovaly celé plazmidy. Nejčastějším kointegrátem byl IncHI2-X5, ale identifikovány byly i kointegráty IncHI2-P1 a IncHI2-F-type, který zformoval megaplazmid o velikosti 401 kb.

Kointegrát IncHI2-X5 byl navíc pozorován i u dvou WT kmenů získaných z volně žijících racků australských. Integrace plazmidů do IncHI2-ST3 proběhla homologní rekombinací jiných MGE: inzerčních sekvencí (*IS4321R*, *IS1R*) a transpozonů (*TnAs1*). Inkorporace jiných plazmidů může zvyšovat spektrum kompatibilních hostitelů a rovněž umožňuje koexistenci více plazmidů jedné Inc skupiny v bakteriální buňce, což je jinak nemožné. To jsme pozorovali i v rámci této studie, kde v jedné buňce byly přítomny čtyři varianty IncHI2-ST3 plazmidu.



**Obr. 1** Začlenění IncX5 plazmidu do IncHI2-ST3 plazmidu zprostředkované homologní rekombinací *IS4321R* přítomné na IncX5 a IncHI2-ST3.

V důsledku inkorporace jiných plazmidů začlenily IncHI2-ST3 do své sekvence rovněž geny pro konjugaci, syntézu ATP, ale i determinanty virulence a geny pro antibiotickou i neantibiotickou rezistenci (viz Tab. 1). Díky tomu mohou být IncHI2-ST3 schopny zvyšovat frekvenci své konjugace, což podporuje jejich šíření mezi další bakteriální kmeny.

**Tab. 1** Porovnání velikosti plazmidů a přítomnosti determinant antibiotické a neantibiotické rezistence identifikovaných na IncHI2-ST3 u kmenů, jejichž plazmidy vykazovaly strukturální změny.

ID	Původ kmene	Velikost plazmidu (kb)	RIF <i>arr-3</i>	AG		TET <i>tet(A)</i>	MK <i>mph(A)</i>	FQ <i>aac(6)-Ib-ct</i>	AF <i>sulI</i>	Beta-laktamy			QC <i>qacΔI</i>	AM <i>catB3</i>	FM <i>formA</i>	Těžké kovy	
				<i>aac(3)-IId</i>	<i>aac(6)-Ib3</i>					<i>bla<sub>IMP-4</sub></i>	<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	<i>bla<sub>TEM-1B</sub></i>				<i>mer</i>	<i>ter</i>
1585m1	WT	327, 236, 160, 150		2x				2x	2x	2x				2x			
	TC1	158															
	TC2	236															
	TC3	202															
1605m1	WT	178															
	TC1	243															
1610m1	WT	248															
	TC1	401			2x						2x						
	TC2	248															

<b>1612m1</b>	<b>WT</b>	252															
	<b>TC1</b>	252															
	<b>TC2</b>	317															
<b>1620m1</b>	<b>WT</b>	252															
	<b>TC1</b>	317															
	<b>TC2</b>	152															
<b>1662m1</b>	<b>WT</b>	281															
	<b>TC1</b>	281															
	<b>TC2</b>	323															
<b>1731m1</b>	<b>WT</b>	252															
	<b>TC1</b>	252															

WT – wild-type kmen, TC – transkonjugant, kb - kilobáze. Černá výplň – přítomnost příslušného genu rezistence. Šedá výplň – gen *bla*<sub>IMP-4</sub>. Na plazmidech byla detekována rezistence k jedné až devíti skupinám antibiotik, u 18/20 plazmidů byla detekována rezistence k těžkým kovům a u 6/20 plazmidů i rezistence k formaldehydu. RIF – rifamyciny, AG – aminoglykosidy, TET – tetracyklyny, MK – makrolidy, FQ – fluorochinolony, AF – antifoláty, QC – kvartérní amoniové sloučeniny (biocidy), AM – amfenikoly, FM – formaldehyd.

Dlouhodobý evoluční experiment potvrdil, že vzniklé varianty plazmidů nepředstavují náhodný záchyt jedné události. Varianty vzniklé při konjugačním přenosu byly stabilní minimálně po dobu 360 generací.

### **Závěr**

IncHI2-ST3 plazmidy kódující karbapenemázu IMP-4 z volně žijících racků australských mohou šířit rezistenci ke karbapenemům a jiným klinicky významným antibiotikům mimo klinické prostředí. Tyto plazmidy jsou schopné do genomu začlenit jiné plazmidy přítomné v bakteriální buňce, čímž dále rozšiřují spektrum nesených genů výhodných pro bakterie. Díky tomu umožňují svým bakteriálním hostitelům adaptovat se na širší spektrum podmínek v prostředí a ulehčují jejich šíření.

### **Seznam literatury:**

- [1] ALM, E. W., et al. Potential for gulls to transport bacteria from human waste sites to beaches. *Science of the Total Environment*. 2018, 615: 123–130.
- [2] DOLEJSKA, M., et al. High prevalence of *Salmonella* and IMP-4-producing Enterobacteriaceae in the silver gull on Five Islands, Australia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016, 71(1): 63–70.
- [3] DIMITRIU, T. A., et al. Increased copy number couples the evolution of plasmid horizontal transmission and plasmid-encoded antibiotic resistance, *PNAS*, 2021, 118(31): 1–7.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 208/2023/FVHE.***

## Stanovení karagenanů metodou ELLA

Martina Pečová, Marie Bartlová, Nina Bestrová, Zuzana Vlasatá, Matej Pospiech

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

### Úvod

Jako karagenany jsou označovány sulfátové polysacharidy získávané z buněk červených mořských řas řádu *Gigartinales*, přičemž mezi významné komerční typy patří hlavně iota ( $\iota$ ), kappa ( $\kappa$ ) and lambda ( $\lambda$ ). Využívány jsou díky své schopnosti vytvářet gel a zvyšovat viskozitu (Hotchkiss et al., 2016). Tyto schopnosti souvisí se změnou textury a jsou v různé míře žádoucí u některých potravinových matric. Texturní změny po přidavků karagenanů byly pozorovány u různých druhů potravin, jako jsou sýry (Ahmad et al. 2016; Černíková et al. 2010), uzeniny (Ayadi et al. 2009), cukrovinky (Song et al. 2022) a jiné. Existují studie, které upozorňují na toxické účinky karagenanů (Pogozhykh et al. 2021). V roce 2018 bylo vydáno stanovisko panelu EFSA, které zkoumalo toxické účinky karagenanů. Závěrem tohoto stanoviska byla maximální denní doporučená dávka (ADI= 75 mg/kg tělesné hmotnosti za den) prozatím potvrzena jako dočasná. Nedostatek informací byl zaznamenán v oblasti chemické struktury. Velmi podobnou až totožnou molekulární strukturu totiž vykazuje jiná látka (označována jako poligenan), která není povolenou potravinářskou přídatnou látkou (Younes et al. 2018).

Karagenan patří mezi aditiva, označované jako E407 podle nařízení Evropského Parlamentu a Rady 1333/2008, a bývá používána jako přísada v potravinářském průmyslu. Oficiální metody jeho detekce ovšem nebyly definovány. Některé metody byly založeny na spektroskopii (Zhang et al. 2019). U jiných byla využita metoda lektinové histochemie, založená na použití specifických proteinů-lektinů (Bartlová et al. 2021). Tyto lektiny jsou schopny vázat konkrétní sacharidy. Mezi lektinové techniky patří také metoda ELLA (Enzyme-Linked Lectin Assay), která však probíhá v 96 jamkové destičce a vykazuje podobnost s ELISA testy. Principiálně jde o metodu spektrometrickou, kde se měřená absorbance odvíjí od koncentrace látky ve vzorku. K barevné změně dochází použitím chromogenu. Cílem této studie bylo metodu optimalizovat, stanovit LOD, LOQ a opakovatelnost.

### Materiál a metodika

Vybrané karagenany (iota, kappa a lambda) byly připraveny do roztoku ve dvou variantách v zásobní koncentraci  $c=1M$ . První varianta přípravy zahrnovala var po dobu jedné hodiny,

následnou filtraci horkého vzorku přes 0,45 um filtry a ředění do koncentrační řady. Druhá varianta byla připravována za pomoci enzymu karagenázy 16 A (Zg Cgk16A) purifikované z *Escherichia Coli* (Nzytech, Portugal). Enzymatická inkubace probíhala jednu hodinu při teplotě 40 °C a pro ukončení aktivity enzymu byly inaktivovány teplotou 100 °C. Vzorky byly filtrovány a ředěny obdobně jako varianta neenzymatická. Samotná ELLA byla optimalizována v několika krocích, vychází však z publikace Patel and Hawes (1988).

Nepřímá ELLA metoda:

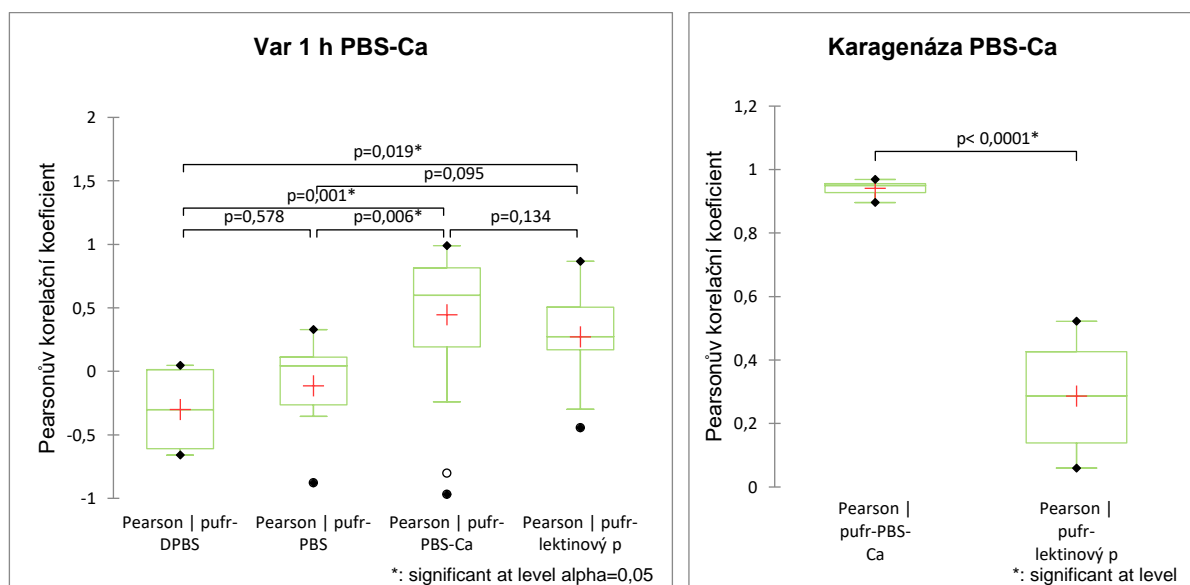
- 1) Pokrytí 96 jamkové destičky nekonjugovaným lektinem PNA v PBS-Ca pufru, v koncentraci 1:500, alespoň 24 h v lednici
- 2) Promytí destičky PBS-Ca puftrem s Tweenem, 3x
- 3) Blokace nespecifické vazby – Carbo-Free Blocking Solution (Vector Laboratories, USA) 200 µl, 30 minut
- 4) Promytí destičky PBS-Ca pufru s Tweenem, 3x
- 5) Aplikace a následná inkubace vzorků, 50 µl, 1 h
- 6) Promytí destičky PBS-Ca puftrem s Tweenem, 3x
- 7) Aplikace lektinu PNA konjugovaného peroxidásoou ředěného v PBS-Ca pufru (1:1000), 50 µl, 1 h
- 8) Promytí destičky PBS-Ca puftrem s Tweenem, 3x
- 9) Aplikace TMB (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine) chromogenu (TMB substrát kit, Vector Laboratories, USA), 50 µl, 15 minut
- 10) Měření absorbance spektrofotometrem (Infinite 200 Pro, Tecan, Austria) při 650 nm
- 11) Přídavek 50 µl 1M kyseliny sírové (Lach-Ner, Czech)
- 12) Měření absorbance spektrofotometrem (Infinite 200 Pro, Tecan, Austria) při vlnové délce 450 nm

### Výsledky a diskuse

Pro reaktivitu lektinů je důležité vhodné prostředí s obsahem příslušných iontů. Zdá se, že některé lektiny vyžadují přítomnost iontů, proto aby byly plně funkční (Ahmad et al. 1999). Z tohoto důvodu byly v první fázi projektu ověřeny vhodné pufrů s různým zastoupením iontů. Jednalo se o DPBS, PBS, lektinový pufr a PBS-Ca. Jejich reaktivita znázorněna jako korelační koeficient koncentračního gradientu je uvedena v grafu 1. Korelace ke koncentračnímu gradientu byla nejvyšší u PBS-Ca a lektinového pufru. U všech pufrů je ale patrný vysoký rozptyl, který je způsoben opětovnou polymerizací karagenanu, což způsobuje

