

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

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

**KONFERENCE
INTERNÍ GRANTOVÉ AGENTURY**

konané dne 10. prosince 2020

SBORNÍK

BRNO 2020

Konference Interní grantové agentury VFU Brno 2020

Fakulta veterinárního lékařství

Fakulta veterinární hygieny a ekologie

SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ

z výsledků řešení projektů IGA VFU Brno 2020 financovaných z prostředků účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT na rok 2020

Editovali:

doc. MVDr. Petr Chloupek, Ph.D.

prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.

doc. MVDr. Miša Škorič, Ph.D.

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

prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D.

Za věcnou a jazykovou správnost odpovídají autoři

Vydání první

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno 2020

ISBN 978-80-7305-848-7

Vážené kolegyně, vážení kolegové,

tento sborník Vám přináší příspěvky, které byly prezentovány na závěrečné konferenci Interní grantové agentury Veterinární a farmaceutické univerzity Brno konané dne 10. prosince 2020.

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

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

doc. MVDr. Petr Chloupek, Ph.D.
předseda komise IGA VFU Brno

OBSAH

Příspěvky FVL

Vliv stresových faktorů na pandy červené (<i>Ailurus fulgens</i>) žijící v zajetí: neinvazivní monitoring.....	2
Prevalence dysplazie kyčelních kloubů a luxace patel u různých plemen koček v České republice.....	5
Role rekolonizujících volně žijících masožravců v sylvatických cyklech parazitů.....	9
Mapování B buněčných epitopů proteinu CD2v viru Afrického moru prasat.....	13
Identifikace a komparativní analýza vybraných genů přirozené imunity u čeledi Felidae.....	17
Stanovení aktivity proteinu C u psů s dilatací a torzí žaludku.....	21
Srovnání tracheální, jícnové a rektální teploty při spontánní a umělé ventilaci u psů.....	26
Výskyt preklinické DCM u výmarských ohařů a prognostický význam srdečních marker.....	29
Dynamika trombocytárních indexů v roli prediktora trombotických komplikací u psů se syndromem systémové zánětové odpovědi.....	33
Vývoj a úvodní vyhodnocení první multiplex real-time PCR k identifikaci patogenů v krvi a synovii septických hříbat.....	37
Vliv koncentrace spermií a glycerolu na parametry motility epididymálních spermií po rozmrazení inseminační dávky.....	42
Prevence a terapie karence zinku u telat pomocí různých forem Zn (ZnO, Bioplex Zn, nano sloučeniny Zn).....	46
Využití imunokoncepcie v regulaci pohlavní aktivity kozlů.....	50

Příspěvky FVHE

Prevalence a druhové složení zoonotických bakterií rodu <i>Rickettsia</i> v pijáku lužním (<i>Dermacentor reticulatus</i>).....	55
Srovnání účinků oxidu titaničitého a Magnéliho fáze suboxidu titanu na pstruha duhového (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	59
Inteligentní a aktivní vlastnosti jedlých karagenanových a chitosanových obalů s přídavkem rostlinných extraktů.....	63
Optimalizace metod pro detekci <i>Helicobacter pylori</i> a zjištění jeho výskytu v syrovém mléce.....	68
Studium vlivu orální aplikace mikroplastů na organismus pstruha duhového s důrazem na střevní mikroflóru.....	72
Soap production from waste frying oils.....	75
Efekt farmakologicky účinných látek na embryonální a juvenilní stádia ryb.....	79
Metody stanovení kortizolu ve slinách prasat a jejich využití při posuzování welfare prasat...	83
Plazmidy s geny antibiotické rezistence a jejich šíření stimulované prebiotiky doplňovanými do výživy zvířat i lidí.....	87
Fitness štúdie a komparatívna genomika klinicky významných pandemicky rozšířených kmeňov <i>Escherichia coli</i>	91
Biomarkery stresu a oxidativního stresu ve slinách koní jako ukazatel narušení dobrého welfare.....	95
Stanovení kortizolu ve slinách koz při vybraných stresových situacích v chovu.....	99
Distribuce, prevalence a hostitelské druhy Snake Fungal Disease v České republice.....	103
Výskyt zoonotických agens u hibernujících savců v přírodních a městských cyklech.....	107
Komparativní genomika rizikové linie <i>Escherichia coli</i> ST1250 z koní.....	113
Reprodukční strategie a hormony hmyzožravých netopýrů střední Evropy.....	117

Příspěvky

Fakulty veterinárního lékařství

Vliv stresových faktorů na pandy červené (*Ailurus fulgens*) žijící v zajetí: neinvazivní monitoring

Jana Doležalová¹, Andrea Ferová¹, Bára Budínska¹

Ústav fyziologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Úvod

Panda červená (*Ailurus fulgens*) patří mezi ohrožené druhy (1), jejichž reprodukci v zoologických zahradách ovlivňuje zejména extrémní klima (2). Důležitou součástí managementu chovu a odchovu v lidské péči je znalost faktorů, které mohou negativně ovlivnit reprodukci. Stres byl prokázán jako důležitý efektor, proto předpokládáme, že stresové faktory, konkrétně extrémní klima (chladné zimy $<5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a horká léta $>25\text{ }^{\circ}\text{C}$), počet návštěvníků (počet obvykle narůstá s teplým počasím), mohou působit jako významné stresory. Využitím neinvazivních metod a stanovením koncentrace kortizolu ve féces je možné vyhodnotit, které faktory nebo jejich kombinace indukují nejvyšší stresovou reakci.

Materiál a metodika

Sběr vzorků

V období únor až srpen 2020 byly vzorkovány dospělé jedince pand červených, 9 samců a 3 samice v 8 zoologických zahradách v ČR a SR. Zoologické zahrady byly vybrány s ohledem na jejich geografickou polohu a očekávané změně počasí (Zoo Liberec, Zoo Ostrava, Zoo Brno, Zoo Chomutov, Zoo Plzeň, Zoo Jihlava, Zoo Bratislava a Zoo Bojnice). Vzorky féces velikosti vlašského ořechu byly odebírané do 2 hodin po defekaci, a to v množství 1-2 vzorky jednou týdně od každého sledovaného jedince. Pro odlišení vzorků od jedinců bylo použito potravinové barvivo. Čerstvé výkaly byly uloženy do plastového zip-sáčku, identifikované jménem zvířete, hodinou a datem odběru, následně zmrazené při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do transportu. Shromážděné vzorky byly autem převezeny do laboratoře na Veterinární a farmaceutické univerzitě Brno na suchém ledu.

Sušení vzorků a extrakce hormonu

Vzorky féces byly sušeny při $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2-4 h) a 0,2 až 1,2 g vysušeného vzorku bylo re-suspendováno v poměru na 0,1 g féces bylo přidáno 0,1 ml 80% etanolu. Následně byly vzorky třepány podobu 30 minut. Potom byly centrifugovány při 5 000 ot. / min po dobu 15 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl přenesen do čisté zkumavky a skladován při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do EIA (enzyme-immuno assay) analýzy.

EIA (enzyme-immuno assay) analýza

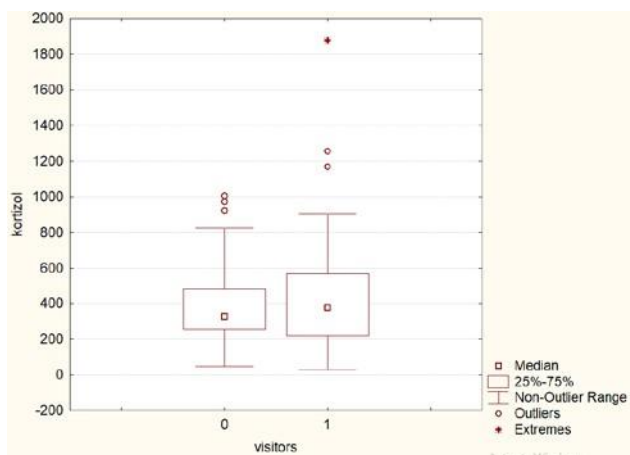
Koncentrace vyloučeného kortizolu byla stanovena pomocí komerčního kitu DetectX® Cortisol Immunoassay Kit (Arbor Assay, U. S.) dle návodu výrobce. Všechna stanovení hormonů byla prováděna duplicitně pro výpočet koeficientu variability (intra-assay CV) a zároveň s každou sérií byly analyzovány vzorky s maximální a minimální koncentrací kortizolu pro stanovení koeficientu variability mezi analýzami (inter-assay CV). Výsledky byly vyjádřeny jako imunoreaktivní steroidní metabolity v ng/g suchého féces.

Ostatní data a statistické metody

Teplotní data byla získaná z Hydrometeorologického ústavu České a Slovenské republiky, data o denním počtu návštěvníků byla poskytnuta od jednotlivých zoologických zahrad. Všechna data byla následně analyzována pomocí GLM testu (General Linear Model) a statisticky vyhodnocena korelace s vymezenými stresovými faktory (teplota, počet návštěvníků), také jestli na koncentraci má vliv pohlaví.

Výsledky

I když situace v zoologických zahradách v době projektu byla poměrně nepříznivá, podařilo se do srpna 2020 získat celkem 313 vzorků féces. Ve čtyřech zoologických zahradách byli vzorkováni pouze samci z důvodu porodu a oddělení samice od samce (3 zahrady), nebo z důvodu úmrtí samice ještě před začátkem vzorkování. Všechna stanovení hormonů byla prováděna duplicitně, intra-assay CV se pohyboval mezi 5,5-9,8% a inter-assay CV byl v rozmezí 10,3-15%. Ze všech vzorkovaných zvířat byla nejnižší koncentrace kortizolu 30,78 ng/g féces naměřena u samice v zoologické zahradě v Bratislavě a nejvyšší 1877,54 ng/g féces u samice v brněnské zoologické zahradě. Koncentrace kortizolu byla u samců 67,96 až 1168,36 ng/g féces. Celkově byla průměrná koncentrace kortizolu 411,85 (SD±212,36) ng/g, u samců 386,97 (SD±241,12) ng/g a samic 443,12 (SD±242,68) ng/g féces. Ačkoli statistická analýza vlivu pohlaví ($\chi^2 = 1,55$; $p = 0,21$), teploty vzduchu ($\chi^2 = 1,91$; $p = 0,38$), nebo přítomnosti návštěvníků ($\chi^2 = 0,73$; $p = 0,39$) na koncentraci kortizolu v období březen až srpen 2020 neprokázala statistickou významnost ani v jednom z faktorů (příklad viz obr. 1), v letním období a s navýšením počtu návštěvníku (z 0 až 3-6 tis./den) se zvýšila koncentrace kortizolu o 20%. Pro úplnost vlivu jednotlivých faktorů bude nutné zahrnout i zimní období.



Obr. 1 Vyhodnocení vlivu přítomnosti návštěvníků na produkci kortizolu u pand červených.

Závěr

Z průběžných výsledků vyplývá, že ačkoli vyšší teplota vzduchu a vyšší počet návštěvníků působí jako stresové faktory, statistická významnost potvrzena nebyla. Důležité bude vzorkování i zimním období, tj. efekt působení extrémně nízkých teplot.

Seznam literatury:

1. GLATSTON, A, WEI, F., THAN ZAW and SHERPA, A. 2015. *Ailurus fulgens* (errata version published in 2017). *The IUCN Red List of Threatened Species* 2015: e.T714A110023718. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T714A45195924.en>. Downloaded on 29 November 2020.
2. PRINCÉE, Frank PG, GLATSTON, Angela R. Influence of Climate on the Survivorship of Neonatal Red Pandas in Captivity. *ZOO Biology*. 2016, 35 (2), 104-110.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 105/2020/FVL

Prevalence dysplazie kyčelních kloubů a luxace patel u různých plemen koček v České republice

Petra Černá, Pavel Proks, Dominik Komenda, Ivana Nývltová

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

Úvod

Vrozené a vývojové ortopedické vady jsou součástí zdravotních screeningových programů u pracovních i společenských plemen psů. Informace o prevalenci vrozených a vývojových ortopedických vad u koček ve srovnání se psy jsou sporadické. Prevalence dysplazie kyčelních kloubů (DKK) v populaci koček se pohybuje v rozmezí od 6,6 % do 32 % v závislosti na velikosti zkoumané populace a plemen zařazených do studie. Vyšší výskyt DKK byl zaznamenán v populaci čistokrevných koček (12,3 %), v populaci kočky domácí je prevalence DKK odhadována na 5,8 %. Mezi čistokrevnými plemeny byla nejvyšší prevalence DKK zaznamenána u plemene mainská mývalí kočka a pohybuje se v rozmezí 18-25 %. Vyšší prevalence DKK byla zaznamenána i v populaci perských, exotických a britských koček a je dávana do souvislosti s větším tělesným rámcem těchto plemen koček. Vyšší prevalence luxace česky byla zaznamenána u plemene habešská kočka.

Materiál a metodika

V prospektivně designované studii byli vyšetřováni chovní jedinci čistokrevných plemen koček a v rámci screeningového vyšetření zdravotního stav i kříženci kočky domácí. Minimální věk jedinců zařazených do studie byl 10 měsíců. Luxace patel byla klinicky klasifikována do 4 stupňů, podle dříve publikované metodiky. Kočky byly následně uvedeny do sedace, navozené i.m nebo i.v. aplikací sedativ (butorphanol, dexmedetomidine a alfaxalone). U každého vyšetřovaného jedince byla v sedaci klinicky posouzena přítomnost laxity kyčelních kloubů (Ortolaniho příznak). Klinická laxita kyčelních kloubů byla hodnocena jako Ortoláni pozitivní nebo Ortoláni negativní. Následně byly zhotoveny rentgenogramy kyčelních kloubů ve třech projekcích (ventrodorzální extenzní, ventrodorzální flexní a laterolaterální projekce). Kyčelní klouby byly hodnoceny dle míry subluxe a přítomnosti osteoartrotických změn (DJD) do čtyř stupňů. Stupeň 0 - Normální kyčelní kloub: acetabulum překrývá kloubní jamku minimálně z 50 %, bez příznaků dysplazie kyčelního kloubu a osteoartrotických změn. Stupeň 1 - Mírná dysplazie: mírné příznaky dysplazie, acetabulum překrývá hlavici femuru z méně než 50 %, bez příznaků deformující DJD. Stupeň 2 - Střední dysplazie: střední příznaky dysplazie, střední příznaky DJD. Stupeň 3 – Těžká dysplazie: těžké příznaky dysplazie, deformující DJD. Míra překrytí kloubní hlavice a kloubní jamky byla vyjádřena

měřením Norberg-Olssonova úhlu. Přítomnost DJD byla hodnocena subjektivně. Rovněž byla zaznamenávána přítomnost přechodového lumbosakrálního přechodového obratle (LTV).

Výsledky

Celkem bylo rentgenologicky vyšetřeno 107 jedinců čistokrevných plemen koček (71 koček a 36 kocourů) a 34 jedinců (18 koček a 16 kocourů) kříženců kočky domácí straších 10 měsíců. Ve skupině čistokrevných koček bylo 85 mainských mývalích koček, 13 norských lesních koček, 5 jedinců plemene burmilla, 3 sibiřské kočky a 1 orientální kočka. Průměrný věk jedinců zařazených do studie byl 2,74 roků ($SD \pm 1,92$) Výsledné stupně dysplazie pravého a levého kyčelního kloubu jsou uvedeny v tabulce č. 1. Průměrné hodnoty Norberg-Olssonova úhlu a směrodatná odchylka u jednotlivých stupňů dysplazie naměřené ne VD extenzní a VD flexní projekci jsou uvedeny v tabulce č. 2. Unilaterální dysplazie byla zaznamenána v 14,1 % případů (20/141). Přítomnost LTV byla zaznamenána v 5,7 % případů (8/141), u plemene mainská mývalí kočka (4), norská lesní kočka (3) a burmilla (1).

Tab.1. Prevalence jednotlivých stupňů dysplazie kyčelních kloubů u různých plemen koček

Plemeno	Dx.	St. 0	St. 1	St. 2	St. 3	Sin.	St. 0	St. 1	St. 2	St. 3
Kříženci		29	4	1	0		29	3	2	0
Burmilla		2	2	1	0		2	2	1	0
Mainský mývalí kočka		50	15	16	4		52	17	9	7
Norská lesní		11	2	0	0		11		2	0
Orientální kočka		1	0	0	0		1	0	0	0
Sibiřská kočka		1	0	1	1		1	1	0	1
Celkem		94	23	19	5		96	23	14	8
Celkem %		66,67 %	16,31 %	13,48 %	3,54 %		68,10 %	16,31 %	9,92 %	5,67 %

Tab. 2 Velikost Norberg-Olssonova úhlu ve VD extenzní a VD flexní projekci

Norberg-Olssonuv úhel	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4
VD extenzní projekce	97,3 (±3,35)	87,9 (±3,15)	80,77 (±6,02)	74,2(±8,5)
VD flexní projekce	98,4 (±3,13)	91,49±(3,8)	87,9 (±6,16)	84,63(±5,83)

Luxace pately byla zaznamenána u 24,8 % koček (35/141), ve 32 případech se jednalo o bilaterální postižení (91,4 % případů). Prevalence jednotlivých stupňů luxace pately, na pravé a levé končetině, u jednotlivých plemen jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3 Prevalence jednotlivých stupňů luxace pately, na pravé a levé končetině, u jednotlivých plemen koček.

Plemeno	Dx.	St. 0	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4.	Sin.	St. 0	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4
Kříženci		34	0	0	0	0		34	0	0	0	0
Burmilla		2	1	2	0	0		2	2	1	0	0
Mainský mývalí kočka		59	21	4	1	0		60	21	4	0	0
Norská lesní		9	4	0	0	0		11	2	0	0	0
Orientální kočka		1	0	0	0	0		1	0	0	0	0
Sibiřská kočka		1	2	0	0	0		1	2	0	0	0
Celkem		106	28	6	1	0		109	27	5	0	0
Celkem %		75,1 %	19,9 %	4,3 %	0,7 %	0 %		77,3 %	19,1 %	3,5 %	0 %	0 %

Závěr

Dysplazii kyčelních kloubu je v České republice postiženo přibližně 33 % populace koček straších 10 měsíců, převážně se jedná o bilaterální postižení. Ve většině případů se jedná o lehký a střední stupeň dysplazie, těžký stupeň dysplazie byl zaznamenán v 5,7 % případů, pouze u plemene mainská mývalí kočka a sibiřská kočka. Luxace pately byla zaznamenána u 24,8 % koček (35/141), ve 32 případech se jednalo o bilaterální postižení (91,4 % případů). V převážné většině případů se jedná o mírný stupeň habituální luxace. Prevalence LTV v populaci koček je 5,7 %

Seznam literatury:

Clarke SP, Mellor D, Clements DN, Gemmill T, Farrell M, Carmichael S, Bennett D. Prevalence of radiographic signs of degenerative joint disease in a hospital population of cats. *Vet Rec.* 2005 Dec 17;157(25):793-9. doi: 10.1136/vr.157.25.793.x

Witte PG, Scott HW, Tonzing MA. Preliminary results of five feline total hip replacements. *J Small Anim Pract.* 2010 Jul;51(7):397-402. doi: 10.1111/j.1748-5827.2010.00953.x

Keller GG, Reed AL, Lattimer JC, Corley EA. Hip dysplasia: a feline population study. *Vet Radiol Ultrasound.* 1999 Sep-Oct;40(5):460-4. doi: 10.1111/j.1740-8261.1999.tb00375.x

Loder RT, Todhunter RJ. Demographics of hip dysplasia in the Maine Coon cat. *J Feline Med Surg.* 2018 Apr;20(4):302-307. doi: 10.1177/1098612X17705554.

Loughin CA, Kerwin SC, Hosgood G, Ringwood PB, Williams J, Stefanacci JD, McCarthy RJ. Clinical signs and results of treatment in cats with patellar luxation: 42 cases (1992-2002). *J Am Vet Med Assoc.* 2006 May 1;228(9):1370-5. doi: 10.2460/javma.228.9.1370.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 101/2020/FVL

Role rekolonizujících volně žijících masožravců v sylvatických cyklech parazitů

Lucia Frgelecová¹, Ondřej Daněk¹

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

Úvod

V současnosti je ve střední Evropě včetně ČR zaznamenáván nárůst populací velkých šelem, především vlka obecného (*Canis lupus*) a rysa ostrovida (*Lynx lynx*), v menší míře také medvěda hnědého (*Ursus arctos*) (Kutal et al. 2017). Potravní specializace úzce odráží vývojové cykly vícehostitelských parazitů záviselých na predaci. S návratem vrcholových karnivorů se tak stává vysoce aktuální otázka návratu parazitů, kteří je využívají jako definitivní hostitele.

Někteří z těchto parazitů vyvolávají známé zoonózy nebo mohou nakazit i domácí zvířata, či zvěř a způsobit tak ekonomické ztráty, případně znamenat riziko pro veřejné zdraví (Lesniak et al. 2017). Jedná se např. o tasemnice rodu *Taenia* a *Echinococcus*. Zástupci rodu *Taenia* mohou způsobovat potíže především svým mezihostitelům; příkladem je *T. krabbei*, která je zřejmě častým parazitem střeva vlků obecných ve střední Evropě a její vývojová stádia tvoří cysty v srdeční a příčně pruhované svalovině mezihostitelů, zejména srce obecného (Primer et al. 2002). Zoonotičtí zástupci rodu *Echinococcus* mohou vyvolat závažné onemocnění lidí. Vlk může sloužit jako definitivní hostitel *E. granulosus* (Gori et al. 2015) a napomoci tak šíření cystické echinokokózy. Vlivem migrace velkých šelem, zejména vlků, z relativně vzdálených oblastí a současného šíření vektory přenášených onemocnění lze předpokládat i možné šíření patogenů (např. krevních parazitů), kteří se na našem území dříve nevyskytovali. Z výše uvedených důvodů je proto zásadní zjistit, jaký vliv má návrat těchto šelem a jejich parazitů do ekosystémů střední Evropy a posoudit aspekty možných přenosů parazitů mezi volně žijícími a domácími zvířaty včetně zhodnocení rizika zoonotických parazitóz.

Materiál a metodika

Odebírané vzorky

V rámci projektu byly na Ústavu patologické morfologie a parazitologie prováděny pitvy vlků obecných a rysů ostrovidů získaných ve spolupráci s Agenturou ochrany přírody a krajiny ČR. Za dobu projektu byla provedena pitva u celkem 7 volně žijících divokých šelem (3× vlk obecný a 4× rys ostrovid) a při nich odebírání dospělci parazitů lokalizovaných v GIT a v respiračním traktu/srdci a vzorky trusu. Pro další projekty byly odebrány také vzorky orgánů, svaloviny, tuku a ektoparazitů. Dále byly získány vzorky trusu v rámci monitoringu velkých šelem. Soubor dospělců

parazitů byl doplněn o vzorky získané z předchozích pitev. Celkem tak byli analyzováni parazité u 8 vlků a 10 rysů.

Koprologické vyšetření

U vzorků trusu získaných z pitev nebo při monitoringu velkých šelem byla provedena základní koprologická vyšetření, celkem bylo vyšetřeno 150 vzorků. Flotační vyšetření bylo provedeno pomocí modifikovaného Sheaterova flotačního roztoku a nalezená vývojová stádia parazitů přečištěna a uschována pro následnou molekulární analýzu. Dále bylo provedeno larvoskopické vyšetření vzorků pomocí Baermannovy metody a sedimentační vyšetření. V případě pozitivních nálezů byla vývojová stádia parazitů uchována pro následné molekulární analýzy.

Izolace DNA a molekulární analýzy

Pro druhové určení tasemnic rodu *Taenia* a hlístic respiračního traktu získaných při pitvách byla provedena molekulární diagnostika. DNA byla izolována z části těla dospělého a z L1 larev metastrongylidních hlístic komerčním kitem NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel, Germany) standardním protokolem. Izolace DNA z vývojových stádií parazitů získaných flotačním vyšetřením probíhala pomocí komerčního kitu PowerSoil DNA (MOBIO).

Molekulární analýzy byly zacíleny na 2 mitochondriální markery, podjednotku 1 cytochrom c oxidázy (COI) a internal transcribed spacer 2 (ITS2). Primery JB3 a JB 4.5 amplifikující cca 400 bp dlouhý úsek COI (Bowles et al, 1992) byly použity k analýze tasemnic. ITS2 bylo použito u L1 larev metastrongylidních hlístic, primery NC1 a NC2 amplifikují úsek o délce přibližně 510 bp (Gasser et al. 1993). PCR reakce byly pro oba markery stejné, připravené v celkovém objemu 25 µl. K 12,5 µl 2× PCR BIO Taq Mix bylo přidáno po 1 µl 10mM forward a reverse primerů, 2 µl templátové DNA a 8,5 µl PCR vody. PCR protokoly jednotlivých markerů se již lišily, pro COI proběhla iniciální denaturace 95 °C/1 min, následovaná 40 cykly - denaturace při 95 °C/15 s, annealing při 55 °C/15 s a extenze při 72 °C/20 s, zakončeno finální extenzí při 72 °C/5 min. U ITS2 proběhla iniciální denaturace 95 °C/1 min, následovaná 40 cykly - denaturace při 95 °C/15 s, annealing při 58 °C/15 s a extenze při 72 °C/20 s, zakončeno finální extenzí při 72 °C/5 min. Výsledné produkty byly vizualizovány pomocí elektroforézy na 2% agarózovém gelu obarveném Midori Green Advance (Elisabeth Pharmacon, Czech Republic). Následně byly produkty přečištěné z gelu za použití kitu Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech, Taiwan) a odeslány na komerční sekvenaci (Macrogen Europe, Nizozemí). Získané sekvence byly zpracovány v programu Geneious a porovnány se sekvencemi z databáze GenBank za použití BLAST analýzy (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Výsledky a diskuze

Na základě částečné sekvence COI, která poskytuje dostatečnou variabilitu pro rozlišení jednotlivých druhů tasemnic, bylo provedeno jejich druhové určení, obvykle u 5 jedinců na pitvané zvíře. Celkem tak byly druhově určeny tasemnice u 8 vlků a 10 rysů. Nejčastějším druhem u vlka obecného byla *Taenia krabbei*, zatímco u rysa ostrovida to byla *Taenia lynciscapreoli*. Minoritně zastoupeným druhem byla *Taenia hydatigena* (Tabulka 1). *T. krabbei* a *T. lynciscapreoli* využívají volně žijící přežvýkavce jako mezihostitele, v případě *T. hydatigena* mohou být mezihostitelé i domácí přežvýkavci.