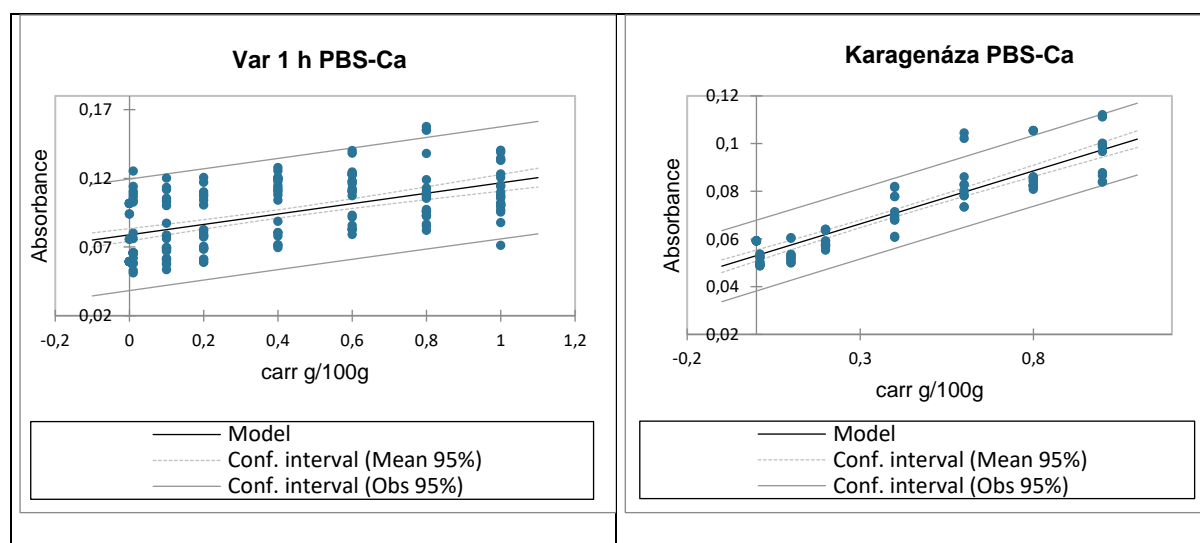
nejednotné výsledky. Zdá se, že se lektiny vážou na terminální konce karagenanu, a jejich absolutní množství tedy určuje intenzitu odpovědi vyvíjené metody (intenzitu zbarvení chromogenu). Pufry s nejvyšší pozitivní korelací ke koncentračnímu gradientu byly použity také pro ověření za použití enzymatické depolymerizace pomocí enzymu karagenázy. Schopnost karagenázy depolymerizovat karagenan je popisována ve studii Zhu et al. (2018). Uvádí se, že další možností, jak změnit molekulovou hmotnost a degradovat tento polysacharid je za použití ultrazvuku (Tecson et al. 2021). Výsledky znázorněné v grafu 1 potvrdily, že mezi použitým pufrem i za použití karagenázy, je statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ). Je patrná vyšší korelace ke koncentračnímu gradientu v případě pufru PBS-Ca. Zaznamenán byl i vyšší rozptyl u lektinového pufru ( $SD=0,178$ ) ve srovnání s PBS-Ca pufrem ( $SD=0,023$ ). V porovnání s depolymerizací varem u lektinového pufru ( $SD=0,35$ ) je ale u této metody rozptyl nižší.

Graf 1: Box plot pro použité pufrы s depolymerizací karagenanu varem a enzymaticky.



Základním předpokladem pro metody využívající měření analytu pomocí změny absorbance v roztoku je schopnost dosáhnout opakujících se výsledků v používaných koncentracích analytu. Pro ověření se používá regresní rovnice. V práci byla použita pro nejlépe reagující metody, a to var 1 h PBS-Ca a karagenáza PBS-Ca viz graf 2.

Graf 2: Regresní rovnice pro var 1 h a enzymatickou depolymerizaci PBS-Ca pufru.



Korelace s koncentrační řadou byla pro var 1 h PBS-Ca  $R=0,55$  ( $p < 0,05$ ) a karagenázu PBS-Ca  $R=0,91$  ( $p < 0,05$ ). Pro obě metody lze tedy použít regresní rovnici a předpokládat shodný výsledek při opakovaných měřeních. Pro ověření metody byly testovány následující parametry LOD, LOQ a opakovatelnost. Testování bylo na dvou nejlépe reagujících metodách var 1 h PBS-Ca a karagenáza PBS-Ca.

LOD pro karagenázu PBS-Ca byl 0,44 g/100g, LOQ byl stanoven 0,48 g/100g. Opakovatelnost byla stanovena na  $R=0,21$  respektive  $R=21$  %. Pro Var 1 h PBS-Ca byl LOD a LOQ srovnatelný. Konkrétně LOD 0,25 g/100g, LOQ byl 0,52 g/100g, opakovatelnost byla  $R=0,45$ , respektive  $R=45$  %. Lepší výsledky a vysokou senzitivitu vykazuje vysokoúčinná kapalinová chromatografie, kde je stanoven LOD= 0,06 g/kg a LOQ= 0,18 g/kg (Sun et al. 2021). Karagenan jako polymer tvoří vysoce stabilní gel, který i když dojde k jeho degradaci varem je schopen znovu polymerizovat. Výsledkem je právě horší opakovatelnost. Za použití enzymu karagenázy, dochází ale k hydrolytickému štěpení vazeb  $\beta$ -1,4 za vzniku oligosacharidů (Michel et al. 2006). Je pravděpodobné, že díky tomu ELLA metoda i opakovaně dosahuje přesnějších výsledků.

## Závěr

Pro průkaz karagenanů je nejvhodnější nepřímá ELLA metoda s enzymatickou depolymerizací karagenanu a za použití PBS-Ca pufru. Tato metoda je schopna detekovat 0,44 g/100g karagenanu a od 0,48 g/100g je metodu možné použít na kvantitativní odhad množství karagenanu ve vzorku. Vysoká odolnost karagenanového gelu a jeho schopnost opětovné



polymerizace bohužel zvyšuje cenu za vyšetření, protože je nutné použít specifický enzym-karagenázu.

## Reference

- AHMAD, Shabbir, Masood Sadiq BUTT, Imran PASHA a Aysha SAMEEN, 2016. Quality of Processed Cheddar Cheese as a Function of Emulsifying Salt Replaced by  $\kappa$ -Carrageenan. *International Journal of Food Properties* [online]. **19**(8), 1874–1883. ISSN 1094-2912. Dostupné z: doi:10.1080/10942912.2015.1085396
- AHMAD, Shama, Rizwan Hasan KHAN a Aftab AHMAD, 1999. Physicochemical characterization of *Cajanus cajan* lectin: effect of pH and metal ions on lectin carbohydrate interaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. **1427**(3), 378–384 [vid. 2023-11-28]. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/S0304-4165(99)00035-5
- AYADI, M.A., A. KECHAOU, I. MAKNI a H. ATTIA, 2009. Influence of carrageenan addition on turkey meat sausages properties. *Journal of Food Engineering* [online]. **93**(3), 278–283. ISSN 02608774. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.01.033
- BARTLOVÁ, Marie, Matej POSPIECH, Zdeňka JAVŮRKOVÁ a Bohuslava TREMLOVÁ, 2021. Detection of Carrageenan in Cheese Using Lectin Histochemistry. *Applied Sciences* [online]. **11**(15), 6903. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app11156903
- ČERNÍKOVÁ, Michaela, František BUŇKA, Matej POSPIECH, Bohuslava TREMLOVÁ, Kristýna HLADKÁ, Vladimír PAVLÍNEK a Pavel BŘEZINA, 2010. Replacement of traditional emulsifying salts by selected hydrocolloids in processed cheese production. *International Dairy Journal* [online]. **20**(5), 336–343. ISSN 09586946. Dostupné z: doi:10.1016/j.idairyj.2009.12.012
- HOTCHKISS, Sarah, et al. The use of carrageenan in food. Carrageenans: sources and extraction methods, molecular structure, bioactive properties and health effects, 2016, 229-243.
- MICHEL, Gurvan, Pi NYVAL-COLLEN, Tristan BARBEYRON, Mirjam CZIZEK a William HELBERT, 2006. Bioconversion of red seaweed galactans: a focus on bacterial agarases and carrageenases. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **71**(1), 23–33. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-006-0377-7
- Patel, P.D. Hawes, G.B. Estimation of food-grade galactomannans by enzyme-linked lectin assay, *Food Hydrocolloids*, 1988, 2(2), 107-118.
- POGOZHYPKH, Denys, Yevgen POSOKHOV, Valeriy MYASOEDOV, Galina GUBINA-VAKULYCK, Tetyana CHUMACHENKO, Oleksandr KNIGAVKO, Hanna POLIKARPOVA, Yuliia KALASHNYK-VAKULENKO, Ketino SHARASHYDZE, Oksana NAKONECHNA, Volodymyr PROKOPYUK, Anatolii ONISHCHENKO a Anton TKACHENKO, 2021. Experimental Evaluation of Food-Grade Semi-Refined Carrageenan Toxicity. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **22**(20), 11178. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms222011178
- SONG, Xinyu, Bor-Sen CHIOU, Yixun XIA, Maoshen CHEN, Fei LIU a Fang ZHONG, 2022. The improvement of texture properties and storage stability for kappa carrageenan in developing vegan gummy candies. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. **102**(9), 3693–3702. ISSN 0022-5142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.11716

SUN, Yanqin, Xudong ZHU, Xixi SHEN a Wei WANG, 2021. Determination of Carrageenan in Livestock and Poultry Meat by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *International Journal of Analytical Chemistry* [online]. **2021**, 1–8. ISSN 1687-8779. Dostupné z: doi:10.1155/2021/5277453

TECSON, Mariel G., Lucille V. ABAD, Virgilio D. EBAJO a Drexel H. CAMACHO, 2021. Ultrasound-assisted depolymerization of kappa-carrageenan and characterization of degradation product. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. **73**, 105540 [vid. 2023-11-28]. ISSN 13504177. Dostupné z: doi:10.1016/j.ultsonch.2021.105540

YOUNES, Maged, Peter AGGETT, Fernando AGUILAR, Riccardo CREBELLI, Metka FILIPIČ, Maria Jose FRUTOS, Pierre GALTIER, David GOTT, Ursula GUNDERT-REMY, Gunter Georg KUHNLE, Claude LAMBRÉ, Jean-Charles LEBLANC, Inger Therese LILLEGAARD, Peter MOLDEUS, Alicja MORTENSEN, Agneta OSKARSSON, Ivan STANKOVIC, Ine WAALKENS-BERENDSEN, Rudolf Antonius WOUTERSEN, Matthew WRIGHT, Leon BRIMER, Oliver LINDTNER, Pasquale MOSESSO, Anna CHRISTODOULIDOU, Sofia IOANNIDOU, Federica LODI a Birgit DUSEMUND, 2018. Re-evaluation of carrageenan (E 407) and processed Eucheuma seaweed (E 407a) as food additives. *EFSA Journal* [online]. **16**(4). ISSN 18314732. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2018.5238

ZHANG, Yue, Hongzhe JIANG a Wei WANG, 2019. Feasibility of the Detection of Carrageenan Adulteration in Chicken Meat Using Visible/Near-Infrared (Vis/NIR) Hyperspectral Imaging. *Applied Sciences* [online]. **9**(18), 3926. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app9183926

ZHU, Benwei, Fang NI, Limin NING, Zhong YAO a Yuguang DU, 2018. Cloning and biochemical characterization of a novel  $\kappa$ -carrageenase from newly isolated marine bacterium *Pedobacter hainanensis* NJ-02. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. **108**, 1331–1338 [vid. 2023-11-28]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.11.040

**Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 217/2023/FVHE.**

# Komparativní genomika multirezistentních patogenních kmenů *Escherichia coli* ST131 a analýza přidružených plazmidů

Michaela Růžičková<sup>1,2</sup>, Markéta Ryšavá<sup>1,2</sup>, Pavlína Zakopalová<sup>1,2</sup>, Ivo Papoušek<sup>1</sup>, Monika Dolejská<sup>1,2</sup>

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

## Úvod

Neustále se zvyšující antibiotická rezistence bakterií představuje rozsáhlý problém nejen v oblasti humánní a veterinární medicíny, ale také v případě volně žijících zvířat a životního prostředí. Gramnegativní bakterie, včetně *Escherichia coli*, představují rozsáhlou skupinu rezistentních mikroorganismů kolonizujících různá prostředí. Mezi nejrozšířenější sekvenční typy (ST) *E. coli* spadá multirezistentní ST131, který je spojen s vysokým výskytem nozokomiálních nákaz, jako jsou například infekce močových cest či krevního řečiště. Tento typ *E. coli* je rovněž zodpovědný za infekce u drůbeže a volně žijících ptáků. Vysoká míra výskytu konjugativních plazmidů u tohoto ST zvyšuje pravděpodobnost šíření genů rezistence i virulence, a vede k tomu, že je v dnešní době tento ST hlavním sekvenčním typem zodpovědným za šíření genů pro produkci širokospektrých beta-laktamáz (ESBL, z angl. *extended-spectrum beta-lactamases*) [1].