Výsledky koproskopických vyšetření včetně určení metastrongylidních hlístic na základě ITS2 jsou shrnuty v Tabulce 2. ITS2 bylo použito u L1 larev metastrongylidních hlístic jakožto nejběžněji používaný marker umožňující druhové určení larev. Překvapivým zjištěním bylo, že u více než poloviny pozitivních vzorků se jednalo o pseudoparazitismus/pasáž parazitů přežvýkavců, jakožto kořisti. Z parazitů šelem byly nalezeny druhy *Crenosoma vulpis* a v případě jednoho vzorku *Angiostrongylus vasorum*. Je to tak první nález *A. vasorum* u vlka obecného v ČR.

Získané výsledky budou publikovány v odborných časopisech a využity v navazujícím výzkumu velkých šelem.

Druhové určení tasemnic (COI)	Vlk obecný	Rys ostrovid
<i>Taenia krabbei</i>	87,5 % (7)	X
<i>Taenia hydatigena</i>	12,5 % (1)	20 % (2)
<i>Taenia lynciscapreoli</i>	X	80 % (8)

Tabulka 1: Určení tasemnic rodu *Taenia* na základě analýzy markeru COI

Vyšetření	Parazit	Vlk obecný 100 vzorků	Rys ostrovid 50 vzorků
Flotace	<i>Taenia/Echinococcus spp.</i>	34 % (34)	42 % (21)
	<i>Capillaria spp.</i>	72 % (72)	38 % (19)
	<i>Sarcocystis spp.</i>	78 % (78)	18 % (9)
	<i>Toxocara spp.</i>	29 % (29)	72 % (36)

	Celkem pozitivních vz.	87 % (87)	84 % (42)
Larvoskopie + ITS 2	<i>Crenosoma vulpis</i>	7 % (7)	0
	<i>Angiostrongylus vasorum</i>	1 % (1)	0
	<i>Varestrongylus spp.</i>	16 % (16)	12 % (6)
	<i>Elapohoststrongylus sp.</i>	14 % (14)	4 % (2)
	Celkem pozitivních vz.	36 % (36)	16 % (8)
Sedimentace	<i>Alaria alata</i>	6 % (6)	0

Tabulka 2: přehled výsledků koprologických vyšetření s % zastoupením jednotlivých parazitů

Seznam literatury:

BOWLES, J., BLAIR, D., MCMANUS, D., (1992). Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular and biochemical parasitology*. 54. 165-73.

GASSER, R., CHILTON, N., HOSTE, H., BEVERIDGE, I. (1993). Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nucleic acids research*. 21. 2525-6.
10.1093/nar/21.10.2525.

GORI, F., ARMUA-FERNANDEZ, M., MILANESI, P., SERAFINI, M., MAGI, M., DEPLAZES, P., MACCHIONI, F. (2015): The occurrence of taeniids of wolves in Liguria (northern Italy). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 4. 10.1016/j.ijppaw.2015.04.005.

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

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.

PRIMER, J., KRONE, O., SCHUSTER, R. K. (2002): *Taenia krabbei* (Cestoda: Cyclophyllidea) in Germany and its delimitation from *T. ovis*. *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*. 241. 333-337.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 104/2020/FVL

Mapování B buněčných epitopů proteinu CD2v viru Afrického moru prasat

Dagmar Břínek Kolařová, Zuzana Úlehlová, Karin Sečkařová, Vladimír Celer

Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství,

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Africký mor prasat je závažné horečnaté onemocnění s haemorrhagickým průběhem. Původcem onemocnění je dsDNA virus z čeledi *Asfarviridae*. U domácích prasat dochází v případě nakažení až ke 100 % mortalitě. Z důvodu rychlého šíření viru z endemických oblastí do okolních částí světa je podrobnější zkoumání patogeneze této virové infekce a vývoj diagnostických metod zcela zásadní. Jedním ze strukturálních proteinů, který kóduje genom viru Afrického moru prasat, je hemaglutinující transmembránový protein CD2v. Význam v patogenezi tohoto proteinu není doposud plně objasněn, nicméně jeho delecí lze docílit oddálení virémie a diseminace viru do organismu. Cílem předloženého projektu byla identifikace B–buněčných epitopů na povrchu CD2v molekuly.

Materiál a metodika

Použité peptidy

Peptidy pokrývající celou délku CD2v proteinu byly syntetizovány (Genecust, Lucembursko), naředěny v koncentraci 1mg/ml v destilované vodě nebo DMSO. Složení peptidů je uvedeno v Tabulce 1.

Označení peptidu	Aminokyselinové složení	Označení peptidu	Aminokyselinové složení
CD2v1	MIIIVIFLMCLKIVLNNIIWSTLNQTVFLNNIFT	CD2v8	KHVEEIESPPPSSENEEDISHDDTTSIHEPSREP
CD2v2	NNIFTINDTYGGLFWNTYDNNRNSNFTYCGIAGNY	CD2v9	SPREPLPKPYSRYQYNTPIYYMRPSTQPLNPFPL
CD2v3	IAGNYCSCCGHNISLYNTTNNCSLIIFPNNTVDSPT	CD2v10	NPFPLPKPCPPPKPCPPPKPCPPPKPCPPKPCSP
CD2v4	FPNTEIFNRTYELVYLDKKNYTVKLLKSVDSPT	CD2v11	KPCSPPKPCRPPKPCPPPKPCPPPKPCPPKPCPP
CD2v5	VDSPTITYNCTNSLITCKNNNGTNNVNIYLIINNTI	CD2v12	KPCPPSKPCSPESYSPPKPLPSIPLLPNIPLST
CD2v6	INNTISSLNETENINCTNPILKYQNYLSTLFYIII	CD2v13	PPLSTQNISLIHVDRII
CD2v7	FYIIIFIVSGLIIGIFISIIISVLSIRRRKRKKHVEE		

Tabulka č. 1

Použitá séra

K testování sérologické reaktivity peptidů byla použita ASFV pozitivní i negativní séra.

Pozitivní séra byla získána od divokých prasat z Polska (n=5), Španělska (n=5) a jako pozitivní kontrolní séra z diagnostických kitů (n=2). ASFV negativní séra (n=20) byla získána z chovů prasat z ČR.

Reagencie pro ELISA test

Uhličitanový pufr: Na_2CO_3 (0,75g), NaHCO_3 (1,47g) → doplnit do 500 ml ddH₂O a upravit pH na 9,6; Phosphate-Buffered Saline (PBS): NaCl (8g), KCl (0,2g), Na_2HPO_4 (1,44g), KH_2PO_4 (0,24g); Konjugát „Anti-Pig IgG (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in rabbit“ (Sigma–Aldrich.s.r.o., USA); Substrát TMB-Complete (TestLine Clinical Diagnostics s.r.o., Česká republika); Zastavovací roztok pro ELISA (TestLine Clinical Diagnostics s.r.o., Česká republika);

Použité laboratorní vybavení

1. ELISA Hydroflex (TECAN, Švýcarsko)
2. Infinite M200 PRO (TECAN, Švýcarsko)

Použité metody

In silico analýza

Primární aminokyselinová sekvence CD2v proteinu byla analyzována z hlediska umístění potenciální B buněčných epitopů prostřednictvím softwarového nástroje Immune Epitope Database (WWW.IEDB.org). Analýza byla provedena prostřednictvím algoritmů pro stanovení predikci lineárních epitopů, antigenicity a hydrophilicity.

Přítomnost lineárních B-epitopů byla dále experimentálně stanovena technikou „pepscan“ s využitím syntetických peptidů pokrývajících celou délku analyzovaného proteinu. Jednotlivé peptidy byly syntetizovány (Genecust, Lucembursko) a využity jako antigeny v ELISA testu pro stanovení jejich reaktivity s ASFV pozitivními i negativními séry.

Peptidová ELISA

Jednotlivé peptidy byly naředěny na pracovní koncentraci 20µg/ml uhličitanovým roztokem pH9.6 a napipetovány v množství 100µl/jamku ELISA destičky. Navazování peptidů a probíhalo při teplotě 4 °C přes noc. Po promytí (3x PBS) byla destička blokována 2 % BSA v PBS. (1 h při pokojové teplotě), následně byla destička 3x promyta roztokem TwPBS. Testované sérum bylo naředěno 1:50 roztokem TwPBS s 2 % BSA a napipetováno v množství 100µl/jamku. Inkubace séra probíhala 1 h při pokojové teplotě a poté byla ELISA destička 3x promyta roztokem TwPBS. Konjugát (Anti-Pig IgG-Peroxidase) byl naředěn 1:30000 v roztoku 2 % BSA v TwPBS a aplikován 100µl/jamku. Inkubace konjugátu probíhala 1 h při pokojové teplotě. Po ukončení inkubace proběhlo 3x promytí ELISA destičky roztokem TwPBS a následné závěrečné promytí, které proběhlo 1x roztokem PBS. Vizualizace reakce byla provedena inkubací se substrátem TMB-Complete (100µl/jamku, při pokojové teplotě 5-20

min) a následně byla zastavena 100 μ l zastavovacího roztoku a výsledky odečteny spektrofotometricky na vlnové délce 450nm.

Výsledky

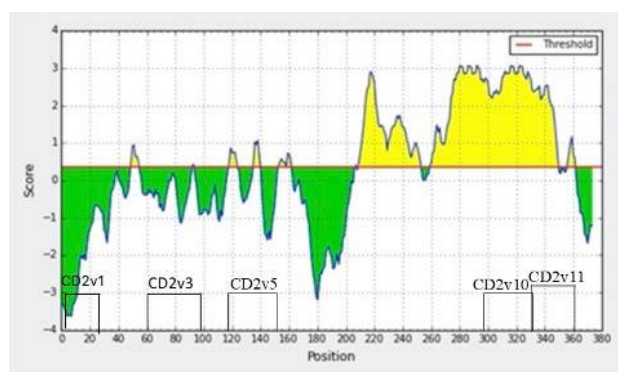
Výsledky pepscan analýzy s ASFV pozitivními a negativními séry jsou znázorněny v Tabulce 2.

Peptid č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ASFV+ séra	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
ASFV- séra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-

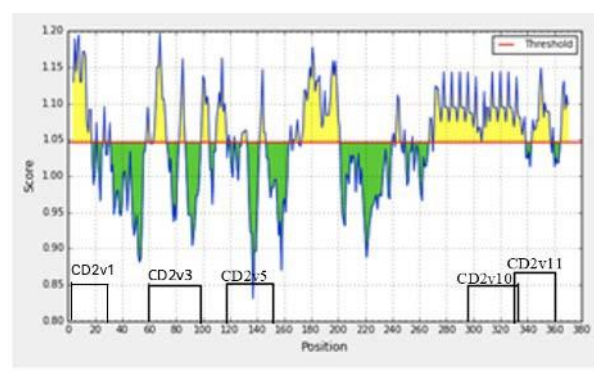
Tabulka 2. Reaktivita syntetických peptidů s kontrolními pozitivními i negativními séry.

Výsledky in-silico analýzy

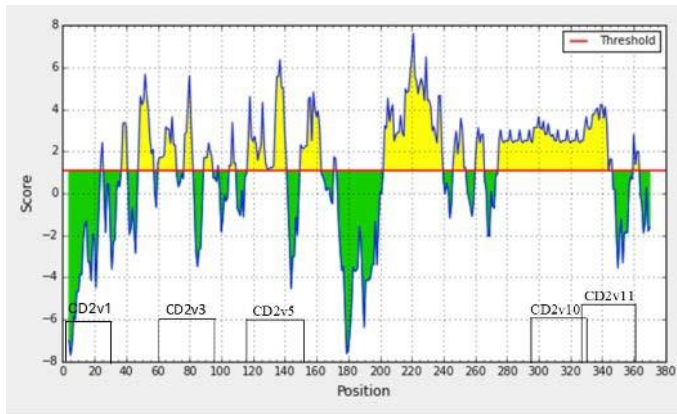
Výsledky této analýzy jsou znázorněny na obrázcích 1. - 3.