Izoláty *E. coli* ST131 se často dělí do pěti skupin (A, B, C0, C1 a C2) na základě fylogenetické příbuznosti a výskytu variant genu *fimH* pro tvorbu fimbrií a genu *bla<sub>CTX-M</sub>* pro rezistenci k beta-laktamovým antibiotikům. Skupiny C1 a C2 se vyskytují nejhojněji a vykazují navíc ještě chromozomální rezistenci k fluorochinolonům kódovanou mutacemi v genech *gyrA* a *parC*. Pro všechny skupiny je charakteristická také asociace s určitými inkompatibilními skupinami IncF plazmidů nesoucími další geny rezistence a virulence (např. [F1:A2:B20] pro skupinu C1 nebo [F2:A1:B-] pro skupinu C2) [2].

## Materiál a metodika

V projektu byly charakterizovány a porovnány bakterie rezistentní k běžně využívaným klinicky významným antibiotikům. Testovaná sbírka 1026 izolátů *E. coli* ST131 se skládala ze vzorků získaných v průběhu let 2009–2021. Izoláty sekvenčního typu 131 byly vybrány ze sbírky obsahující 11 000 izolátů za pomoci PCR screeningu O25 rfb varianty a specifických jednonukleotidových polymorfismů v genech *mdh*, *gyrB* a *parB*. Celkem 955 (93,1 %) izolátů ST131 pocházelo z odběrů z České republiky, zbylých 71 izolátů bylo poté získáno z Austrálie, Belgie, Kanady, Keni, Pobřeží

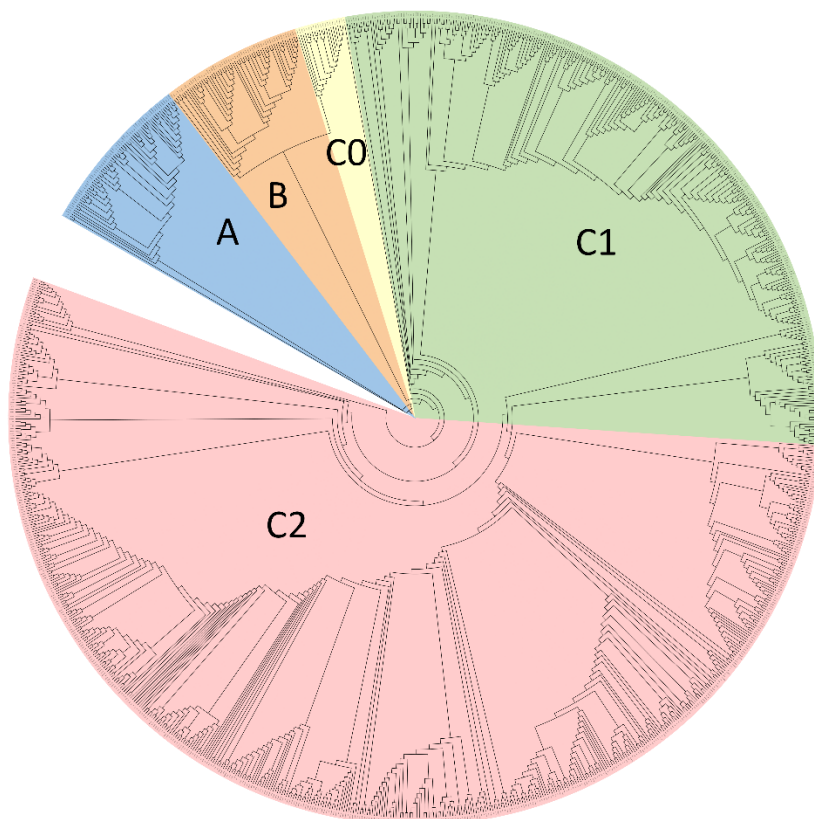
Slonoviny, Polska, Slovenska, Srbska, Ukrajiny a USA. Z celkového počtu 955 izolátů jich 739 (77 %) bylo humánního původu, 141 (15 %) izolátů pocházelo z prostředí a 75 (8 %) izolátů bylo získáno z volně žijících a potravinových zvířat. Z těchto 955 izolátů bylo 138 (14,5 %) selektováno na půdě s ciprofloxacinem (0,05 µg/ml), 137 (14,4 %) na půdě s cefotaximem (2 µg/ml) a 6 (0,6 %) na půdě s meropenemem (0,125 µg/ml). Zbývajících 674 (70,6 %) izolátů bylo kultivováno na půdě bez antibiotika.

Po odfiltrování kontaminovaných a duplicitních vzorků nám zbylo 898 izolátů, které byly otestovány na citlivost k antibiotikům stanovením minimální inhibiční koncentrace [3] a podrobeny PCR screeningu na přítomnost genů rezistence vůči beta-laktamům, fluorochinolonům a karbapenemům. V rámci celého výzkumu bylo všech 898 izolátů *E. coli* podrobena analýze pomocí celogenomového sekvenování. Celogenomová DNA byla z izolátů extrahována kitem NucleoSpin® Tissue a sekvenování proběhlo na platformě NovaSeq 6000 (Illumina). Kvalitativní kontrola získaných dat byla provedena softwarem Trimmomatic, ve kterém byly ořezány adaptorové sekvence a odfiltrovány sekvence s nižší kvalitou. Upravená data byla poskládána v programu SPAdes. Pomocí nástroje MLST [4] byl potvrzen sekvenční typ testovaných izolátů. Sekvenční data izolátů byla charakterizována v programu PlasmidFinder, pomocí kterého jsme identifikovali plazmidy nesené izoláty a zařadili je do příslušných inkompatibilních skupin. Sekvenční data izolátů byla charakterizována algoritmy PlasmidFinder, ResFinder a VirulenceFinder ve webovém nástroji Center for Genomic Epidemiology (<https://www.genomicepidemiology.org>), který nám napomohl identifikovat přítomné plazmidy, geny kódující rezistenci k antibiotikům a virulenční faktory. Pro podrobnější analýzu bylo vybráno 12 izolátů pro sekvenování dlouhých čtení na platformě MinION (Oxford Nanopore Technologies), kde bylo určeno, zda se gen rezistence vyskytuje na chromozomu nebo na konjugativním plazmidu. V softwaru RStudio [5] byly provedeny fylogenetické analýzy včetně vytvoření fylogenetických stromů a heatmap založených na jednonukleotidových polymorfismech.

## Výsledky

Sbírka 898 izolátů *E. coli* ST131 byla rozdělena do skupin podle fylogenetické příbuznosti a přítomnosti variant genu *fimH* pro produkci fimbrií a genu *bla<sub>CTX-M</sub>* kódujícího produkci širokospektrých beta-laktamáz. Nejvíce izolátů spadalo do skupiny C (804/898) s typickým výskytem genu *fimH30*, která se poté ještě rozdělila na skupinu C2 (528/898) asociovanou s genem *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, skupinu C1 (262/898) s charakteristickým genem *bla<sub>CTX-M-27</sub>* a variabilnější skupinu C0 (14/898). Celá fylogenetická skupina C v hojném počtu obsahovala izoláty s bodovými mutacemi v

chromozomálních genech *parC* a *gyrA* zodpovědnými za vznik rezistence k fluorochinolonům. V menším počtu byla poté zastoupena skupina A (49/898) charakterizovaná variantami *fimH41* a *bla<sub>CTX-M-15</sub>* a skupina B (45/898) s variantami *fimH22* a *bla<sub>CTX-M-14</sub>*. Ve skupině C1 byla pozorována vysoká míra klonální příbuznosti mezi izoláty pocházejícími z lidí, volně žijících ptáků a odpadních vod (rozdíl SNP 0–50). Tento trend jsme mohli sledovat také ve skupině C2, a to mezi izoláty z lidí a odpadních vod.



**Obrázek 1.** Fylogenetický strom zobrazující rozdělení izolátů do jednotlivých skupin

Napříč celou sbírkou byla bez ohledu na zdroj izolátu detekována přítomnost rozličných F-plazmidů. Plazmidy příbuzné pUTI89 (F29:A-:B10), které nesou *cjrABC-senB* úsek přispívající k virulenci patogenních bakterií izolovaných z infekcí močových cest, byly asociovány s izoláty ze skupiny A pocházejícími ze vzorků od lidí a z vod. Izoláty skupiny B pak často nesly ColV plazmidy rozličných sekvenčních typů a pocházely zejména z humánních vzorků a vzorků z volně žijících ptáků a drůbeže. V rámci studie jsme mohli pozorovat rozšíření jednotlivých fylogenetických skupin *E. coli* ST131 napříč různými zdroji a prostředími. V souladu s předchozími výzkumy [6] byly i v naší sbírce nejpočetněji zastoupenými skupinami vysoce klonální podskupiny C1 a C2. Výsledky potvrzují nejen souvislost mezi fylogenetickými skupinami a vybranými geny rezistence, ale také sdružení těchto genů s konjugativními plazmidy, čímž poukazují na vznik evolučně výhodnějších epidemiologicky

důležitých kmenů. Naopak neexistující asociace jednotlivých skupin se zdroji, ze kterých byly získány, naznačuje cirkulaci těchto kmenů a plazmidů napříč různými prostředími nezávisle na sobě.

### **Závěr**

Studie nabízí pohled na sbírku převážně klonálních izolátů *E. coli* ST131 pocházejících z různých zdrojů, prostředí a období, a to zejména v rámci fylogenetických skupin C1 a C2. Většina izolátů byla asociována s rozličnými epidemiologicky významnými F-plazmidy rozšířenými mezi různými typy hostitelů a prostředí. Tato zjištění potvrzují důležitost výzkumů zaměřených na dříve nepopsané části světa a dále posilují tvrzení ohledně globální hrozby, kterou rezistentní bakterie představují.

### **Seznam literatury:**

- [1] NICOLAS-CHANOINE, MH., et al. Escherichia coli ST131, an intriguing clonal group. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014, vol. 27, no. 3, s. 543–74.
- [2] NICOLAS-CHANOINE, MH., et al. The ST131 Escherichia coli H22 subclone from human intestinal microbiota: Comparison of genomic and phenotypic traits with those of the globally successful H30 subclone. *BMC Microbiology*. 2017, no. 17, s. 71.
- [3] ANDREWS, JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001, no. 48, s. 5–16.
- [4] LARSEN, MV., et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012, no. 50, s. 1355–61.
- [5] RACINE, JS. RStudio: A Platform-Independent IDE for R and Sweave. *Journal of Applied Economics*. 2012, no. 27, s. 167–172.
- [6] LI, D., et al. Genomic comparisons of Escherichia coli ST131 from Australia. *Microbial Genomics*. 2021, no. 12, s. 000721.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 209/2023/FVHE.***

## Prevalence lyssavirů a astrovirů u netopýrů v Evropě a Asii

Veronika Seidlová<sup>1</sup>, Michaela Jankovíková<sup>1</sup>, Šárka Bednaříková<sup>1</sup>, Jiří Pikula<sup>1</sup>

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

### Úvod

Netopýři jsou uznáváni jako rezervoároví hostitelé patogenních virů. Za nejstarší známé zoonotické patogeny jsou považovány lyssaviry (Schatz et al., 2013). Udává se, že právě netopýři jsou původními hostiteli všech 17 v současné době známých lyssavirů. U netopýrů v Eurasii byly zatím detekovány pouze některé, a to European bat lyssavirus typu 1 a 2 (EBLV-1, EBLV-2), West Caucasian bat lyssavirus (WCBV), Lleida bat lyssavirus (LLBV), Bokeloh bat lyssavirus (BBLV), Kotalahti bat lyssavirus (KBLV), Aravan virus (ARAV), Irkut virus (IRKV) a Kujón virus (KHUV) (Xi et al., 2012; Klein et al., 2022). Na druhou stranu celosvětově rozšířený virus vztekliny (RABV) představující hlavní příčinu onemocnění vzteklinou u savců, včetně člověka, se dle dosavadních poznatků vyskytuje pouze u netopýrů žijících na Americkém kontinentu. Onemocnění, které tyto viry způsobují je po rozvinutí klinických příznaků smrtelné a kromě centrálního nervového systému je virus vztekliny přítomen i v síti nervových vláken obklopujících vlasové/chlupové folikuly (Macedo et al., 2006; Xi et al., 2012).

Naopak mezi novodobé objevy v oblasti potencionálních zoonóz u netopýrů patří astroviry. Dlouhou dobu byly považovány za přísně druhově specifické. Nedávno objevená velká genetická diverzita ovšem naznačuje potenciál těchto virů překonávat druhovou bariéru. To v souvislosti se studii asijských a evropských druhů netopýrů, u kterých jsou astroviry běžné, rozmanité a mají relativně vysokou prevalenci (Fisher et al., 2017), představuje potenciálně možné riziko do budoucnosti.

Dle literatury je vhodnou matricí pro detekci těchto virů u netopýrů mozková tkáň anebo kůže odebraná z plagiopatagia. Zvláště s ohledem na jedinečnou inervaci chlupových folikulů a atypickou organizaci periferních nervů létací membrány netopýrů (Marshall et al., 2015).

Cílem naší studie bylo přinést nové poznatky o využití těchto matric v diagnostice virových patogenů u netopýrů. Dále zhodnotit výskyt, distribuci a prevalenci lyssavirů a astrovirů u netopýrů vyšetřených na lokalitách v Evropě a Asii.