Obrázek 1. Predikce B-epitopů a porovnání s polohou sérologicky reaktivních peptidů



Obrázek 2. Predikce antigenních oblastí a porovnání s polohou sérologicky reaktivních peptidů



Obrázek 3. Predikce hydrofilních oblastí a porovnání s polohou sérologicky reaktivních peptidů

Seznam literatury:

1. Borca, M.V., Carrillo, C., Zsak, L., Laegreid, W.W., Kutish, G.F., Neilan, J.G., Burrage, T.G., Rock, D.L., 1998. Deletion of a CD2-like gene, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine. *J. Virol.* 72, 2881–2889.
2. Borca, M.V., Kutish, G.F., Afonso, C.L., Irusta, P., Carrillo, C., Brun, A., Sussman, M., Rock, D.L., 1994. An african swine fever virus gene with similarity to the T-lymphocyte surface antigen Cd2 mediates hemadsorption. *Virology* 199, 463–468.
3. Rodriguez, J.M., Yanez, R.J., Almazan, F., Vinuela, E., Rodriguez, J.F., 1993. African swine fever virus encodes a Cd2 homolog responsible for the adhesion of erythrocytes to infected-cells. *J. Virol.* 67, 5312–5320.
4. Thomson, G.R., Gaomaru, M.D., Van Dellen, A.F., 1979. ASF: pathogenicity and immunogenicity of two non-haemadsorbing viruses. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 46, 149–154.

Tato práce byla financovaná projektem IGA VFU 119/2020/FVL

Identifikace a komparativní analýza vybraných genů přirozené imunity u čeledi *Felidae*

Ján Futas¹, Jana Bubeníková¹, Leona Vychodilová¹, Petra Černá²

Ústav genetiky¹, Klinika chorob psů a koček²,

Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

NK (natural killer) buňky jsou významnou subpopulací lymfocytů s funkcí v přirozené imunitě. Mají schopnost likvidovat virem infikované a nádorové buňky bez nutnosti předchozí senzitivace a secernují množství působků (např. cytokinů, chemokinů) ovlivňujících aktivitu dalších buněk imunitního systému [1]. Rozpoznávají cílové buňky pomocí široké škály aktivačních nebo inhibičních receptorů. Jednou ze skupin aktivačních receptorů jsou NCR (natural cytotoxicity receptors), mezi které patří molekuly NKp46 (NCR1), NKp44 (NCR2) a NKp30 (NCR3). Jedná se o transmembránové proteiny typu I náležící do imunoglobulinové superrodiny. Skládají se z jedné (NCR2 a NCR3) nebo dvou extracelulárních „Ig-like“ domén (NCR1), které jsou zodpovědné za vazbu ligandů [2]. Jejich genetická struktura a funkčnost se u příbuzných druhů savců může lišit [3] a mohou být exprimovány na povrchu také jiných buněk přirozené i adaptivní imunity [4]. Úloha NK buněk u koček byla dosud zkoumána jen v omezené míře [5] a z imunologického hlediska o jejich receptorech a příslušných ligandech není mnoho známo. Felinní infekční peritonitida (FIP) ohrožuje nejen domácí kočky, ale i divoce žijící nebo v zoo chované kočkovité šelmy. Vzhledem ke své funkci jsou přitom geny pro NCR receptory prvními kandidáty pro studium genetické vnímavosti k FIP.

Materiál a metodika

Panel kočkovitých (*Felidae*)

Celkem 38 archivních vzorků periferní krve (skladovaných při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) od různých zástupců čeledi kočkovitých bylo použito k izolaci genomové DNA pomocí kitu NucleoSpin® Blood (Machery-Nagel). Byl tak vytvořen panel (viz. Tabulka 1) pokrývající převážnou většinu recentních rodů v čeledi (kromě *Catopuma*, *Pardofelis* a *Puma*). Skupina Pantherinae (velké kočky) obsahovala tyto druhy: levhart oblačkový, tygr (ussurijský, sibiřský, malajský, indočínský, sumaterský), levhart mandžuský, jaguár americký, lev (africký, indický). Skupina Felinae (malé kočky) obsahovala druhy: karakal, serval, ocelot slaništní, ocelot stromový, rys (karpatský, irkutský), jaguarundi, gepard štíhlý, manul, kočka rybářská a kočka krátkouchá.

Identifikace a resekvenování genů

V deseti publikovaných genomech kočkovitých šelem byly vyhledány sekvence genů *NCR1*, *NCR2* a *NCR3* homologické genům kočky domácí. Byly designovány specifické primery amplifikující

celou sekvenci genu *NCR1* (cca 5500 bp), *NCR2* (cca 9600 bp), *NCR3* (cca 5600 bp) a komerčně syntetizovány. Podmínky PCR reakcí byly optimalizovány. Specificita amplikonů byla ověřena pomocí komerčního Sangerova sekvenování. Následně byly PCR získány požadované amplikony od všech jedinců v panelu (kontrola gelovou elektroforézou). Pro účely masivně paralelního sekvenování celého souboru amplikonů byla změřena jejich koncentrace pomocí Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen) a byly ekvimolárně smíchány do knihoven, které byly pro identifikaci následně jednotlivě označeny indexy Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina) a po přípravě sekvencovány pomocí MiSeq Reagent Kit v2 na přístroji MiSeq (Illumina).

Bioinformatická analýza

Sekvence krátkých čtení získané pomocí MiSeq byly opracovány a mapovány na příslušnou referenční sekvenci genu z genomu kočky domácí. Tato srovnání byla vizualizována pomocí softwaru IGV Viewer (v.2.6.2) a byla vytvořena konsenzuální sekvence zvlášť pro každý amplikon v programu BioEdit (v.7.2.5) s použitím bivalentních IUPAC zkratk pro heterozygotní sekvence. Soubor sekvencí pro daný gen (včetně referenční sekvence z kočky domácí) byl následně seřazen v BioEdit-u a kódující sekvence (CDS) byla extrahována na základě srovnání (Splice algorithm, NCBI) s modelem kočičí mRNA: XM_023246047.1 (*NCR1*), XM_003986182.2 (korigován, *NCR2*) a XM_003985976.4 (*NCR3*). Haplotypy u heterozygotních jedinců byly rekonstruovány pomocí algoritmu PHASE v programu DnaSP (v.5.10.01). Pro každý druh byl zjištěn počet jedinečných haplotypů CDS a tyto byly v BioEdit-u translatovány *in silico* do aminokyselinové sekvence příslušného proteinu. Proteinové sekvence byly navzájem porovnány, bylo spočteno množství odlišných variant proteinu (s minimálně jednou aminokyselinovou záměnou) a byla stanovena frekvence aminokyselinových záměn v jednotlivých částech proteinu v rámci celého panelu. Imunoglobulinové domény receptorů byly určeny pomocí CDD Search (NCBI), transmembránové domény byly vyhledány pomocí TMHMM Server (v.2.0).

Fylogenetická a selekční analýza

Fylogenetické vztahy mezi haplotypy CDS pro jednotlivé geny byly testovány pomocí programu MEGA X (v.10.0.5). Nejprve byl vybrán nejvhodnější substituční model, pak byl prvotní strom odhadnut pomocí Neighbor-Join and BioNJ algoritmů a následně metodou Maximum Composite Likelihood vybrána topologie stromu s nejvyšší pravděpodobností. Selekční analýzy probíhaly na souboru všech haplotypů, testován byl rozdíl mezi synonymními a nesynonymními substitucemi v CDS pomocí Codon-based Z-test algoritmů v MEGA X.

Výsledky

Přehled počtu analyzovaných jedinců/sekvencí pro geny *NCR1*, *NCR2*, *NCR3* a jejich proteiny je znázorněn v tabulce 1. Rozdíl v počtu haplotypů a počtu variant proteinu pro individuální druhy svědčí o synonymních substitucích, zatímco rozdíly v celkových počtech pro panel *Felidae* svědčí o sdílení haplotypů/proteinových variant mezi druhy.

druh	počet jedinců	počet heterozygotů CDS			počet haplotypů CDS			počet variant proteinu		
		NCR1	NCR2	NCR3	NCR1	NCR2	NCR3	NCR1	NCR2	NCR3
1. <i>Neofelis nebulosa</i>	2	0	0	0	1	1	1	1	1	1
2. <i>Panthera tigris</i>	13	1	0	0	4	1	1	3	1	1
3. <i>Panthera pardus</i>	2	1	0	0	2	1	2	2	1	1
4. <i>Panthera onca</i>	1	1	1	0	2	2	1	2	2	1
5. <i>Panthera leo</i>	5	0	2	0	2	2	1	1	2	1
6. <i>Caracal caracal</i>	1	1	1	0	2	2	1	2	1	1
7. <i>Leptailurus serval</i>	1	0	1	1	1	2	2	1	2	1
8. <i>Leopardus geoffroyi</i>	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
9. <i>Leopardus tigrinus</i>	3	1	1	2	2	2	2	*2	1	2
10. <i>Lynx lynx</i>	3	0	1	0	1	2	1	1	2	1
11. <i>Herpailurus yagouaroundi</i>	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2
12. <i>Acinonyx jubatus</i>	2	1	0	0	2	1	1	2	1	1
13. <i>Otocolobus manul</i>	1	1	1	0	2	2	1	2	2	1
14. <i>Prionailurus viverrinus</i>	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
15. <i>Prionailurus bengalensis</i>	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
panel <i>Felidae</i>	38	8	9	4	25	23	16	22	21	12

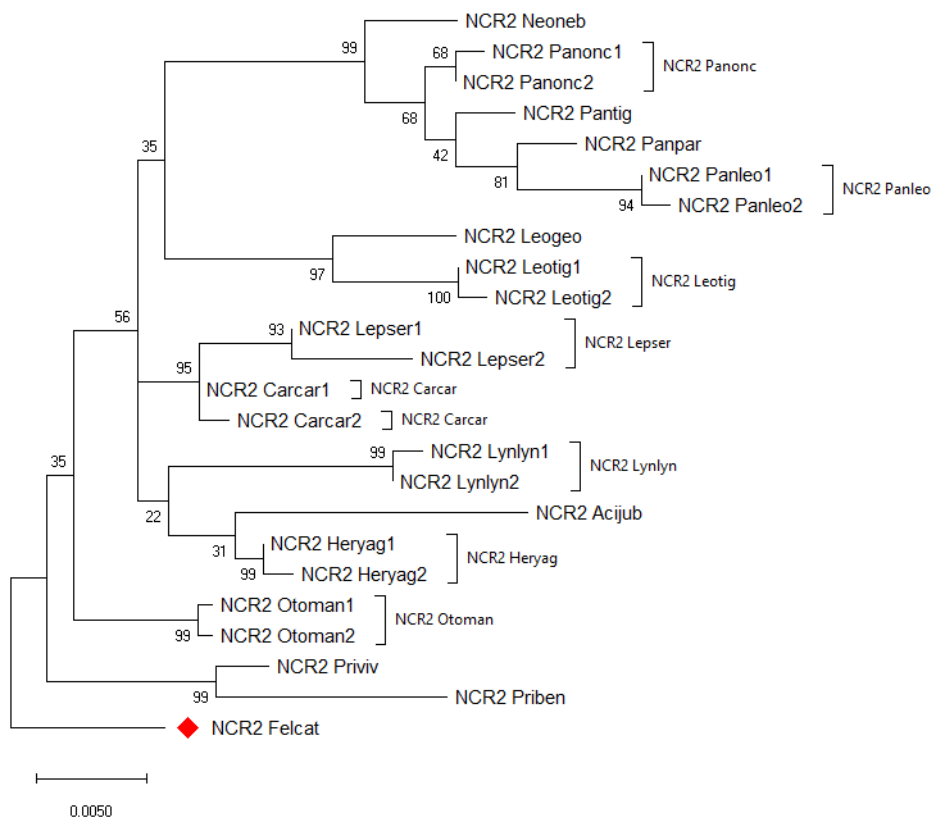
Tabulka 1 Výsledky sekvenování a bioinformatické analýzy panelu kočkovitých

*- včetně nefunkční formy kódované alelou s předčasným stop kodonem; CDS – kódující sekvence

Fylogenetický strom pro kódující sekvenci genu *NCR2* je znázorněn na obrázku 1 a je, podobně jako u *NCR1*, v souladu se zoologickou fylogenezí kočkovitých. Naproti tomu CDS genu *NCR3* neposkytl dostatečnou variabilitu k odhalení evoluce v rámci skupiny malých koček. Selekcí analýza poukázala na purifikující (negativní) selekci tohoto genu ($p=0,01$); pro *NCR1* byla zjištěna mezní hodnota ($p=0,05$). Hodnoty frekvencí nesynonymních substitucí v tabulce 2 poukazují na rozdíl mezi extracelulární a intracelulární částí proteinu, a proto podrobná selekcí analýza (pomocí PAML) bude provedena po verifikaci primárních dat. V panelu *Felidae* jsme identifikovali potenciálně funkční geny pro všechny aktivační receptory NCR u všech testovaných druhů.