### Materiál a metodika

#### *Sběr vzorků*

Celkově jsme analýzám na přítomnost genetické informace *Lyssavirus* spp. a *Astrovirus* spp. podrobili 183 vzorků dvou různých typů biologických matric. Vzorky mozkové tkáně (n=53) byly

získány pitvou kadáverů netopýrů *Myotis myotis* a *Nyctalus noctula* z České republiky, kterými již pracoviště disponovalo z předchozích let. Celkem 130 vzorků létací membrány bylo odebráno pomocí biotické jehly (o průměru 3 mm) při odchycích netopýrů (*Myotis blythii*, *Myotis emarginatus*, *Myotis capaccinii*, *Miniopterus schreibersii*, *Miniopterus pallidus*, *Rhinolophus ferrumequinum*, *Rhinolophus hipposideros*) v Arménii, Gruzii a Bulharsku během let 2022 a 2023. Všechny vzorky byly po odběru hluboce zamrazeny (-80 °C) ve zkumavkách s RNAlaterem a skladovány až do doby analýz.

#### *Izolace RNA*

RNA byla ze vzorků izolována za použití kitu NucleoSpin® RNA XS (Macherey-Nagel, Německo) dle protokolu. Koncentrace a kvalita získaných izolátů byla ověřena pomocí nanospektrofotometru a následně byly izoláty uskladněny při teplotě -80 °C.

#### *Molekulární detekce Lyssavirus spp.*

Pro detekci lyssavirové RNA v 53 vzorcích mozků a 130 vzorcích kožních biopátů jsme použili real-time RT-PCR. Vybraná amplifikovaná oblast cílila na vysoce konzervovanou nekódující oblast a část sekvence kódující nukleoprotein (N) genomu Lyssaviru. Navržené primery by měly být schopny detekovat RABV a také zástupce 13 dalších druhů lyssavirů (Wadhwa et al., 2017). Reakční směs byla připravena dle návodu kitu OneStep RT-PCR (Qiagen, Německo) s rozdílem celkového objemu 12,5 µl. Do reakce vstupovaly forward primery (10 µM) (5'-ACGCTTAAC AACCAGATCAAAGAA-3' a 5'-ACGCTTAACAACAAAATCADAGAAG-3'); reverzní primer (5'-CMGGGTAYTTRTAYTCATAYTGRTC-3') (10 µM); a čtyři fluorescenčně značené sondy (5 µM) z nichž tři s LNA (locked nucleic acid) modifikovanými bázemi LN34 (FAM-AA+C+ACCY+C+T+ACA+A+TGGA -BHQ1), LN34a (FAM-AAC+ACCYC+T+ACA+A+TGGA -BHQ1), LN34lago (FAM-AA+C+ACTA+C+T+ACA+A+TGGA-BHQ1) a jedna sondu LN34m (6FAM-ACACCYCTACAATGGAT-MGBNFQ); to vše s přidáním 2,5 µl extrahované RNA. Podmínky reakce byly sestaveny následovně: 10 minut při 45 °C pro reverzní transkripci a 10 minut při 95 °C pro aktivaci; následovalo 45 cyklů, denaturace při teplotě 95 °C po dobu 15 sekund, annealing při teplotě 56 °C po dobu 20 sekund a extenze při 72 °C po dobu 30 sekund. Součástí analýzy byla negativní kontrola a také pozitivní kontrola (syntetická sekvence 127 nukleotidů oLPC-rabies3-4).

#### *Molekulární detekce Astrovirus spp.*

Pro detekci astrovirů z totožných 130 vzorků kožních biopátů byla zvolena heminested RT-PCR zacílená na gen RdRp (RNA-dependentní RNA polymeráza). V prvním kole bylo ke 45 µl reakční směsi Superscript III (Invitrogen, USA), (12µl RNase – free water, 25µl RT mix, 4µl MgSO<sub>4</sub>, 2µl



Taq EnzymeMix), dvou forward primerů (10  $\mu$ M) AS1 (5'-GARTTYGATTGGRCCKCGKTAYGA-3') a AS2 (5'-GARTTYGATTGGRCCKAGGTAYGA-3') a reverzního AS3 primeru (5'-GGYTTKACCCACATNCCRAA-3') (10  $\mu$ M) přidáno 5  $\mu$ l RNA. Reakce započala inkubací při teplotě 55 °C 30 minut a poté 2 minuty při 94 °C. Následovalo 29 cyklů denaturace při 94 °C po dobu 15 sekund, annealing při 50 °C po dobu 30 sekund a extenze při 72 °C po dobu 40 sekund a finální extenze při 72 °C trvající 7 minut. Ve druhém kole jsme přidali 2  $\mu$ l PCR produktu z kola prvního do 48  $\mu$ l předem připraveného mixu s Pwo DNA polymerázou (39,75  $\mu$ l RNase-free water, 1  $\mu$ l dNTPs, 5  $\mu$ l MgSO<sub>4</sub>, 0,25  $\mu$ l Pwo), směsi forward primerů (10  $\mu$ M) AS4 a AS5 (5'-CGKTAYGATGGKACKATHCC-3' a 5'-AGGTAYGATGG KACKATHCC-3') a již dříve používaného reverzního primeru AS3 (Chu et al., 2008). Podmínky amplifikace zůstávají stejné jako v prvním kole s rozdílem 39 cyklů. Správné provedení a průběh reakce bylo opět kontrolováno použitím negativní a pozitivní kontroly, kterou v tomto případě představoval pozitivní vzorek *Astrovirus* sp. Získané PCR produkty byly poté naneseny na 2% agarózový gel pro elektroforetické vyhodnocení, přičemž fragmenty o velikosti 422 párů bazí (bp) značily pozitivitu vzorku.

## Výsledky

Pro průkaz přítomnosti lyssavirů a astrovirů u netopýřů z České republiky, Bulharska, Arménie a Gruzie jsme analyzovali 130 vzorků kožních bioptátů a 53 vzorků mozkové tkáně.

Multiplexová metoda RT-pPCR detekující *Lyssavirus* spp. odhalila **2 pozitivní vzorky kožní tkáně netopýřů *M. pallidus* a *M. emarginatus* z Arménie**. Tyto výsledky ukazují prevalenci 5,71 % ze souboru vzorků netopýřů analyzovaných z lokalit v Arménii. Vzorky pocházející z Bulharska a Gruzie byly negativní, stejně jako vzorky mozkové tkáně z České republiky.

Pomocí heminested RT-PCR jsme detekovali přítomnost *Astrovirus* spp. **v 10 vzorcích kožních bioptátů**, jež pocházejí **od netopýřů *R. ferrumequinum* (n=8) a *M. schreibersii* (n=2)** z jeskyně v bulharské oblasti Mandrata Chavdarzi, což odpovídá prevalenci 16,39 % v rámci vzorků analyzovaných z Bulharska.

## Závěr

Netopýři jsou označováni za hostitele mnoha patogenů. Jednou z možností, kdy se mohou uplatnit jako rezervoárové druhy, jsou právě lyssaviry nebo potenciálně zoonotické astroviry. Tímto výzkumem přinášíme další poznatky o průkazu *Lyssavirus* spp. a *Astrovirus* spp. ve vzorcích kožní tkáně netopýřů, přičemž námi zjištěné prevalence korespondují s hodnotami z jiných studiích. Informace o lyssavirech nalezených u netopýřů se stále rozšiřují, avšak využití kožních bioptátů pro jejich molekulární detekci zůstávalo nepříliš probádanou oblastí. Naše zjištění ovšem nabízejí

nové možnosti v diagnostice virů se zoonotickým potenciálem, a to neinvazním způsobem u chráněných druhů netopýrů.

### Seznam literatury:

FISCHER, Kerstin, Vinícius PINHO DOS REIS a Anne BALKEMA-BUSCHMANN, 2017. Bat Astroviruses: Towards Understanding the Transmission Dynamics of a Neglected Virus Family. *Viruses* [online]. 9(2) [cit. 2023-11-27]. ISSN 1999-4915. Dostupné z: doi:10.3390/v9020034

CHU, D. K. W., L. L. M. POON, Y. GUAN a J. S. M. PEIRIS, 2008. Novel Astroviruses in Insectivorous Bats: Towards Understanding the Transmission Dynamics of a Neglected Virus Family. *Journal of Virology* [online]. 2008-09-15, 82(18), 9107-9114 [cit. 2023-11-18]. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.00857-08

KLEIN, Antonia, Elisa EGGERBAUER, Madlin POTRATZ, et al., 2022. Comparative pathogenesis of different phylogroup I bat lyssaviruses in a standardized mouse model: Towards Understanding the Transmission Dynamics of a Neglected Virus Family. *PLOS Neglected Tropical Diseases* [online]. 2022-1-18, 16(1), 851-858 [cit. 2023-11-28]. ISSN 1935-2735. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pntd.0009845

MACEDO, Carla Isabel, Pedro CARNIELI JR, Paulo Eduardo BRANDÃO, et al., 2006. Diagnosis of human rabies cases by polymerase chain reaction of neck-skin samples: Towards Understanding the Transmission Dynamics of a Neglected Virus Family. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* [online]. 10(5), 1385-1392 [cit. 2023-11-29]. ISSN 1413-8670. Dostupné z: doi:10.1590/S1413-86702006000500008

MARSHALL, Kara L., Mohit CHADHA, Laura A. DESOUZA, Susanne J. STERBING-D'ANGELO, Cynthia F. MOSS a Ellen A. LUMPKIN, 2015. Somatosensory Substrates of Flight Control in Bats: Towards Understanding the Transmission Dynamics of a Neglected Virus Family. *Cell Reports* [online]. 11(6), 851-858 [cit. 2023-11-29]. ISSN 22111247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2015.04.001

SCHATZ, J., A. R. FOOKS, L. MCELHINNEY, et al., 2013. Bat Rabies Surveillance in Europe. *Zoonoses and Public Health* [online]. 60(1), 22-34 [cit. 2023-11-28]. ISSN 1863-1959. Dostupné z: doi:10.1111/zph.12002

WADHWA, Ashutosh, Kimberly WILKINS, Jinxin GAO, et al., 2017. A Pan-Lyssavirus Taqman Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of Highly Variable Rabies virus and Other Lyssaviruses. *PLOS Neglected Tropical Diseases* [online]. 2017-1-12, 11(1), 43-55 [cit. 2023-11-18]. ISSN 1935-2735. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pntd.0005258

XI, Jin, Huancheng GUO, Ye FENG, et al., 2012. Differentiation of the Seven Major Lyssavirus Species by Oligonucleotide Microarray. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 50(3), 619-625 [cit. 2023-11-29]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.00848-11

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 221/2023/FVHE*

## **Komplexní posouzení toxicity bisfenolu A a F pro pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*)**

Vendula Stoklasová, Jana Blahová, Přemysl Mikula, Ekaterina Koriakina, Alexandra Botková,  
Martin Groma

*Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinárního lékařství,  
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

### **Úvod**

Bisfenoly představují významné environmentální kontaminanty s ubikvitárním výskytem a prokázanými toxickými vlastnostmi. Ve vodním prostředí je lze detekovat v různých abiotických matricích, jejich přítomnost byla prokázána i v rostlinných pletivech a živočišných tkáních. Bisfenol A (BPA) se již po desetiletí používá v plastikářském průmyslu jako aditivum a monomer pro výrobu polykarbonátů. Jedná se o materiál s širokým technickým využitím, a to především díky chemické, tepelné či mechanické odolnosti, lehkosti, čirosti a libovolné barvitelnosti (Almeida et al., 2018). Vědecké studie potvrzují, že BPA je endokrinní disruptor, u ryb byly v minulosti zjištěny zejména poruchy reprodukce či změny v činnosti thyroidních hormonů. Pozorovány byly ale také další projevy toxicity jako ovlivnění exprese vybraných genů, indukce oxidativního stresu, genotoxicita, embryotoxicita, neurotoxicita, vývojová toxicita a další (Liu et al., 2021). S ohledem na výsledky předchozích toxikologických studií je v současné době používání BPA v určitých typech výrobků legislativně regulováno/zakázáno a BPA je z těchto důvodů často nahrazován jinými typy bisfenolů. Jedním z hojně využívaných analogů BPA je bisfenol F (BPF). Přestože se dnes již také BPF používá ve velkých objemech, informace o jeho toxicitě ve vodním prostředí jsou stále limitované (Rochester and Bolden, 2015). Cílem našeho experimentu bude komplexní zhodnocení účinků BPA a BPF podávaných v krmivu na pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*).

### **Materiál a metodika**

Test proběhl dle metodiky OECD 215 pro testování chemikálií (Fish, Juvenile Growth Test). Celkem 144 ks juvenilních jedinců pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) bylo umístěno do 12 akvárií s objemem 200 litrů. Po aklimatizaci trvající 14 dní následoval šestitýdenní experiment. Celý experiment byl realizován na Mendelově univerzitě v Brně na Ústavu zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství.