protein	extracelulární část	transmembránová doména	intracelulární část
NCR1 (NKp46)	9,02%	9,09%	18,75%
NCR2 (NKp44)	19,47%	18,18%	29,27%
NCR3 (NKp30)	6,52%	9,09%	10,00%

Tabulka 2 Frekvence aminokyselinových záměn v panelu kočkovitých



Obrázek 1. Fylogenetická analýza kódujících sekvencí genu *NCR2* identifikovaných v panelu kočkovitých ve vztahu k referenční sekvenci kočky domácí

Seznam literatury:

- VITALE M, CANTONI C, DELLA CHIESA M, FERLAZZO G, et al. An Historical Overview: The Discovery of How NK Cells Can Kill Enemies, Recruit Defense Troops, and More. *Front Immunol.* 2019, 10:1415. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01415.
- KRUSE PH, MATTA J, UGOLINI S, VIVIER E. Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunology & Cell Biology.* 2014, 92 (3), 221-229. DOI:10.1038/icb.2013.98.
- HOLLYOAKE M, CAMPBELL RD, AGUADO B. NKp30 (NCR3) is a pseudogene in 12 inbred and wild mouse strains, but an expressed gene in *Mus caroli*. *Mol Biol Evol.* 2005, 22(8):1661-72. DOI: 10.1093/molbev/msi162.
- BARROW AD, MARTIN CJ, COLONNA M. The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease. *Front Immunol.* 2019, 10:909. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00909.
- VERMEULEN BL, DEVRIENDT B, OLYSLAEGERS DA, DEDEURWAERDER A, et al. Natural killer cells: frequency, phenotype and function in healthy cats. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012, 150(1-2):69-78. DOI: 10.1016/j.vetimm.2012.08.010.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 107/2020/FVL

Stanovení aktivity proteinu C u psů s dilatací a torzí žaludku

Lucie Urbanová¹, Andrea Nečasová¹, Laura Staňková¹, Alena Pompová²

Oddělení chirurgie a ortopedie, Klinika chorob psů a koček, Fakulta veterinárního lékařství,

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Magisterský studijní program – 5. ročník, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno²

Úvod

Syndrom dilatace a volvulu žaludku (gastric dilatation and volvulus, GDV) je onemocnění, které postihuje především psy velkých a obřích plemen. Příčiny vzniku GDV se doposud nepodařilo plně objasnit. Při již nastalém onemocnění GDV jsou pouze dvě možnosti řešení – chirurgický zákrok nebo eutanázie pacienta. Vzhledem k akutnosti a závažnosti stavu pacientů s GDV a radikálnosti rozhodnutí o terapii je každý prognostický údaj přínosem.

Protein C (PC), jeden z účastníků koagulační kaskády, je prekurzor vitamin-K-dependentní serinové proteázy aktivovaného PC, který má v organismu antitrombotický, profibrinolytický a protizánětlivý účinek.¹ U lidí je PC považován za negativní protein akutní fáze² a za negativní prognostický faktor u pacientů se sepsí.³ Také ve veterinární medicíně bylo prokázáno snížení koncentrace PC u pacientů s diseminovanou intravaskulární koagulopatií (DIC).⁴ Stejně jako u lidí je i u psů v sepsi nízká aktivita PC považována za negativní prognostický faktor.⁵ Jelikož je u pacientů s GDV vysoké riziko rozvoje DIC a septického stavu, mohlo by stanovení aktivity PC u těchto pacientů představovat cenný prognostický marker. Cílem této práce bylo zhodnotit roli PC jako prognostického markeru u pacientů s GDV a najít vztah mezi sníženou aktivitou PC a mortalitou pacientů s GDV, délkou trvání GDV, stupněm torze žaludku, výskytem nekrózy žaludku, nutností provedení splenektomie a vznikem DIC.

Materiál a metodika

Do studie byli zahrnuti pacienti Kliniky chorob psů a koček, Fakulty veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutické univerzity Brno s GDV, u nichž bylo provedeno chirurgické řešení stavu. Byly zaznamenány následující údaje: délka trvání GDV před předvedením na kliniku, stupeň torze žaludku, výskyt nekrózy žaludeční stěny, provedení splenektomie a mortalita.

Odběry krve u sledovaných pacientů probíhaly v rámci rutinního předoperačního a pooperačního vyšetření, a to v časech: T0 = do půl hodiny před operací, T1 = 1. den po operaci, T2 = 2. den po operaci. Byly hodnoceny následující parametry: funkční aktivita proteinu C (PC), protrombinový čas (PT), aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT), trombinový čas (TT), hladina fibrinogenu (FIB), D-dimery (DD) a počet trombocytů. Ve stanovených časech byl prováděn odběr krve do zkumavek s citrátem a EDTA. Vzorky s EDTA krví byly určeny pro stanovení množství trombocytů buďto do 1 hodiny po odběru nebo po skladování při 4°C, nejpozději do 12 hodin od odběru. Vzorky s citrátovou krví byly do 1 hodiny po odběru odstředěny (5100 otáček po dobu 15 minut) a plasma byla použita pro stanovení PC, PT, APTT, TT, FIB a DD. Citrátová plasma ke stanovení PC byla zamražena při -80°C až do jejího stanovení, s maximální dobou skladování 6 měsíců. Stanovení PT, APTT, TT, FIB a DD z citrátové plasmy probíhalo buďto do 1 hodiny od odběru, a nebo po zmražení vzorku při -20°C/-80°C, nejpozději do 3 dnů od odběru. Pacienti byli hodnoceni jako pacienti s DIC v případě, že se u nich vyskytly minimálně 3 z následujících odchylek: trombocytopenie, prodloužený PT, prodloužený APTT, snížená koncentrace fibrinogenu, zvýšená koncentraci D-dimerů. Bylo provedeno statistické zhodnocení nashromážděných dat, hladina statistické významnosti byla 5 % ($p \leq 0,05$).

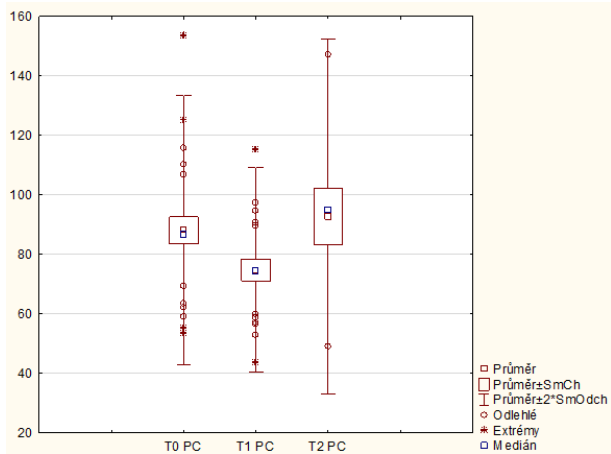
Výsledky

Do studie bylo zařazeno celkem 26 pacientů, z toho 14 fen a 12 psů. Z 16 různých plemen byli nejčastěji zastoupeni německý ovčák (23,08 %) a velký švýcarský salašnický pes (11,54 %). Průměrná hmotnost pacientů byla 41,68 kg (SD 9,85) a průměrný věk 8,21 let (SD 2,52). Během sledování uhynulo 5 z 26 pacientů (19,23 %). Dva pacienti uhynuli v průběhu chirurgického zákroku, další 3 pacienti uhynuli během pooperační hospitalizace. Aktivitu proteinu C ve sledovaných časech znázorňuje Graf 1. Nebyl prokázán vztah mezi mortalitou pacientů a plemenem, pohlavím nebo věkem. Vliv výskytu nekrózy žaludku na mortalitu pacienta nebyl statisticky prokázán, přesto při analýze logistickou regresí bylo zjištěno, že výskyt nekrózy žaludku u pacientů s GDV 11x zvyšuje riziko úhynu (Graf 2).

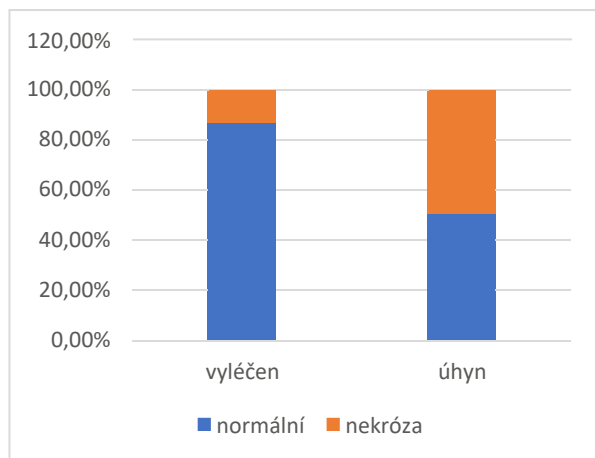
Vztah mezi sníženou aktivitou PC a mortalitou pacientů s GDV nebyl prokázán v čase T0, T1 ani T2, přesto všichni pacienti, kteří uhynuli během hospitalizace, patřili do skupiny pacientů se sníženou aktivitou PC v čase T1 (Graf 3). Nebyl prokázán vztah mezi sníženou aktivitou PC a délkou trvání GDV, stupněm torze žaludku, nekrózou žaludku a splenektomií. Dále nebyl prokázán vztah mezi sníženou aktivitou PC před operací a vznikem DIC čase T0, T1 a

T2. Byla prokázána statistická významnost mezi výskytem DIC v čase T2 a mortalitou pacientů.

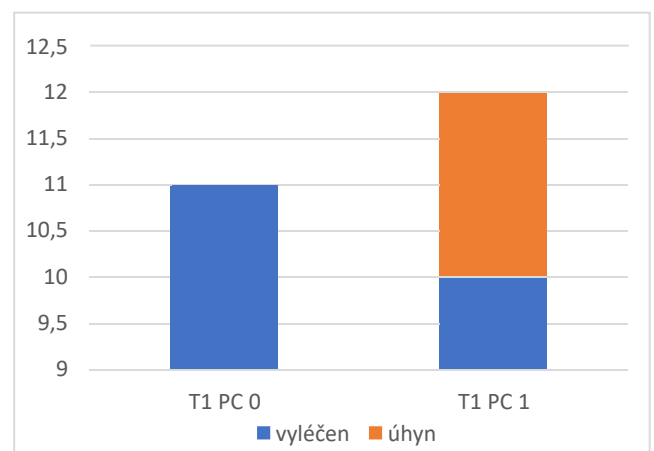
Graf 1: Aktivita proteinu C ve sledovaných časech.



Graf 2: Vliv výskytu nekrózy žaludku na mortalitu (asociační tabulka).



Graf 3: Vliv aktivity proteinu C (PC) na mortalitu.



Závěr

Prognostické faktory u pacientů s GDV jsou předmětem četných studií, jako příklad můžeme uvést hodnocení C-reaktivního proteinu (CRP), high mobility group box 1 (HMGB1), laktátu, parametrů acidobazické rovnováhy, nebo myoglobinu.⁶⁻¹¹ Nalezení spolehlivého prognostického faktoru, který by usnadnil rozhodování ohledně přínosu chirurgické terapie u konkrétního pacienta se dosud nepodařilo. Prozatím nejpřínosnějším parametrem stanovovaným u pacientů s GDV před operací je koncentrace laktátu v krvi, nicméně ani tento parametr nemá 100 % prediktivní hodnotu.^{7,8,10} Ani nám se v naší studii nepodařilo prokázat roli aktivity PC jako prognostického faktoru mortality u těchto pacientů, stejně tak se

nepodařilo prokázat vztah mezi aktivitou PC a závažností GDV (délka trvání, stupeň torze žaludku, nekróza žaludku, splenektomie). Přesto se ukázalo, že všichni pacienti, kteří uhynuli během hospitalizace, patřili do skupiny pacientů se sníženou aktivitou PC v čase T1 (první den po operaci). Podobné výsledky zaznamenali také Verschoof a kol. (2015). Přestože se nezdá pravděpodobné, že by PC představoval vhodný předoperační prognostický marker u pacientů s GDV, dosavadní výsledky poukazují na to, že jeho snížená aktivita má vliv na pooperační přežívání pacientů. Do budoucna by proto bylo vhodné zhodnotit tento parametr na větším souboru pacientů.

Seznam literatury:

1. YAN, S.B., DHAINAUT, J-F. Activated protein C versus protein C in severe sepsis. *Critical Care Medicine*. 2001, **29**(7), 69–74.
2. DHAINAUT, J-F., MARIN, N., MIGNON, A., VINSONNEAU, C. Hepatic response to sepsis: Interaction between coagulation and inflammatory processes. *Critical Care Medicine*. 2001, **29**(7), 42–47.
3. FISHER, C.J., YAN, S.B. Protein C levels as a prognostic indicator of outcome in sepsis and related diseases. *Critical Care Medicine*. 2000, **28**(9), 49–56.
4. MADDEN, R.M., WARD, M., MARLAR, R.A. Protein C activity levels in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in a dog model. *Thrombosis research*. 1989, **55**(3), 297–307.
5. De LAFORCADE, A.M., ROZANSKI, E.A., FREEMAN, L.M., LI, W. Serial evaluation of protein C and antithrombin in dogs with severe sepsis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2008, **22**(1), 26–30.
6. ADAMIK, K.N., BURGNER, I.A., KOVACEVIC, A., SCHULZE, S.P., KOHN, B. Myoglobin as a prognostic indicator for outcome in dogs with gastric dilatation-volvulus. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2009, **19**(3), 247–253.
7. BEER, K.A., SYRING, R.S., DROBATZ, K.J. Evaluation of plasma lactate concentration and base excess at the time of hospital admission as predictors of gastric necrosis and outcome and correlation between those variables in dogs with gastric dilatation-volvulus: 78 cases (2004-2009). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2013, **242**(1), 54–58.
8. MOONEY, E., RAW, C., HUGHES, D. Plasma lactate concentration as a prognostic biomarker in dogs with gastric dilatation and volvulus. *Topics in Companion Animal Medicine*. 2014, **29**(3), 71–76.
9. UHRÍKOVÁ, I., RAUSEROVA-LEXMAULOVÁ, L., REHAKOVA, K., SCHEER, P., DOUBEK, J. C-reactive protein and high mobility group box 1 in dogs with gastric dilatation and volvulus. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2015, **25**(4), 488–494.
10. VERSCHOOF, J., MORITZ, A., KRAMER, M., BAUER, N. Hemostatic variables, plasma lactate concentration, and inflammatory biomarkers in dogs with gastric dilatation-volvulus. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K Kleintiere Heimtiere*. 2015, **43**(6), 389–398.

11. SPINELLA, G., DONDI, F., GRASSATO, L., MAGNA, L., COLA, V., GIUNTI, M., DEL MAGNO, S., VALENTINI, S. Prognostic value of canine pancreatic lipase immunoreactivity and lipase activity in dogs with gastric dilatation-volvulus. *PLoS One*. 2018, **13**(9), e 0204216.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 102/2020/FVL

Srovnání tracheální, jícnové a rektální teploty při spontánní a umělé ventilaci u psů

Lukáš Novák, Petr Raušer, Jana Burová, Laura Staňková, Michal Radó

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

Úvod

Hypotermie je nejčastější perianestetická komplikace. Vyskytuje se až u 85 % pacientů v celkové anestezii (1). V humánní medicíně hypotermie souvisí s vyšším rizikem pooperační infekce, vyššími krevními ztrátami během chirurgického zákroku, vyšším výskytem kardiovaskulárních komplikací a prodlouženou dobou zotavení (2). Fyziologický rozsah teploty psa je 37,8 - 39,2 °C (3). Podchlazení nastává, když tepelné ztráty převyšují produkci tepla. Primární hypotermie je při normální tepelné produkci způsobena vystavením zvířete působení chladu, sekundární hypotermie může být vyvolána anestetiky nebo systémovým onemocněním (4). K sekundární hypotermii proto může docházet i v relativně teplém prostředí.

Při inhalační anestezii dochází ke ztrátě tělesného tepla zejména v důsledku konvekce a evaporace (4). Bylo zjištěno (5), že plicní ochranná ventilace u lidí nemá výhodu v zachování teploty pacienta ve srovnání s konvenční ventilací. Bylo popsáno (6), že samotné použití výměníků tepla a vlhkosti nemůže zabránit rozvoji hypotermie. V současné době však není vliv mechanické ventilace na tělesnou teplotu u psů dostatečně popsán.

Teplota měřená v jícnu a v konečníku jsou považovány za standard pro stanovení teploty těla. Průdušnice je také uváděna jako spolehlivé místo pro měření teploty tělesného jádra (7).

Cílem této prospektivní studie bylo zjistit 60minutové účinky mechanické ventilace na vybrané tělesné teploty u dospělých zdravých psů. Předpokládalo se, že mechanická ventilace způsobí výraznější pokles tělesné teploty ve srovnání se spontánním dýcháním.

Materiál a metodika

Do studie bylo zařazeno 40 dospělých psů. Všichni psi byli klinicky zdraví, ve věku 1 – 10 let a hmotnosti 10 – 30 kg. Projekt byl proveden formou randomizované "dvojitě slepé" studie. Svým rozsahem nepřekračoval běžně prováděné výkony a měření, proto nebyl vyžadován projekt pokusu. Psi byli náhodně rozděleni do dvou skupin, Psi v 1. skupině (SPO, n = 20) spontánně dýchali, psi ve druhé skupině (MEC, n = 20) byli mechanicky ventilováni. Anestézie zahrnovala premedikaci medetomidinem (Domitor, Orion Pharma, Finland) 0.01 mg kg⁻¹ s butorfanolem (Butomidol, Vetoquinol) 0.2 mg kg⁻¹, indukci propofolem (Propofol 1%, Fresenius Kabi) 1 – 2 mg kg⁻¹ a

udržování isofluranem (Forane, Baxter,) ve směsi kyslíku se vzduchem. Tracheální (T-tra), jícnová (T-eso) a rektální (T-rec) teplota, teplota vdechovaného plynu (T-gas) a okolní pokojová teplota (T-room), frekvence dýchání (f_R), srdeční frekvence (HR), střední arteriální tlak (MAP) a endexpirační koncentrace CO_2 ($PECO_2$) byly měřeny bezprostředně po připojení psa k okruhovému dýchacímu systému anesteziologického přístroje – výchozí hodnota (baseline) a následně v 10-minutových intervalech po dobu 60 minut (T10 – T60). Psi ze skupiny SPO dýchali spontánně, psi ze skupiny MEC byli mechanicky ventilováni (PIP 12 cm H_2O , PEEP 2 cm H_2O , f_R pro udržení normokapnie 35 – 40 mm Hg). Data byla statisticky hodnocena analýzou rozptylu (ANOVA) a Dunnettovým testem ($P < 0,05$).

Výsledky

Hodnoty teplot naměřené v jednotlivých časech jsou uvedeny v tabulce 1. Oproti výchozím hodnotám byla ve skupině SPO signifikantně nižší T-tra po 30, 40, 50 a 60 minutách, T-eso a T-rec po 40, 50 a 60 minutách. Oproti výchozím hodnotám byla ve skupině MEC T-tra a T-eso signifikantně nižší po 30, 40, 50 a 60 minutách, T-rec po 40, 50 a 60 minutách. Ve skupině SPO byl f_R ve všech sledovaných časech signifikantně nižší a $PECO_2$ vyšší v 10, 20, 30, 40 a 50 minutách ve srovnání se skupinou MEC. Žádný jiný signifikantní rozdíl mezi sledovanými skupinami ani uvnitř nich nebyl zjištěn.

Tabulka 1 Změny teploty tracheální (T-tra), jícnové (T-eso), rektální (T-rec), vdechovaného plynu (T-gas) a okolní teploty (T-room) (průměr ± směrodatná odchylka) u psů dýchajících spontánně (skupina SPO) nebo u psů ventilovaných mechanicky (skupina MEC)

		Teplota						
		Baseline	T10	T20	T30	T40	T50	T60
Skupina SPO	T-tra	37.5 ± 0.5	37.4 ± 0.5	37.3 ± 0.6	37.0 ± 0.5	36.6 ± 0.6*	36.5 ± 0.6*	36.3 ± 0.5*
	T-eso	38.7 ± 0.5	38.8 ± 0.5	38.5 ± 0.4	38.1 ± 0.5*	37.8 ± 0.5*	37.5 ± 0.6*	37.3 ± 0.6*
	T-rec	38.5 ± 0.5	38.4 ± 0.4	38.3 ± 0.5	38.0 ± 0.4	37.7 ± 0.6*	37.5 ± 0.6*	37.3 ± 0.6*
	T-gas	22.4 ± 1.4	22.5 ± 1.3	22.7 ± 1.5	22.8 ± 1.5	22.9 ± 1.5	23.1 ± 1.6	23.1 ± 1.5
	T-room	21.2 ± 0.5	21.2 ± 0.6	21.1 ± 0.4	21.2 ± 0.5	21.3 ± 0.5	21.2 ± 0.5	21.3 ± 0.6
Skupina MEC	T-tra	37.7 ± 0.5	37.6 ± 0.5	37.4 ± 0.6	37.1 ± 0.6*	37.1 ± 0.7*	36.8 ± 0.6*	36.7 ± 0.6*
	T-eso	38.8 ± 0.4	38.8 ± 0.5	38.5 ± 0.5	38.2 ± 0.5*	38.0 ± 0.5*	37.7 ± 0.6*	37.6 ± 0.6*
	T-rec	38.6 ± 0.5	38.6 ± 0.5	38.4 ± 0.5	38.2 ± 0.6	38.0 ± 0.5*	37.8 ± 0.6*	37.6 ± 0.6*
	T-gas	22.5 ± 1.6	22.6 ± 1.6	22.7 ± 1.6	22.8 ± 1.6	23.0 ± 1.6	23.1 ± 1.7	23.2 ± 1.7
	T-room	21.1 ± 0.5	21.3 ± 0.4	21.3 ± 0.5	21.2 ± 0.4	21.2 ± 0.5	21.3 ± 0.5	21.1 ± 0.4

* signifikantně nižší ve srovnání s výchozí hodnotou (baseline)

Závěr

Během anestézie medetomidin – butorfanol – propofol – isofluran u psů dochází ke srovnatelnému poklesu tělesné teploty od 30. minuty bez ohledu na to, zda psi dýchají spontánně nebo jsou ventilováni mechanicky.

Seznam literatury:

- (1) Redondo JI, Suesta P, Serra I, Soler C, Soler G, Gil L, Gomez-Villamandos RJ 2012: Retrospective study of the prevalence of postanaesthetic hypothermia in dogs. *Veterinary Record*, 171, 374–374
- (2) Brandt S, Oguz R, Hüttner H, Waglechner G, Chiari A, Greif R, Kurz A, Kimberger O 2010: Resistive-polymer versus forced-air warming: Comparable efficacy in orthopedic patients. *Anaesthesia and Analgesia*, 110, 834–838.
- (3) Armstrong SR, Roberts BK, Aronsohn M 2005: Perioperative hypothermia. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 15, 32–37.
- (4) Stepaniuk K, Brock N 2008: Hypothermia and thermoregulation during anesthesia for the dental and oral surgery patient. *Journal of Veterinary Dentistry*, 25, 279–283.
- (5) Yuksek A, Dogan Baki E, Saritas TB, Sivaci R 2019: A comparison of the effects of lung protective ventilation and conventional ventilation on thermoregulation during anaesthesia. *Turkish Journal of Anaesthesiology and Reanimation*, 47, 173–178.
- (6) Hofmeister EH, Brainard BM, Braun C, Figueiredo JP 2011: Effect of a heat and moisture exchanger on heat loss in isoflurane-anesthetized dogs undergoing single-limb orthopedic procedures. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 239, 1561–1565.
- (7) Hayes JK, Collette DJ, Peters JL, Smith KW 1996: Monitoring body-core temperature from the trachea: Comparison between pulmonary artery, tympanic, esophageal, and rectal temperatures. *Journal of Clinical Monitoring*, 12, 261–269.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 106/2020/FVL

Výskyt preklinické DCM u výmarských ohařů a prognostický význam srdečních markerů

Zita Filipejová¹, Lucie Metelková², Benicie Kosková¹

*Oddělení vnitřních chorob, Klinika chorob psů a koček, Fakulta veterinárního lékařství,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹*

*Magisterský studijní program - 6. ročník (student), Fakulta veterinární hygieny, Veterinární a
farmaceutická univerzita Brno²*

Úvod

Dilatační kardiomyopatie (DCM) je druhé nejčastější srdeční onemocnění psů, které je specifické zejména pro velká až obří plemena psů, jako jsou např. boxer, dobrman, německá doga a další.¹ Zjistili jsme, že tímto onemocněním trpí i plemeno výmarský ohař. Z tohoto důvodu je důležité pokračování ve sledování těchto pacientů do budoucna a určení „cutt off value“ echokardiografických hodnot a význam stanovení srdečních hormonů (Troponin I a NTproBNP) pro preklinickou DCM. U dobrmanů byl srdeční marker NTproBNP vyšší u pacientů s DCM, nebo u pacientů u kterých se v průběhu 1,5 roku vyvinula DCM. Senzitivita byla 90% a specifická 75%. Při echokardiografických změnách měl tento marker specifickou 90,4%.⁴ Troponin I má u dobrmanů senzitivitu 81,2 % a specifickou 73,2% pro diagnostiku okultní formy DCM.³ Opakovaným vyšetřením pacientů plemene výmarský ohař bychom mohli stanovit referenční echokardiografické hodnoty pro toto plemeno, které nebyly doposud publikovány. Dále bude zasílána krev na zjištění genu pro DCM u tohoto plemene. V dnešní době je znám gen pro rozvoj DCM pouze u dobrmanů a boxerů.^{2,5}