Do pokusu bylo zařazeno šest duplicitních skupin – kontrola, skupiny exponované bisfenolem A v dávce 10 µg/kg (BPA low) a 1 000 µg/kg (BPA high), skupiny exponované bisfenolem F v dávce 10 µg/kg (BPF low) a 1 000 µg/kg (BPF high) a skupina, které byla podávána kombinace bisfenolu A a bisfenolu F v koncentracích 10 µg/kg (BPA+BPF low). Krmivo s obsahem testovaných látek bylo podáváno 3x denně v dávce 1,5 % aktuální hmotnosti a po 14 dnech bylo prováděno kontrolní vážení pro úpravu krmné dávky. Po ukončení expozice byly všechny ryby usmrceny tupým úderem do hlavy a byl proveden odběr krve z ocasní cévy do Eppendorf zkumavek s obsahem heparinu sodného. Vzorke heparinizované krve byly využity pro hematologické vyšetření (leukocyty, erytrocyty, hemoglobin a hematokrit). Část heparinizované krve byla zpracována krevní plazmy, která byla využita pro analýzu základních biochemických parametrů, koncentraci thyroxinu, vitellogeninu a ukazatelů oxidativního stresu (FRAP, ceruloplasmin). Následně bylo u všech ryb provedeno zhodnocení základních morfologických parametrů. Dále při pitvě byly odebrány vybrané tkáně pro analýzu ukazatelů oxidativního stresu a histologické vyšetření. Statistické vyhodnocení získaných dat bylo provedeno v programu Unistat 6.5 for Excel. Testování bylo provedeno na hladině významnosti  $p < 0,05$ .

### Výsledky a diskuze

V průběhu experimentu nebyly zaznamenány žádné úhyny. Po ukončení experimentu byly u všech jedinců sledovány biometrické parametry. Statistická analýzy nepotvrdila signifikantní rozdíly u žádného ze sledovaných ukazatelů. V rámci hematologického vyšetření byly zjištěny statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolní skupinou pouze v případě počtu leukocytů (Tabulka 1). Došlo ke statisticky vysoce významnému snížení počtu leukocytů u experimentální skupiny vystavené účinkům BPF ve vyšší testované koncentraci.

**Tabulka 1.** Výsledky hematologického vyšetření pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) po působení bisfenolů A a F v krmivu. Data jsou uváděna jako průměr ± střední chyba průměru. Statisticky významné rozdíly jsou indikovány odlišnými písmeny.

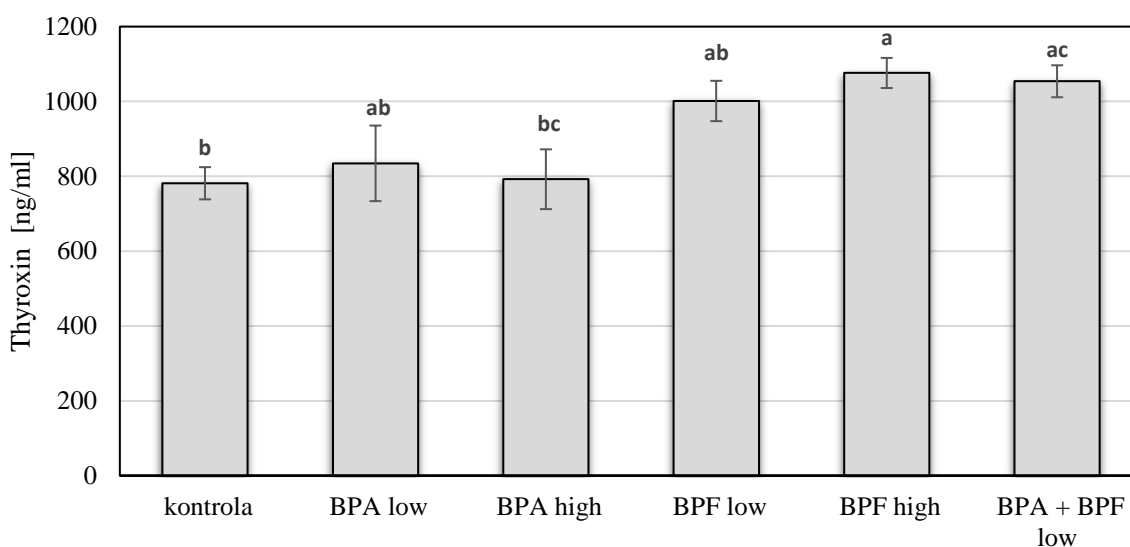
skupiny	kontrola	BPA low	BPA high	BPF low	BPF high	BPA+BPF low
Ery (T/l)	1,53 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,30 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,08 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,53 ± 0,21 <sup>a</sup>	1,52 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,54 ± 0,14 <sup>a</sup>
Hb (g/l)	83,30 ± 4,48 <sup>a</sup>	81,87 ± 3,72 <sup>a</sup>	84,85 ± 3,84 <sup>a</sup>	80,65 ± 3,49 <sup>a</sup>	75,41 ± 3,56 <sup>a</sup>	77,23 ± 2,89 <sup>a</sup>
Ht (l/l)	0,34 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,02 <sup>a</sup>
Leu (G/l)	59,80 ± 7,90 <sup>a</sup>	59,90 ± 7,14 <sup>a</sup>	41,40 ± 2,36 <sup>ab</sup>	48,30 ± 6,29 <sup>ab</sup>	28,20 ± 3,64 <sup>b</sup>	37,60 ± 6,84 <sup>ab</sup>

Při biochemickém vyšetření krevní plazmy byly zjištěny statisticky významné rozdíly pouze v případě kreatininu a aktivity amylázy. V porovnání s kontrolní skupinou došlo v případě kreatininu

k signifikantnímu zvýšení u skupiny BPA low. U amylázy došlo u všech skupiny ke zvýšení aktivity, statisticky významná změna v porovnání s kontrolní skupinou byla ovšem pouze v případě experimentálních skupin vystavených bisfenolu F, a to v obou testovaných koncentracích.

Při analýze koncentrace thyroxinu byly zaznamenány statisticky významné rozdíly oproti kontrole v experimentálních skupinách vystavených nejvyšší koncentraci BPF a kombinace obou bisfenolů. Detailní data jsou uvedena v grafu 1.

**Graf 1.** Výsledky thyroxinu v plazmě pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) po působení bisfenolů A a F v krmivu. Data jsou uváděna jako průměr  $\pm$  střední chyba průměru. Statisticky významné rozdíly jsou indikovány odlišnými písmeny.



Při hodnocení oxidativního stresu byly zjištěny signifikantní rozdíly jak při analýze plazmy, tak při analýze všech sledovaných orgánů (tzn. játry, žábry i ledviny). Při analýze plazmy byly zjištěny signifikantní rozdíly v porovnání s kontrolní u ceruloplasminu, redukčního potenciálu plazmy i poškození DNA. Nejvýznamnější byly změny v případě experimentálních skupin vystavených působení BPF ve vyšší testované koncentraci a kombinaci těchto látek (Tabulka 2). Při analýze tkání bylo nejvíce změn zaznamenáno v případě aktivity katalázy, která se signifikantně zvýšila ve všech analyzovaných tkáních, a to především v experimentální skupině vystavené kombinaci obou bisfenolů. Detailní data jsou uvedena v tabulce 3. Signifikantní rozdíly byly také zaznamenány při analýze genové exprese, a to jak u ukazatelů oxidativního stresu, tak parametrů endokrinní disrupce (data nejsou uvedena). V současné chvíli je prováděno histologické vyšetření vybraných tkání a analýza vitellogeninu jako ukazatele endokrinní disrupce.

**Tabulka 2.** Výsledky ceruloplasminu ( $\Delta A/\text{min} \times 10000$ ), redukčního potenciálu plazmy ( $\mu\text{mol/l}$ ) a poškození DNA – 8--HOdG ( $\text{pg/ml}$ ) v plazmě pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) po působení bisfenolů A a F v krmivu. Data jsou uváděna jako průměr  $\pm$  střední chyba průměru. Statisticky významné rozdíly jsou indikovány odlišnými písmeny.

	kontrola	BPA low	BPA high	BPF low	BPF high	BPA+BPF low
ceruloplasmin	173,5 $\pm$ 5,8 <sup>b</sup>	170,9 $\pm$ 7,0 <sup>b</sup>	189,0 $\pm$ 6,5 <sup>ab</sup>	178,2 $\pm$ 10,0 <sup>b</sup>	192,2 $\pm$ 12,4 <sup>ab</sup>	197,0 $\pm$ 6,9 <sup>a</sup>
FRAP	692,7 $\pm$ 16,5 <sup>a</sup>	733,5 $\pm$ 31,0 <sup>ab</sup>	797,7 $\pm$ 23,4 <sup>ab</sup>	814,0 $\pm$ 20,9 <sup>bc</sup>	839,0 $\pm$ 25,3 <sup>b</sup>	718,6 $\pm$ 32,2 <sup>ac</sup>
8--HOdG	9853,3 $\pm$ 767,6 <sup>a</sup>	7250,0 $\pm$ 597,0 <sup>b</sup>	8712,6 $\pm$ 505,8 <sup>ab</sup>	8199,8 $\pm$ 956,9 <sup>ab</sup>	7111,2 $\pm$ 376,6 <sup>b</sup>	8968,6 $\pm$ 366,2 <sup>ab</sup>

**Tabulka 3.** Výsledky aktivity katalázy ( $\text{umol/min/mg protein}$ ) v jednotlivých tkáních pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) po působení bisfenolů A a F v krmivu. Data jsou uváděna jako průměr  $\pm$  střední chyba průměru. Statisticky významné rozdíly jsou indikovány odlišnými písmeny.

tkáň	kontrola	BPA low	BPA high	BPF low	BPF high	BPA+BPF low
játra	639,6 $\pm$ 42,6 <sup>b</sup>	975,7 $\pm$ 46,6 <sup>a</sup>	893,2 $\pm$ 19,0 <sup>a</sup>	982,7 $\pm$ 44,8 <sup>a</sup>	980,4 $\pm$ 50,4 <sup>a</sup>	1026,0 $\pm$ 59,7 <sup>a</sup>
ledviny	930,9 $\pm$ 61,5 <sup>b</sup>	1371,3 $\pm$ 86,1 <sup>a</sup>	1372,6 $\pm$ 50,4 <sup>a</sup>	1200,7 $\pm$ 70,5 <sup>a</sup>	1280,2 $\pm$ 61,5 <sup>a</sup>	1490,8 $\pm$ 100,0 <sup>a</sup>
žábry	1330,9 $\pm$ 61,2 <sup>b</sup>	1837,6 $\pm$ 63,2 <sup>a</sup>	1707,8 $\pm$ 44,5 <sup>a</sup>	1724,6 $\pm$ 75,5 <sup>ab</sup>	1763,1 $\pm$ 36,6 <sup>a</sup>	1895,4 $\pm$ 70,5 <sup>a</sup>

### Seznam literatury:

- ALMEIDA, Susana; RAPOSO, António; ALMEIDA-GONZÁLEZ, Maira a CARRASCOSA, Conrado. Bisphenol A: Food Exposure and Impact on Human Health. Online. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2018, roč. 17, č. 6, s. 1503-1517. ISSN 1541-4337. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12388>. [cit. 2023-11-28].
- LOGANATHAN, Paripurnanda; VIGNESWARAN, Saravanamuthu; KANDASAMY, Jaya; NGUYEN, Tien Vinh; KATARZYNA CUPRYS, Agnieszka et al. Bisphenols in water: Occurrence, effects, and mitigation strategies. Online. *Chemosphere*. 2023, roč. 328. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138560>. [cit. 2023-11-28].
- ROCHESTER, Johanna R. a BOLDEN, Ashley L. Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. Online. *Environmental Health Perspectives*. 2015, roč. 123, č. 7, s. 643-650. ISSN 0091-6765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1289/ehp.1408989>. [cit. 2023-11-28].

**Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 207/2023/FVHE**

## Vliv suchého zrání vepřového masa na mikrobiologickou kvalitu a senzorické vlastnosti

Helena Veselá, Josef Kameník, František Ježek, Marta Dušková, Kateřina Pleskačová,  
Hana Svobodová, Gabriela Daňková, Lucie Šustrová

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

### Úvod

Hlavní způsob kulinárního zpracování výsekového vepřového masa představuje tepelná úprava. Konzumenti u této úpravy masa hodnotí senzorické vlastnosti masa, označované výrazem „eating quality“ (Joo et al., 2013). Na prvním místě je to vůně a chuť masa, šťavnatost a křehkost. Tyto senzorické vlastnosti lze ovlivnit rychlostí a rozsahem poklesu hodnot pH, pohlavím (možná přítomnost kančího pachu), složením mastných kyselin, podílem a rozpustností pojivové tkáně, myofibrilární strukturou a podílem vnitrosvalového tuku. Stejně jako v případě hovězího masa i u vepřového má zrání masa vliv na křehkost. V literatuře byl popsán ve většině případů pozitivní vliv zrání vepřového masa po dobu 4, 7 nebo 10-12 dní v porovnání k 1-2 dnům po porážce. Výsledky studie Channon et al. (2016) ale kladný vliv zrání masa v délce 2 nebo 7 dní post-mortem neprokázaly, patrně doba 7 dnů byla v tomto případě příliš krátká. Aaslyng et al. (2018) nechali zrát vepřovou pečení při 4 °C po dobu 2, 5, 7 nebo 10 dnů. Až do 10 dnů zrání se křehkost masa zvyšovala ( $P = 0,001$ ).