Materiál a metodika

Do studie byli zařazeni pouze psi plemene výmarský ohař, kteří přicházejí cíleně na naše pracoviště za účelem vybraných vyšetření. Do studie byli zahrnuti klinicky zdraví i nemocní psi bez rozdílu pohlaví a věku. Do studie byli zařazeni i pacienti, přicházející na kontrolní vyšetření. Všichni pacienti byli klinicky vyšetřeni a bylo provedeno elektrokardiografické vyšetření pomocí programu SEIVA EKG Praktik Veterinary a echokardiografické vyšetření na přístroji ALOKA 7 mikrokonvexní sondou 2,5 - 5 MHz. U pacientů s výskytem arytmií během EKG vyšetření se pokračovalo v Holterovském vyšetření. U všech pacientů bylo provedeno kompletní hematologické a biochemické vyšetření krve (CB, albumin, urea, kreatinin, ALT, AST, ALP,

GGT, bilirubin, glukóza, Na, K, P, Cl, Ca, Mg) v klinické laboratoři pro malá zvířata VFU. Krev byla odebrána *lege artis* z v. *jugularis externa* v množství 10ml. Dále byly stanoveny hormony srdečního poškození a funkčnosti (troponin I a NTproBNP) v laboratoři IDEXX. Vzorek krve byl odeslán do laboratoře Genrex pro vývoj genetického testu DCM pro výmarské ohaře. Na vývoji genetického testu pracuje RNDr. Jiří Černý, Ph.D, ve spolupráci s doc. Adam Boyka, Ph.D z Cornell University a prof. Laurie Connell, Ph.D z University of Maine. Všechna vyšetření a odběr krve byly provedeny u zvířat s písemným informovaným souhlasem majitelů. Pro stanovení diagnózy preklinická DCM byla použita doporučení dle studie **Wess G. et al. (2017) *European Society of Veterinary Cardiology screening guidelines for dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers.***

Výsledky

Do klinické studie bylo zařazeno celkově 144 psů a z toho 136 psů plemene výmarský ohař krátkosrstý (VOK) a 8 psů plemene výmarský ohař dlouhosrstý (VOD). Zastoupeno bylo 77 nekastrovaných samic, 59 nekastrovaných samců. Z plemene VOD byly zastoupeny 6 nekastrované samice a 2 nekastrovaní samci.

Průměrný věk pacientů byl 5,06 let (SD 2,19). Průměrná váha psů byla 34,07 kg (SD 4,39).

Z celkového počtu 136 VOK bylo 122 zdravých jedinců (89,7 %), z toho 70 nekastrovaných fen (57,3 %) a 52 nekastrovaných psů (42,7 %).

V souboru plemene VOK byla zjištěna preklinická forma DCM u 13 psů (9,55 %), z toho bylo zastoupeno 6 nekastrovaných psů a 7 nekastrovaných fen; arytmogenní forma DCM se prokázala u 1 nekastrovaného samce (0,7%).

Celkový počet vyšetřených jedinců z plemene VOD bylo 8. V této skupině pacientů byla diagnostikována pouze jedna preklinická DCM u nekastrované feny (12,5 %) a jedna arytmogenní forma DCM u nekastrované feny (12,5 %). Ostatní jedinci, 4 nekastrované feny (50 %) a 2 nekastrovaní psi (25 %) byli zdraví.

U všech pacientů bylo provedeno hematologické a biochemické vyšetření krví a stanovení srdečních markerů – troponiny a natriuretické peptidy. Senzitivita stanovení troponinů pro preklinickou DCM byla v naší klinické studii 38,46 % a specificita 96,43 %. Senzitivita stanovení natriuretických peptidů NtproBNP pro preklinickou DCM byla v naší studii 15,38% a specificita 96,43%. Kompletním vyšetřením krví (hematologie, biochemie), bylo vyloučeno jiné metabolické a orgánové onemocnění, které by mohly ovlivnit hodnoty srdečních markerů.

Závěr

Přínosem této práce je zjištění výskytu preklinické DCM u výmarských ohařů, zjištění prevalence tohoto onemocnění a rozšíření informace o výskytu preklinické DCM u VOK mezi majitele a chovatele výmarských ohařů. Dle dosažených výsledků je doporučováno vyšetřovat chovné jedince každý rok, bez ohledu na výskyt klinických příznaků.

Průměrný věk detekce okultní DCM u dobrmanů je 5-7 let, ale u některých jedinců je DCM diagnostikováno dříve, okolo 2. roku života.⁶ Průměrný věk u našich pacientů byl 5,06 let (SD 2,19).

Dalším pokračováním je zjištění možného genu zodpovědného za DCM u tohoto plemene. V tento okamžik není gen zjištěn.

U všech pacientů bylo provedeno hematologické a biochemické vyšetření krve a stanovení srdečních markerů – troponiny a natriuretické peptidy. Senzitivita stanovení troponinů pro preklinickou DCM byla v naší klinické studii 38,46 % a specificita 96,43 %. Senzitivita stanovení natriuretických peptidů NtproBNP pro preklinickou DCM byla v naší studii 15,38% a specificita 96,43%. Kompletním vyšetřením krve (hematologie, biochemie), bylo vyloučeno jiné metabolické a orgánové onemocnění, které by mohly ovlivnit hodnoty srdečních markerů.

V této studii nebylo prokázáno stanovení srdečních markerů (Troponin I a NTproBNP) jako statisticky významné v diagnostice okultní DCM. Echokardiografie stále představuje nejlepší metodu pro diagnostiku preklinické DCM.^{7,8}

Prognostický přínos stanovení srdečních markerů prozatím není znám, jelikož ve studii byl malý počet jedinců s preklinickou DCM, u nichž bylo provedeno opakované kardiologické vyšetření a stanovení srdečních markerů.

Opakovaným vyšetřením pacientů plemene výmarský ohař bychom mohli stanovit referenční echokardiografické hodnoty pro toto plemeno, které nebyly doposud publikovány.

Seznam literatury:

1. WESS, G., DOMENCH, O., DUKES- MCEWAN, J., HÄGGSTRÖM, J., GORDON, S. European Society of Veterinary Cardiology screening guidelines for dilated cardiomyopathy in Doberman Pinchers. J Vet Cardiol 2017, 19 (5): 405-415
2. DOMANJKO, A.P., STABEJ, P., ZEMVA, A. Dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers: Survival, causes of death and a pedigree review in a related line. J Vet Cardiology 2002, 5: 17-24
3. KLUSER L., MAIER ET., WESS G. Evaluation of a high-sensitivity cardiac troponin I assay compared to a first-generation cardiac troponin I assay in Doberman Pinschers with and without dilated cardiomyopathy. J Vet Intern Med 2019, 33(1):54-63
4. WESS G., BUTZ V., MAHLING M., HARTMANN K. Evaluation of N-terminal pro B-type natriuretic peptide as a diagnostic marker of various stages of cardiomyopathy in Doberman Pinchers. J Am Vet Reseach 2011, 72(5):642-64
5. MEURS K. M., STERN J. A., SISSON D. D., KITTLESON M. D., CUNNINGHAM S. M., AMES M. K., ATKINS C. E., DEFRANCESCO T., HODGE T. E., KEENE B. W., REINA DORESTE Y., LEUTHY M., MOTSINGER-REIF A. A., TOU S. P. Association of Dilated Cardiomyopathy with the Striatin Mutation Genotype in Boxer Dogs. J Vet Intern Med 2013, 27:1437 – 1440
6. WESS G., DOMENCH, O., DUKES- MCEWAN, J., HÄGGSTRÖM, J., GORDON, S. European Society of Veterinary Cardiology screening guidelines for dilated cardiomyopathy in Doberman Pinchers. J Vet Cardiol 2017, 19 (5):405-415
7. DUKES-McEwan J., Proposed Guidelines for Diagnosis of Canine Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. J Vet Cardiology 2003, 5(2):7
8. WESS, G., MAURER R., SIMAK J.,HARTMANN K. Use of Simpson´s method of disc to detect early echocardiographic changes in Doberman Pinchers with dilated cardiomyopathy.J Vet Intern Med 2010, 24(5):1069-76

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 117/2020/FVL

Dynamika trombocytárních indexů v roli prediktora trombotických komplikací u psů se syndromem systémové zánětové odpovědi

Lucia Černá¹, Aneta Bložoňová², Ľubica Hanusková, Jaroslav Doubek^{1,3}

Ústav fyziologie¹, Klinika chorob psů a koček², Klinická laboratoř pro malá zvířata³, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Trombocytární indexy - MPV (střední objem trombocytu), PDW (distribuční šíře trombocytů), PCT (destičkový hematokrit) a PLCR (poměr velkých krevních destiček) charakterizují populaci trombocytů výrazně komplexněji než pouze celkový počet trombocytů (PLT). Aktivace destiček a vyplavení velkých nezralých trombocytů do periferní krve je provázáno zvýšenými hodnotami PDW, MPV a PCT, přičemž hodnota PLT může zůstat nezměněna. Tyto nezralé trombocyty, které na základě stanovení pouze celkového počtu destiček nelze selektovat, mají větší plochu pro receptory, obsahují větší množství granul, a proto jsou snadněji aktivovány, což následně vede k rozvoji prokoagulačního stavu. Aktivace trombocytů je však do určité míry obranným mechanismem, kdy u pacientů s trombocytopenií nedochází k projevům koagulopatie díky zachování objemu trombocytární masy kompenzující snížený počet větším objemem destiček. O zvýšené schopnosti trombocytů agregovat informují výsledky agregometrického vyšetření trombocytů. U pacientů se syndromem systémové zánětové odpovědi je předpoklad zvýšené agregace trombocytů v návaznosti na jejich masivní aktivaci v reakci na zánět¹.

Zvýšená koncentrace degradačních produktů fibrinolýzy (D-dimerů) je vysoce citlivým parametrem pro detekci trombotických komplikací, které se mohou rozvinout u každého pacienta se systémovou zánětovou odpovědí (SIRS). V humánní medicíně byl opakovaně prokázán prognostický význam kinetiky trombocytárních indexů u pacientů se SIRS zejména v souvislosti s rozvojem sepse^{2,3}. Dynamice trombocytárních indexů ve veterinární medicíně byla věnována pouze experimentální studie na psím modelu endotoxémie⁴. Asociace změn trombocytárních indexů s mortalitou byla zjištěna v retrospektivní studii na pacientech se septickou peritonitidou⁵.

Dynamika změn trombocytárních indexů nebyla předmětem žádné prospektivní veterinární studie. Ve veterinární medicíně rovněž nebyla sledována souvislost mezi aktivací trombocytů s využitím trombocytárních indexů a rozvojem trombotických komplikací (fibrinolýzy). Korelace změn trombocytárních indexů s koncentrací D-dimerů a výsledky agregometrického vyšetření trombocytů by tak mohla přispět k objasnění patogeneze trombotických komplikací u pacientů se SIRS a současně mít potenciál prognostického markeru dostupného rutinním hematologickým vyšetřením.

Materiál a metodika

Projekt byl zaměřen na hodnocení trombocytární aktivity u akutních pacientů se syndromem systémové zánětové odpovědi. Soubor zahrnoval psy s pyometrou, syndromem GDV a septickou peritonitidou, hospitalizované na Klinice chorob psů a koček při VFU Brno. U těchto pacientů byla odebrána krev pro hematologické (EDTA), hemostazeologické (citrát)⁶ a agregometrické vyšetření (heparin) v následujících intervalech:

- A. před operací
- B. 6 – 10 hodin po operaci
- C. 18 – 22 hodin po operaci

V rámci hematologického vyšetření byly bezprostředně po odběru stanoveny trombocytární indexy (PLT, MPV, PDW, PCT a PLCR) s využitím fluorescenční průtokové cytometrie (Sysmex XT - 2000iV, Sysmex) a byl zhotoven krevní nátěr pro mikroskopické vyšetření. Vzorky odebrané na citrát byly centrifugovány a získaná plazma byla zmrazena při teplotě -20°C, max. pod dobu 1 měsíce. Z citrátové plazmy byly následně stanoveny koncentrace D-dimerů (STA Satellite Max, STAGO). Heparinová krev byla využita pro agregometrické vyšetření, které bylo provedeno prostřednictvím multipní elektrodové agregometrie (ADP test, Multiplate, Roche Diagnostics) nejpozději do 3 hodin od odběru.