V principu existují dvě metody zrání masa, které se používají primárně pro hovězí maso. Suché zrání představuje uložení kusů mas s kostí v chladírnách s řízeným režimem teploty vzduchu, relativní vlhkosti a rychlosti proudění vzduchu. Vlhké zrání znamená vakuové zabalení kusů masa do folie s bariérovými vlastnostmi a uložení v chladírnách. V tomto případě je důležitým parametrem teplota vzduchu. Vlhkost ani rychlost proudění vzduchu nehrají při vlhkém zrání žádnou roli. Z pohledu chutnosti masa po kulinární úpravě se však upřednostňuje suché zrání masa, během něhož vznikají aromatické látky, které příznivě ovlivňují chuť a vůni. Vývin těchto látek je úměrný délce zrání masa (Perry, 2012).

Při zrání masa představuje největší problém bakteriální kontaminace a s tím související kažení masa. Je známo, že za aerobních podmínek (přítomnost vzdušné atmosféry) se maso brzy zkazí. Je to vyvoláno rychlým růstem bakterií rodu *Pseudomonas*. Na hovězím, jehněčím, vepřovém a drůbežím mase i vnitřnostech byly nalezeny četné druhy čeledě *Enterobacteriaceae*. Ke kažení přispívají rody *Serratia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Proteus* a *Hafnia*. S ohledem na potenciál zkazit maso je v tomto směru nejdůležitější *Serratia liquefaciens*, *Hafnia alvei*

a *Enterobacter (Pantoea) agglomerans* (Dušková et al., 2020). Balení představuje určité „sítu“, které dovoluje přežít jen omezenému spektru bakterií přítomných na čerstvém masu po jeho bourání. Např. v případě vakuového balení uvádějí Kaur et al. (2017) snížení bakteriálních rodů o 30-55 %. Snaha zpracovatelů masa nabídnout zákazníkům vysoce jakostní výsekové maso se odrazila v zavádění postupů zrání vepřového masa. Na trhu se již objevily produkty, které byly vystaveny suchému zrání. Podle některých zpracovatelů nelze z mikrobiologického hlediska aplikovat u vepřového masa vlhké zrání po dobu delší jak 10 dnů. Suché zrání, za vhodných podmínek, lze u vepřového masa použít po dobu 14 dnů.

Hlavním cílem projektu bylo analyzovat vybrané parametry (mikrobiologická kvalita, instrumentální analýzy textury a barvy masa, hmotnostní ztráty) vepřového masa po dvoutýdenním suchém zrání a tyto vlastnosti porovnat s vepřovým masem v den porážky.

### **Materiál a metodika**

Po dohodě s vybraným zpracovatelem masa s vlastní porážkou prasat byly připraveny tzv. vepřové karé s kostí (vepřová krkovice a pečeně), které byly v podobě masa s kostí vcelku. V naší studii byly tyto kusy masa vystaveny při teplotě 0-1 °C suchému zrání po dobu 2 týdnů.

Na mikrobiologické vyšetření bylo odebráno celkem 120 vzorků. Vzorky byly odebrány stěrem pomocí abrazivní houbičky v den porážky (den 0) a po 14 dnech zrání (den 14). Stěry byly provedeny na 4 místech vepřového karé. Dva stěry na kůži (strana krkovice a strana pečeně) z plochy 100 cm<sup>2</sup> a 2 stěry na řezu (strana krkovice a strana pečeně) z plochy 10 cm<sup>2</sup>. Vzorky byly analyzovány v den odběru. Kultivačními metodami byl stanoven dle ISO norem celkový počet psychrotrofních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů (CPM) z povrchu masa i z masa na řezu, stejně tak počet psychrotrofních bakterií mléčného kvašení (BMK), bakterií čeledě *Enterobacteriaceae* a bakterií rodu *Pseudomonas*. Součástí pokusu bylo i vyhodnocení hmotnostních ztrát během suchého zrání. Jeden kus vepřového karé představoval jeden vzorek. Všechny vzorky byly zváženy v den 0 a v den 14. Výsledky byly statisticky zpracovány (Microsoft Excel). V poslední fázi experimentu se vzorky masa vykostily a připravily se plátky z pečeně a krkovice pro stanovení barvy a textury. Maso bylo měřeno v syrovém stavu a po tepelné úpravě v konvektomatu (grilování na teplotu jádra 70 °C). Barva byla měřena systémem CIE L\*a\*b\*. Textura byla měřena instrumentálně v syrovém stavu a 24 hodin po tepelné úpravě. Vzorky chlazeného masa (2±2 °C) byly před měřením temperovány na pokojovou teplotu. U masa byla měřena velikost střížní síly dle Warner-Bratzler (WB) pomocí univerzálního testovacího stroje (Instron 5544). U tepelně upraveného masa byla provedena také analýza texturního profilu (TPA). Všechny analýzy byly statisticky zpracovány (Microsoft Excel).



## Výsledky

Výsledky experimentu porovnávajícího mikrobiologický profil povrchu masa (kůže) (tabulka 1) a bočních řezných ploch (tabulka 2) v den porážky a po 14 dnech suchého zrání masa prokázaly, že suché zrání výrazně nezhoršuje mikrobiologický profil. Rozdíl v množství CPM, bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* a BMK nebyl statisticky významný ( $P > 0,05$ ). U stěrů z kůže došlo po 14 dnech zrání k poklesu bakterií *Pseudomonas* spp. ( $P < 0,05$ ). U stěrů z řezných ploch došlo naopak k jejich nárůstu.

Tabulka 1. Výsledky stanovení počtu psychrotrofních CPM, *Enterobacteriaceae*, psychrotrofních BMK a *Pseudomonas* spp. z povrchu kůže v den porážky (A) a 14 dní po porážce (B). Výsledky jsou uvedeny v log KTJ/g.

Vzorek	CPM		<i>Enterobacteriaceae</i>		BMK		<i>Pseudomonas</i> spp.	
	A	B	A	B	A	B	A	B
<b>Průměr</b>	5,95	5,26	4,9	2,18	4,02	3,64	4,71	3,72
<b>Min</b>	1,98	<1	1,08	<1	<1	<1	2,70	<1
<b>Max</b>	7,34	6,62	4,46	3,54	5,20	4,88	5,72	4,57
<b>P-hodnota</b>	>0,05		>0,05		>0,05		<0,05	

Tabulka 2. Výsledky stanovení počtu psychrotrofních CPM, *Enterobacteriaceae*, psychrotrofních BMK a *Pseudomonas* spp. z bočních řezných ploch v den porážky (A) a 14 dní po porážce (B). Výsledky jsou uvedeny v log KTJ/g.

Vzorek	CPM		<i>Enterobacteriaceae</i>		BMK		<i>Pseudomonas</i> spp.	
	A	B	A	B	A	B	A	B
<b>Průměr</b>	5,46	8,10	2,48	4,44	2,26	5,29	3,16	6,45
<b>Min</b>	<1	<2,6	<0,6	<0,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6
<b>Max</b>	6,72	9,48	3,83	5,88	3,26	6,49	4,18	7,59
<b>P-hodnota</b>	>0,05		>0,05		>0,05		<0,05	

Hmotnostní ztráty se pohybovaly od 5,07 % do 8,29 %. Statisticky významný rozdíl v hmotnosti masa v den porážky a po 14 dnech zrání nebyl prokázán ( $P > 0,05$ ). Výsledky instrumentálního

měření barvy v případě hodnot  $L^*$  a  $a^*$  neprokázaly statisticky významné rozdíly mezi syrovým a tepelně upraveným masem ( $P > 0,05$ ). Výrazně nižší hodnoty  $b^*$  byly zjištěny ve vepřové pečení po tepelné úpravě po 14 dnech zrání ve srovnání se syrovým masem. Dále bylo zjištěno, že vyšší hodnoty  $b^*$  vykazuje zralá syrová krkovička ve srovnání s čerstvou syrovou krkovicí v den porážky. Naše zjištění jsou shodná s výsledky, které uvedli Jin a Yim (2020). Suché zrání nemělo významný vliv na střížní sílu ( $P > 0,05$ ). U zralé tepelně upravené krkovičky byla zjištěna výrazně vyšší tuhost ve srovnání s tepelně upravenou krkovicí odebranou v den porážky ( $P < 0,05$ ).

Naše zjištění ukazují, že vyzrálé vepřové maso za předpokladu dodržení zásad správné výrobní a hygienické praxe nemá vliv na mikrobiologickou kvalitu. Po 14 dnech nedošlo k statisticky významným hmotnostním ztrátám. Suché zrání vepřového masa rovněž nemělo významný vliv na světlost ( $L^*$ ), červenou barvu ( $a^*$ ) a střížní sílu. Rozdíly byly zjištěny u žluté barvy ( $b^*$ ) a tuhosti masa ( $P < 0,05$ ).

### **Seznam literatury:**

AASLYNG, M. D., JENSEN, H., KARLSSON, A. H. The gender background of texture attributes of pork loin. *Meat Science*. 2018, 136, 79-84.

CHANNON, H. A., D'SOUZA, D.N., DUNSHEA, F. R. Developing a cuts-based system to improve consumer acceptability of pork: Impact of gender, ageing period, endpoint temperature and cooking method. *Meat Science*. 2016, 121, 216-227.

DUŠKOVÁ, M., KAMENÍK, J., DOROTÍKOVÁ, K., KRÁL, O. Balené čerstvé maso a bakterie. *Maso*. 2020, 31, 8-16.

JIN, S. K., YIM, D. G. Comparison of effects of two aging methods on the physicochemical traits of pork loin. *Food Science of Animal Resources*. 2020, 40, 844-851.

JOO, S. T., KIM, G. D., HWANG, Y. H., RYU, Y. C. Control of fresh meat quality through manipulation of muscle fiber characteristics. *Meat Science*. 2013, 95, 828-836.

KAUR, M., SHANG, H., TAMPLIN, M., ROSS, T., BOWMAN, J. P. Culture-dependent and culture-independent assessment of spoilage community growth on VP lamb meat from packaging to past end of shelf-life. *Food Microbiology*. 2017, 68, 71-80.

PERRY, N. Dry aging beef. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. 2012, 1, 78-80.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 203/2023/FVHE.***

## Vplyv hemogregarín rodu *Hemolivia* na zdravotný stav ich korytnačích hostiteľov.

Žaneta Živčicová<sup>1</sup>, Pavel Široký<sup>1</sup>

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

### Úvod

Parazity majú zvyčajne negatívny vplyv na svojho hostiteľa. Medzi parazity, ktoré nájdeme u plazov patria aj krvné parazity z čeľade Haemogregarinidae. U hemogregarín z rodu *Hemolivia* ale zatiaľ neboli pozorované žiadne výrazné klinické symptómy (3). Pri týchto parazitoch prebieha gamogónia v erythrocytoch ich ektotermných hostiteľov. Sporogónia pozostáva z dvoch fáz prebiehajúcich v epiteliálnych bunkách definitívneho hostiteľa, ktorým sú kliešte z čeľade Ixodidae. Naším sledovaným modelom bola *Hemolivia mauritanica* a jej hostitelia, suchozemské korytnačky *Testudo marginata* a *Testudo graeca* (5).

Mnohé krvné parazity sú známe tým, že formujú ekológiu endotermných stavovcov, ale patogenita nami skúmaných hemogregarín a ich vplyv na ektotermného hostiteľa, je len málo preskúmaná (1). V niektorých populáciách dosahuje prevalencia infekcie hemolivií u dospelých korytnačiek až 80 – 100 % bez zjavných príznakov ochorenia (4). V takýchto prípadoch nie sú k dispozícii žiadne dáta o ich patogenite a virulencii. Tiež nemáme žiadne údaje ani o ich vplyve na biodiverzitu, zdravotný stav jednotlivých zvierat alebo ich populácii. Vplyv parazitov na populácie by sa nemal podceňovať, keďže mnoho druhov korytnačiek patrí medzi kriticky ohrozené a ich prežitie môže závisieť od rôznych ex-situ chovných programov a ochranárskeho manažmentu. K patologickým interakciám medzi hostiteľom a parazitom prispievajú aj neprirodzené podmienky chovu, enviromentálny stres a nesprávna výživa. Hlavné riziko prenosu patogénov a vzniku nových chorôb predstavuje hlavne presun zvierat do ochranárskych chovných zariadení a spätné vypúšťanie do prírody (2).

Naším hlavným cieľom bolo zistiť možný vzťah medzi parazitémiou nakazených jedincou a diferenciálnym rozpočtom leukocytov u týchto korytnačiek pomocou svetelnej mikroskopie a štatistických metód.

### Materiál a metodika

Vzorky pochádzali z dvoch druhov suchozemských korytnačiek z rodu *Testudo*. Vzoriek z druhu *Testudo marginata* bolo 23 a pochádzali z oblasti Grécka. Vzorky z *Testudo graeca* pochádzali z Iránu (N=30), Turecka (N=45) a Sýrie (N=34). Celkovo som vyšetrila teda 134 krvných

náterov. Vzorky *T. marginata*, na ktorých bol pozorovaný časový priebeh parazitémie a počítaný diferenciálny počet leukocytov, pochádzali z minulých štúdií. Sledované jedince boli tri (dve samice a jeden samec).

Krv bola odoberaná inzulínovou ihlou z dorzálnej chvostovej žily. Časť krvi bola použitá na krvné nátery a zvyšná časť bola uložená do 96% etanolu na ďalšie molekulárne metódy. Krvné nátery boli následne fixované metanolom a následne farbené Giemsovým farbivom. Prítomnosť parazitov bola zisťovaná pomocou svetelného mikroskopu Olympus BX53 pri 1000x zväčšení. Po nájdení parazitov bola spočítaná parazitémia a diferenciálny rozpočet leukocytov.

Aby sme zistili, či má samotná infekcia vplyv na počet leukocytov, porovnali sme zastúpenie jednotlivých leukocytov medzi infikovanými a neinfikovanými jedincami pomocou Mann Whitney U testu pre neparametrické a nepárové dáta. Ďalej sme porovnali zastúpenie jednotlivých leukocytov medzi pohlavím (samce x samice) a vekovými kategóriami (juvenil x adult), aby sme odhalili možné fyziologické a ontogenetické rozdiely v diferenciálnom počte leukocytov. Ako juvenil boli označené všetky korytnačky s odhadovaným vekom do 10 rokov. Staršie jedince boli označené ako adult.

U percentuálneho zastúpenia leukocytov, kde bol nájdený štatisticky významný rozdiel medzi infikovanými a neinfikovanými jedincami, sme vykonali lineárne modely, aby sme zistili, či má parazitémia vplyv na percentuálne zastúpenie daného typu leukocytu u infikovaných jedincov. Modely boli vytvorené pomocou balíčku „lme4“ v programe RStudio. Pred tvorbou modelu sme preskúmali distribúciu závislých premenných pomocou testu normality. Percentuálne zastúpenie bazofilov a eosinofilov sme transformovali pomocou druhej odmocniny, aby sme zaistili normálnu distribúciu premennej. Správnosť vytvoreného modelu bola overená diagnostickými grafmi pomocou balíčku DHARMA. Spracovanie dát a analýzy boli vykonané v programe Excel Microsoft Office a RStudio.

## Výsledky

U vzoriek zozbieraných v teréne z voľne žijúcich zvierat bol zistený štatisticky významný rozdiel medzi jednotlivými druhmi (Tabuľka 1.). U korytnačky *T. graeca* bol zistený rozdiel medzi pohlaviami v počte eozinofilov, bazofilov a heterofilov, medzi juvenilmi a adultami bol rozdiel v počte lymfocytov a heterofilov. Medzi nakazenými a nenakazenými korytnačkami bol štatisticky významný rozdiel v počte eozinofilov. U korytnačky *T. marginata* bol štatisticky významný rozdiel iba v počte bazofilov (Obrázok 1.). Po vykonaní lineárnych modelov na zistenie vplyvu parazitémie na počet leukocytov sme nezistili žiadny štatisticky významný rozdiel (Tabuľka 2.). Pri porovnávaní parazitémie a počtu leukocytov za časové obdobie nám vyšlo, že u samca *T. marginata* pri vysokej parazitémii začali počty azurofilov postupne klesať (Obrázok 2.). Pri samiciach štatisticky významný rozdiel nebol pozorovaný.

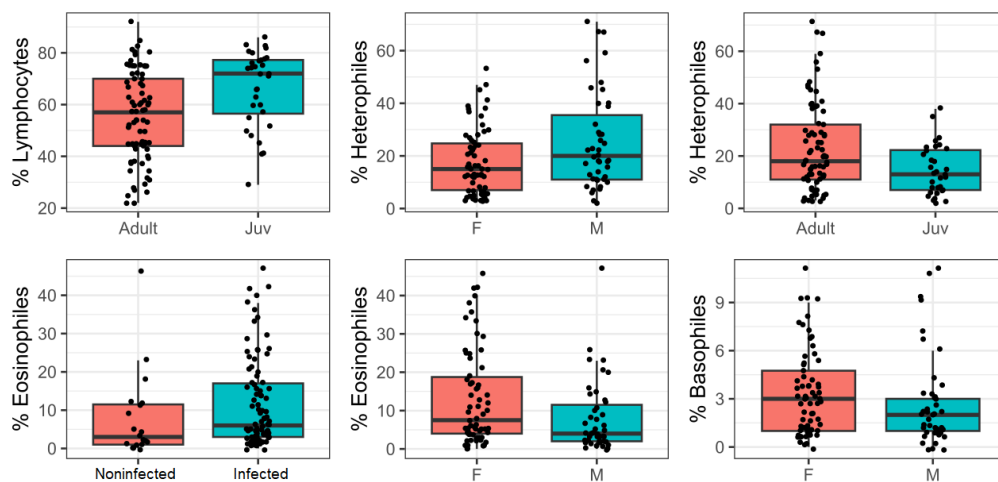
Species	Variable	Status				Sex				Age			
		Noninf.	Inf.	U	p	Female	Male	U	p	Juvenile	Adult	U	p
<i>T. graeca</i> (109)		(19)	(90)			(66)	(43)			(32)	(77)		
	Ly %	56.3 ± 19.9	59.2 ± 16.8	797.0	0.64	60.1 ± 17.3	56.7 ± 17.4	1575.5	0.33	66.5 ± 14.8	55.5 ± 17.4	769.5	<b>0.00</b>
	He %	25.6 ± 22.2	19.6 ± 13.7	937.5	0.51	17.6 ± 12.6	25.4 ± 18.5	1069.0	<b>0.03</b>	14.7 ± 9.4	23.1 ± 16.9	1569.5	<b>0.02</b>
	Eo %	9.5 ± 11.3	12.0 ± 11.6	596.0	<b>0.04</b>	13.5 ± 12.5	8.7 ± 9.3	1785.5	<b>0.02</b>	8.4 ± 8.9	13.0 ± 12.4	1380.0	0.32
	Ba %	3.1 ± 2.7	3.5 ± 2.8	700.0	0.20	3.6 ± 2.6	3.1 ± 2.9	1712.5	<b>0.06</b>	3.4 ± 2.6	3.4 ± 2.8	1219.0	0.93
Az %	8.4 ± 7.2	6.2 ± 4.4	939	0.50	6.0 ± 4.5	7.3 ± 5.7	1216.0	0.20	7.9 ± 5.6	5.9 ± 4.7	944	0.06	
<i>T. marginata</i> (23)		(4)	(19)			(8)	(15)						
	Ly %	57.3 ± 17.2	64.2 ± 12.0	27.0	0.39	66.3 ± 14.2	61.3 ± 12.3	70.0	0.53	-	-	-	-
	He %	29.5 ± 16.5	25.1 ± 11.5	45.5	0.57	22.8 ± 11.6	27.5 ± 12.5	46.5	0.40	-	-	-	-
	Eo %	7.0 ± 5.8	7.5 ± 5.3	37.0	0.96	6.6 ± 6.4	7.8 ± 4.7	50.0	0.53	-	-	-	-
	Ba %	3.8 ± 3.3	0.5 ± 1.0	62.0	<b>0.03</b>	1.4 ± 2.8	0.9 ± 1.5	60.0	0.91	-	-	-	-
Az %	2.5 ± 2.1	2.4 ± 1.8	40.0	0.22	3.0 ± 1.2	2.1 ± 2.1	79.0	0.92	-	-	-	-	

Tabuľka 1. Výsledky Mann-Whitney U testu porovnávajúceho percentá typov leukocytov korytnačiek *T. graeca* a *T. marginata* so stavom nákazy, pohlavím a vekom. Počty jedincov sú uvedené v zátvorkách. Hodnoty sú uvedené ako priemer ± štandardná odchýlka. Štatisticky významné hodnoty sú zvýraznené.

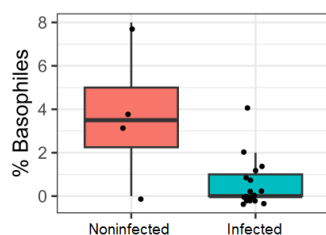
Species	Model	Variable	Estimate	SE	t value	p
<i>T. graeca</i>	Sqrt (Eo)	(Intercept)	2.89	0.19	15.00	<b>0.00</b>
		Parasitemia	-0.01	0.07	-0.06	0.94
<i>T. marginata</i>	Sqrt (Ba)	(Intercept)	0.72	0.19	3.73	<b>0.00</b>
		Parasitemia	-0.10	0.07	-1.44	0.16

Tabuľka 2. Vplyv parazitémie na percentá eozinofilov a bazofilov vypočítaný pomocou lineárnych modelov.

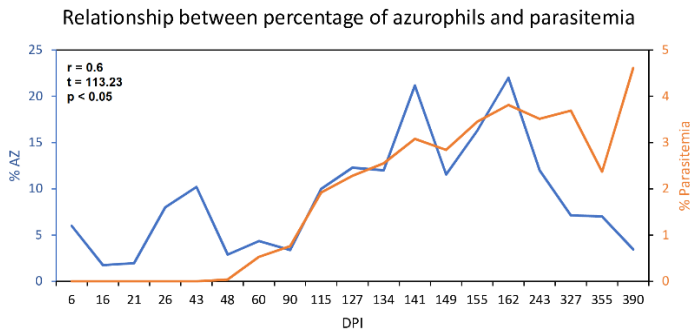
#### *T. graeca*



#### *T. marginata*



Obrázok 1. Boxploty vyjadrujúce vzťahy medzi percentami niektorých leukocytov a pohlavím, vekom a stavom u *T. marginata* a *T. graeca*.



Obrázok 2. Graf znázorňujúci vzťah medzi percentom azurofilov a parazitémiou za časové obdobie u testovaného samca *T. marginata*.

### Zoznam literatúry:

- 1) HUDSON P.; RIZZOLI A.; GRENFELL B.T.; HEESTERGEER J.A.P.; DOBSON A.P.: The Ecology of Wildlife Diseases. Oxford University Press, 2002. 216 pp. ISBN: 9780198506195
- 2) MEYER L.N.; DU PREEZ L.; BONNEAU E.; HÉRITIER L.; FRANCH M.; VALDEÓN A.; SADAOUI A.; KECHEMIR-ISSAD N.; PALACIOS C., VERNEAU O.: Parasite host-switching from the invasive American red-eared slider, *Trachemys scripta elegans*, to the native Mediterranean pond turtle, *Mauremys leprosa*, in natural environments. *Aquatic Invasions*, 2015 10(1): 79-91, doi: <http://dx.doi.org/10.3391/ai.2015.10.1.08>
- 3) ŠIROKÝ P.; KAMLER M.; FRYE F.L.; FICTUM P.; MODRÝ D.: Endogenous development of *Hemolivia mauritanica* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in the marginated tortoise *Testudo marginata* (Reptilia: Testudinidae): evidence from experimental infection. *Folia Parasitologica*, 2007, 54(1): 13-18, doi: 10.14411/fp.2007.002
- 4) ŠIROKÝ P.; MIKULÍČEK P.; JANDZIK D.; KAMI H.; MIHALCA A.D., ROUAG R.; KAMLER M.; SCHNEIDER C.; ZÁRUBA M.; MODRÝ D.: Co-distribution pattern of a haemogregarine *Hemolivia mauritanica* (Apicomplexa: Haemogregarinidae) and its vector *Hyalomma aegyptium* (Metastigmata: Ixodidae). *Parasitology*. 2009, 95(3):728-33, doi: 10.1645/GE-1842.1
- 5) ZECHMEISTEROVÁ K.; PŘIBYL M.; MANH NGUYEN H.; NOSKOVÁ E.; ŠIROKÝ P.: Haemogregarines of the genera *Haemogregarina*, *Hemolivia*, and *Hepatozoon* infecting Vietnamese freshwater turtles, with additional notes on primer specificity and primer-template mismatches affecting diagnostic success. *Protist*. 2022, 173(4):125884, doi: 10.1016/j.protis.2022.125884

***Táto práca bola financovaná grantom IGA VETUNI: 218/2023/FVHE.***

# **Vliv přídatku beta-glukanů v krmivu na pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) po experimentální challenge *Aeromonas salmonicida***

**Ivana Mikulíková, Zuzana Lepková, Hana Novotná, Ivona Toulová, Aneta Kubičková,  
Lucie Veitová**

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

## **Úvod**

Se zvyšující se intenzivní produkcí rybní akvakultury zároveň dochází ke zvyšování rizika propuknutí infekčních onemocnění. Nejvýznamnějším rizikem jsou bakteriální onemocnění, jejichž tlumení je i v současné době spojeno s použitím chemoterapeutických látek. Ty však představují potenciální nebezpečí pro životní prostředí a mohou mít negativní vliv na kvalitu konečného produktu i na zdraví lidí. Jednou z nejvýznamnějších patogenních bakterií u lososovitých ryb je *Aeromonas salmonicida*, která je původcem furunkulózy. Toto onemocnění může způsobit vysokou úmrtnost rybní obsádky a s tím související významné ekonomické ztráty v intenzivní akvakultuře (Park et al., 2020). V rámci preventivních opatření v chovech se využívá řada látek s pozitivním účinkem na zdravotní stav ryb. V posledních letech je pozornost zaměřena na využití beta-glukanů. Jedná se o polysacharidové deriváty bakterií, hub, kvasinek, řas a rostlin, které hrají důležitou roli v imunomodulaci. U různých druhů ryb byl zjištěn účinek zejména na nespecifickou imunitní odpověď (např. Liu et al., 2022; Meena et al., 2013; Lin et al., 2011).

## **Metodika**

V rámci projektu byli použiti juvenilní pstruzi duhový (*Oncorhynchus mykiss*). Pětítýdenní infekční část experimentu (VETUNI) navazovala na část odchovnou (MENDELU, 8 týdnů) (Obr. 1). Ryby byly rozděleny do 4 skupin (přídavek beta-glukanů v krmivu 0 %, 0,2 %, 0,5 % a 1 %). Po ukončení odchovné části byly prostřednictvím imerzní koupele ryby experimentálně infikovány patogenní bakterií *Aeromonas salmonicida*. V průběhu testu byla zjišťována mortalita, změny chování ryb a příjmu krmiva. Osm týdnů po zahájení pokusu a 5 týdnů po experimentální challenge byla rybám odebrána krev na hematologické a biochemické vyšetření a na imunologické analýzy. Dále byl odebrán hlen z povrchu těla pro stanovení aktivity lysozymu. Následně byly ryby usmrceny v souladu s § 5i Zákona 246/1992 Sb. Byly zjištěny biometrické ukazatele. Z obsahu střeva ryb byla vyzolována DNA a bude provedena metagenomická analýza složení střevního mikrobiomu.

## Výsledky

Porovnání výsledků fagocytární aktivity na konci odchovné a infekční části ukazuje jisté zvýšení této aktivity 5 týdnů po experimentální challenge u všech skupin oproti stavu před challenge z důvodu reakce imunitního systému na *A. salmonicida* (Graf 1, 2). Statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými skupinami navzájem však nepozorujeme.

V rámci biochemických parametrů pozorujeme statisticky významnou odchylku u Pi (anorganický fosfor), TP (celková bílkovina) a TAG (triacylglyceroly). U Pi byl zjištěn statisticky vysoce významný rozdíl ( $p < 0,01$ ) mezi skupinou s 0,5 % a 0,2 % beta-glukanů, stejně tak mezi skupinou s přídatkem 0,5 % a 1 % beta-glukanů, skupina s přídatkem 0,5 % měla v obou případech vyšší hodnoty Pi (Graf 3). Statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) byl zjištěn mezi kontrolou a 0,2 % a mezi kontrolou a 1 % beta-glukanů, kontrolní skupina měla v obou případech vyšší hodnoty Pi. Přídavek beta-glukanů měl vliv na celkovou bílkovinu krevní plazmy, kde byl zjištěn statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) mezi skupinami s 0,5 % a 1 % přídatku beta-glukanů, skupina s přídatkem 0,5 % beta-glukanů měla vyšší hodnoty TP (Graf 4). Mezi ostatními skupinami nebyl zaznamenán žádný významný rozdíl. U triacylglycerolů byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi skupinami s 0,5 % a 1 % přídatku beta-glukanů, skupina s přídatkem 0,5 % beta-glukanů měla vyšší hodnoty TAG (Graf 5). U ostatních biochemických parametrů nebyl zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl.

Výsledky hematologického vyšetření krve z odběru na konci infekční části experimentu také neprokázaly statisticky významné odchylky mezi skupinami v žádném z měřených parametrů (Tabulka 1).

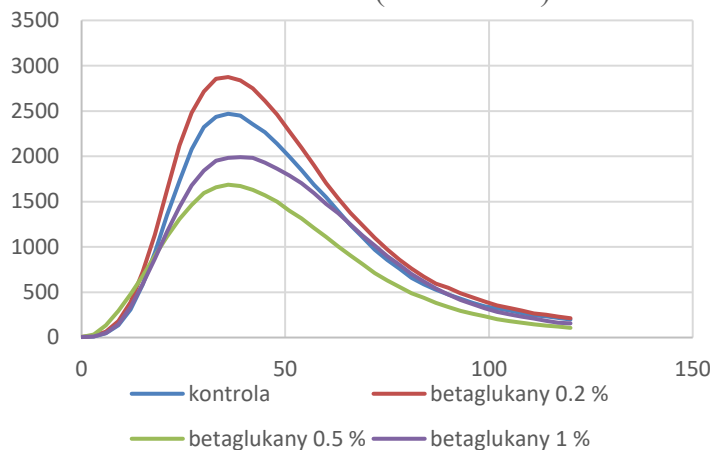
Další analýzy (metagenomická analýza složení střevního mikrobiomu, stanovení titru specifických protilátek, stanovení aktivity lysozymu v kožním slizu) nyní probíhají.

Obr. 1: Časová osa průběhu experimentu

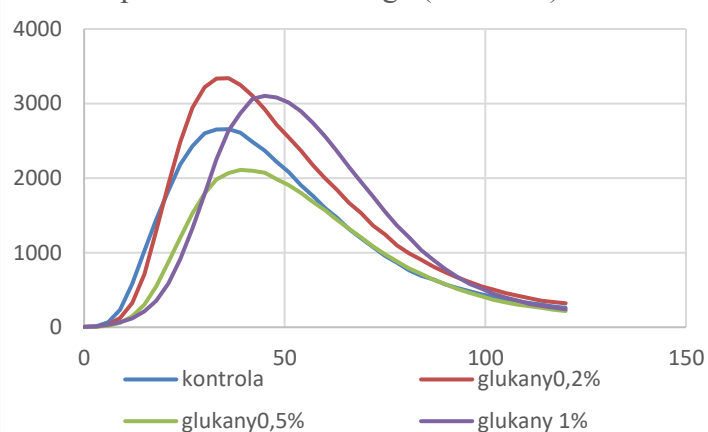




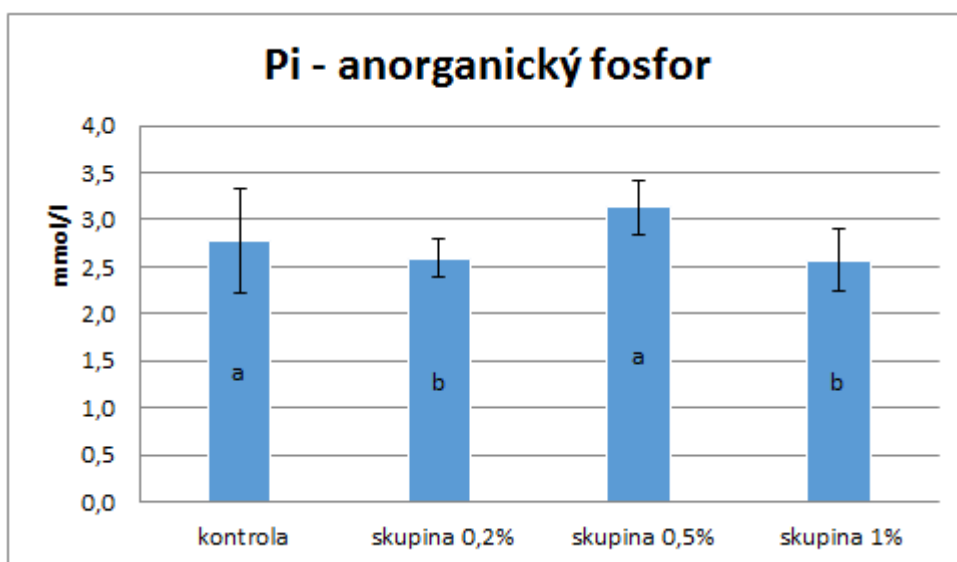
Graf 1: Fagocytární aktivita na konci odchovné části (MENDELU)



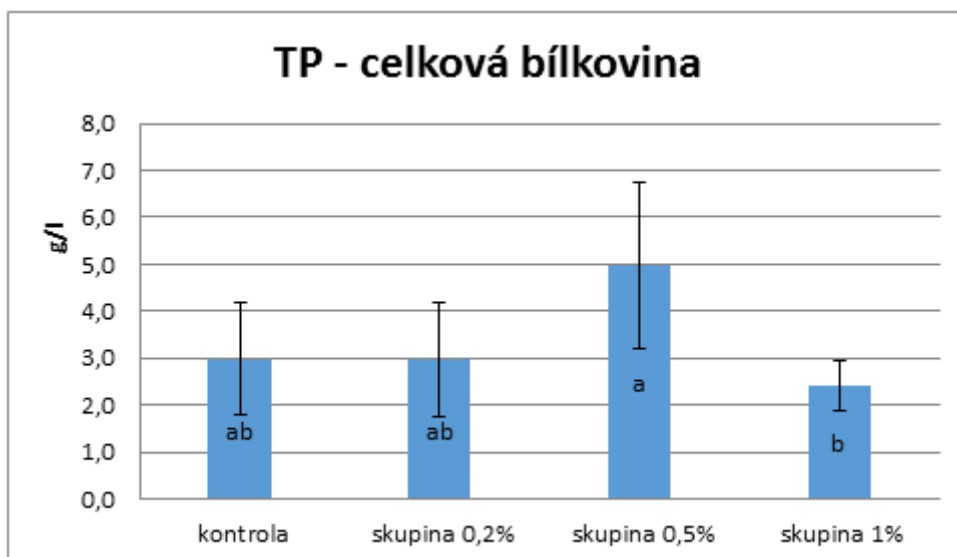
Graf 2: Fagocytární aktivita 5 týdnů po experimentální challenge (VETUNI)



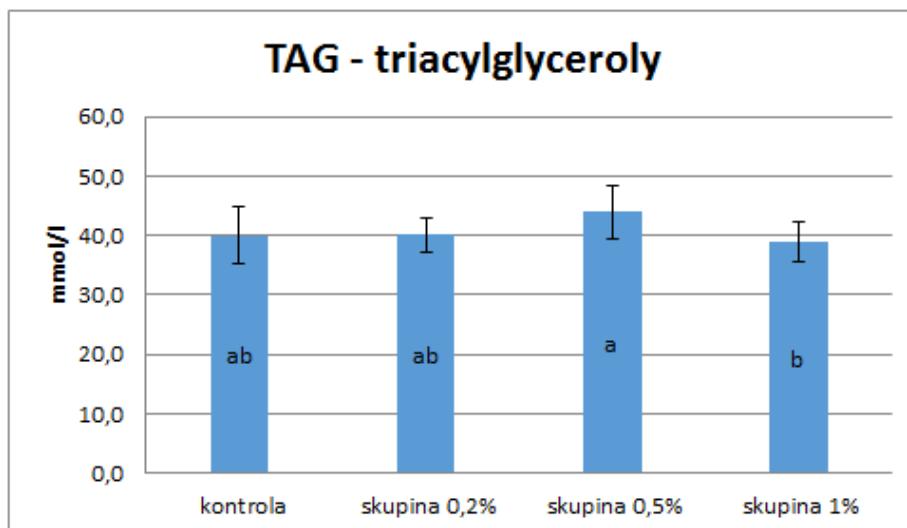
Graf 3: Hodnoty anorganického fosforu v krevní plazmě 5 týdnů po experimentální challenge



Graf 4: Hodnoty celkové bílkoviny v krevní plazmě 5 týdnů po experimentální challenge



Graf 5: Hodnoty triacylglycerolů v krevní plazmě 5 týdnů po experimentální challenge



Tabulka 1: Hematologické parametry (n = 12, průměr ± SD) 5 týdnů po experimentální challenge

	Hemoglobin [g/l]	Hematokrit [l/l]	Erytrocyty [T/l]	Leukocyty [G/l]
<b>Kontrolní skupina</b>	83,59±6,97	0,42±0,03	1,19±0,17	37,25±6,94
<b>0,2% beta-glukany</b>	84,80±7,24	0,42±0,04	1,18±0,07	37,00±10,25
<b>0,5% beta-glukany</b>	86,85±4,77	0,42±0,04	1,31±0,26	38,50±14,64
<b>1% beta-glukany</b>	88,98±8,20	0,43±0,05	1,20±0,21	32,60±6,10

### Seznam literatury

LIN, Shimei, et al. Effects of dietary  $\beta$ -1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(6): 788-794.

LIU, Yang, et al. Effects of dietary chrysophyte (*Poterioochromonas malhamensis*) rich in beta-glucan on the growth performance, intestinal health, lipid metabolism, immune gene expression, and disease resistance against *Aeromonas salmonicida* in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 2022, 561: 738589.

MEENA, D. K., et al. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish physiology and biochemistry*, 2013, 39(3): 431-457.

PARK, Seon Young, et al. Recent insights into *Aeromonas salmonicida* and its bacteriophages in aquaculture: A comprehensive review. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 30(10): 1443-1457.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 216/2023/FVHE.***

Editovali:	prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D. prof. MVDr. Alois Čížek, CSc. doc. MVDr. Miša Škorič, Ph.D. prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D., Dipl. ECZM doc. MVDr. Josef Kameník, CSc., MBA
Název:	Konference Interní grantové agentury VETUNI
Počet stran:	101
Vydání:	První
Vydavatel:	Veterinární univerzita Brno Brno 2023

**ISBN 978-80-7305-946-0**