U pacientů s pyometrou byla přítomnost bakteriální infekce detekována na základě cytologického vyšetření stěru z děložní sliznice po provedené hysterektomii. Diagnóza syndromu dilatace a torze žaludku (GDV) byla potvrzena na základě RTG vyšetření dutiny břišní a operačního nálezu. Septická peritonitida byla identifikována na základě cytologického průkazu intracelulárních bakterií v peritoneální efuzi a potvrzena při chirurgické revizi dutiny břišní. U všech pacientů byl zároveň monitorován vývoj jejich celkového zdravotního stavu. Klinicky relevantní změny - změna barvy sliznic, horečka, hypotermie, tachykardie, bradykardie, tachypnoe/hyperventilace, krvácivé stavy byly využity jako diagnostická kritéria pro rozvoj SIRS, resp. sepse.

Zjištěné odchylky analyzovaných parametrů byly zaznamenány a statisticky zpracovány. Hematologické a hemostazeologické vyšetření krve bylo provedeno v Klinické laboratoři pro malá zvířata VFU Brno. Agregometrické vyšetření bylo provedeno v laboratoři oddělení klinické hematologie ve Fakultní nemocnici u sv. Anny v Brně.

Výsledky

Do studie bylo zahrnuto celkem 18 pacientů (5 psů, 13 fen, medián 8,5 roku), z toho 10 pacientů se syndromem GDV, 7 s pyometrou a 1 pacient se septickou peritonitidou. Přeživších pacientů bylo 14, 2 pacienti s pyometrou uhynuli během hospitalizace do 10 hodin od chirurgického zákroku, u zbývajících 2 psů (1 pacient s GDV, 1 se septickou peritonitidou) bylo přistoupeno k eutanázii z důvodu infaustní prognózy. U některých jedinců nebylo možné provést všechny 3 odběry krve, a to z důvodu výrazné agresivity, příp. nutnosti dřívějšího propuštění do domácí péče. Odebraných vzorků bylo celkem 41.

V naměřených hodnotách trombocytárních indexů nebyly mezi jednotlivými skupinami (GDV a pyometra) a jednotlivými odběry (A, B, C) pozorovány statisticky významné rozdíly, avšak u 5 pacientů (5 krát odběr A, 3 krát odběr B a 1 krát odběr C), byla při hematologické analýze zaznamenána chybová hláška „abnormální distribuce trombocytů“. U těchto pacientů byly současně zjištěny vysoké hodnoty v agregometrickém vyšetření a také v koncentraci D-dimerů. Lze tedy předpokládat, že důvodem pro nevydání hodnot trombocytárních indexů analyzátozem jsou významné změny v jejich agregační aktivitě odrážející protrombotický stav. Ze všech pacientů s chybovou hláškou nepřežil 1 pacient s pyometrou.

Mediánová hodnota D-dimerů (v odběrech A a B) u nepřeživších pacientů (1,3 $\mu\text{g/ml}$) byla 4,3krát vyšší, než u pacientů, kteří přežili (0,3 $\mu\text{g/ml}$). Vzhledem k tomu, že zvýšené koncentrace D-dimerů jsou indikátorem trombotických stavů, odpovídají výsledky možnému rozvoji trombotických komplikací. Vyšší aktivaci trombocytů a s ní související tendenci k trombóze nasvědčují také výsledky agregometrického vyšetření. U přeživších pacientů byla v odběru A (před operací) hodnota mediánu 217,0 AU/min, přičemž hodnoty získané z odběrů B, resp. C vykazovaly klesající tendenci (72 AU/min, resp. 58 AU/min). Pacienti s vyššími hodnotami výsledků agregometrického testu vykazují neúplnou, resp. nevykazují žádnou inhibici trombocytů pod vlivem ADP, proto je u nich vyšší riziko arteriálního tromboembolismu. U nepřeživších pacientů nelze shodnotit dynamiku agregometrického vyšetření, jelikož pacienti uhynuli dřív, než byly provedeny odběry B a C. Mikroskopickým vyšetřením krevních nátěrů byla potvrzena přítomnost trombocytopenie

Seznam literatury

[1] Kalbantner K., Baumgarten A., Mischke R. Measurement of platelet function in dogs using a novel impedance aggregometer. *The Veterinary Journal*. 2010, 185/2: 144-51

- [2] Zang Z., et al. Platelet indices are novel predictors of hospital mortality in intensive care unit patients. *Journal of Critical Care*. 2014, 29/5:885 e1-e6
- [3] Guclu E., Durmaz Y., Karabay O. Effect of severe sepsis on platelet count and their indices. *African Health Sciences*. 2013, 13/2: 333-338
- [4] Yilmaz, Z., Eralp, O., et al. Evaluation of platelet count and its association with plateletcrit, mean platelet volume, and platelet size distribution width in a canine model of endotoxemia. *Veterinary Clinical Pathology*. 2008, 37/2: 159-163
- [5] Llewellyn, Efa A., Todd, Jeffrey M., et al. A pilot study evaluating the prognostic utility of platelet indices in dogs with septic peritonitis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2017, 27: 569-578
- [6] Stokol, T., et al. A comparison of platelet parameters in EDTA- and citrate-anticoagulated blood in dogs. *Veterinary Clinical Pathology*. 2007, 36/2: 148-156

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 150/2020/FVL

Vývoj a úvodní vyhodnocení první multiplex real-time PCR k indentifikaci patogenů v krvi a synovii septických hřibat

Katarína Tóthová, Olga Dobešová, Sabina Pospíšilová

Klinika chorob koní, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Neonatální seps je jednou z hlavních příčin morbidity a mortality novorozených hřibat. Rychlé a přesné stanovení původce onemocnění a možnost cílené antibiotické terapie výrazně zvyšuje pravděpodobnost rychlého a úspěšného zvládnutí septického stavu. Mikrobiologická kultivace patogenů z krve hřiběte je dodnes považována za zlatý standard pro stanovení definitivní diagnózy neonatální seps. Podstatnou nevýhodou této metody je však její časové prodlení, neboť výsledky hemokultivace bývají dostupné minimálně za 5 dní od doručení vzorku do laboratoře a antibiotická terapie je proto u kritických pacientů pouze empirická, nikoliv kauzální. PCR detekce patogenů je rychlá a vysoce senzitivní metoda a výsledky jsou dostupné od 6 do 24 hodin po doručení vzorků do laboratoře.

Multiplex-PCR je technika molekulární biologie, která je v poslední době předmětem zájmu v humánní i veterinární medicíně. V jednom multiplex PCR testu může být s použitím více párů primerů v reakční směsi amplifikována více, než jedna cílová sekvence DNA/ RNA. V rámci jediné reakce je tedy možné kvantifikovat více potenciálních patogenů, včetně virových, bakteriálních a fungálních agens. Z výsledků kultivačních vyšetření septických hřibat (Hytychova et al. 2015, Witt et al.2020) a výsledků kultivace pandetekce bakterií Sangerovou metodou bude sestaven panel nejčastějších patogenů způsobujících neonatální sepsi, septickou artritidu, průjmové a respirační onemocnění sajících hřibat.

V předchozím roce bylo na Klinice chorob koní a na Veterinární klinice Heřmanův Městec vyšetřeno celkem 46 hřibat, z toho u 15 bylo na základě stanovení septického skóre (Wong et al. 2018) vysloveno podezření na probíhající neonatální sepsi. U těchto hřibat bylo provedeno kultivační vyšetření krve a zároveň pandetekce bakterií z krve metodou PCR amplifikací 16S rDNA s následným přímým sekvenováním. U sedmi hřibat byla zároveň vyšetřena synoviální tekutina.

Cílem projektu je pokračovat v porovnání spektra patogenů zachycených metodou mikrobiologické kultivace a kvantitativní PCR pandetekce v synoviální tekutině a krvi u hřibat trpících neonatální sepsi a dále sestavit nové multiplex real-time PCR eseje pro detekci nejčastějších patogenů v krvi, synoviální tekutině, tracheálním výplašku a trusu sajících hřibat.

Cíle:

1. Vyhodnotit rozdíly hemokultivace a PCR detekce patogenů v krvi hřibat s neonatální sepsí a synoviální tekutině hřibat s podezřením na septickou synovitidu/artritidu.
2. Na základě těchto výsledků v kombinaci s výsledky publikovanými v odborné literatuře sestavit multiplex real-time PCR eseje pro detekci původce neonatální sepse, septické artritidy a průjmových a respiračních onemocnění sajících hřibat.

Materiál a metodika

Řešitelský tým vyšetřil 32 hřibat mladších třiceti dní přijatých na Kliniku chorob koní Brno, nebo Veterinární kliniku Heřmanův Městec. U všech hřibat byla odebrána detailní anamnéza. Hřibata s podezřením na neonatální sepsi byla dále klinicky, paraklinicky a laboratorně vyšetřena (hematologie, biochemie, hladina imunoglobulinů G). Na základě výsledků vyšetření byla hřiběti přidělena hodnota septického skóre dle modifikovaného systému hodnocení dle Wonga et al. (2018). Do studie byla zahrnuta hřibata s výsledkem septického skóre nad 10 bodů a dále hřibata kulhající, nebo s otokem končetinových kloubů netraumatického původu.

Odběr vzorků

U hřibat se stanoveným septickým skóre nad 10 bodů bylo z *v. jugularis* sterilně odebráno 20 ml krve pro hemokultivaci a PCR pandetekci patogenů. 10 ml krve na hemokultivaci bylo umístěno do kultivačního média pro aeroby a anaeroby a posléze bylo vyšetřeno ve veterinární laboratoři Laboklin GMBH Co.&KG, kde dle standartních laboratorních metod probíhala izolace bakterií, jejich identifikace a kvantifikace. Vzorek plné krve pro detekci PCR byl vyšetřen v Tilia Laboratories s.r.o. Izolace DNA z plné krve byla provedena kitem NucleoSpin Blood DNA (Machery-Nagel). Separaci a identifikaci fragmentů DNA získaných pomocí PCR jsme provedli gelovou elektroforézou, po které následovala extrakce DNA z gelu kitem Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd.). Byla provedena PCR amplifikace 16S rDNA s následným přímým sekvenováním PCR produktů na kapilárním sekvenátoru ABI3500. Výsledky byly porovnány se známými sekvencemi v databázi Gen Bank.

U hřibat s otokem kloubu/kloubů byl sterilně percutánní aseptickou punkcí odebrán vzorek synoviální tekutiny (2-10 ml, dle velikosti kloubu). Vzorek synovie pro mikrobiologickou kultivaci i PCR detekci byl uchován ve sterilní zkumavce. Kultivace byla provedena v laboratoři Laboklin, PCR detekce poté v laboratoři Tilia Laboratories s.r.o.

Výsledky:

Na Klinice chorob koní a Veterinární klinice Heřmanův Městec bylo celkem vyšetřeno 9 hříbat s klinickými příznaky akutně probíhající sepse, z toho 2 hříbata (22%) vykazující příznaky artritidy /synovitidy následkem hematologického rozsevu infekce. U těchto hříbat bylo odebráno celkem 9 vzorků krve na hemokultivaci a dále stanovení kauzálního patogena pomocí kvalitativní PCR pandetekce. U dvou hříbat s podezřením na septickou artritidu/synovitidu byla provedena kultivace a PCR pandetekce synovie získané aseptickou synoviocentézou postiženého kloubu/kloubů. U dvou hříbat s probíhající sepsí a infekcí unbilikálních struktur byl zároveň odebrán stěr, pro bakteriální kultivaci a PCR vyšetření.

Pozitivní výsledky hemokultivace byly získány u 2/9 hříbat (22%) Pozitivní výsledek PCR pandetekce nebyl detekován u žádného hříběte. Shodně negativní výsledky hemokultivace a PCR pandetekce byl zjištěn u sedmi pacientů (88%) (Tab 1).

V synoviální tekutině hříbat s klinickými příznaky septické artritidy nebyl detekován žádný patogen ani jednou z použitých metod.

Hříbě	Hemokultivace (krev)	PCR pandetekce (krev)	Kultivace (synovie)	PCR pandetekce (synovie)
1.	Acinetobacter spp.	Negativní	-	-
2.	Neisseria subflava	Negativní	Negativní	Negativní
3.	Negativní	Negativní	-	-
4.	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
5.	Negativní	Negativní	-	-
6.	Negativní	Negativní	-	-
7.	Negativní	Negativní	-	-
8.	Negativní	Negativní	Kultivace pupek: Beta hemolyt. Streptococcus	PCR pupek: Staphylococcus aureus
9.	Negativní	Negativní	Kultivace pupek: Micrococcus	PCR: Clostridium septicum

Tab. 1: Pozitivní výsledky hemokultivace / PCR pandetekce krve a synoviální tekutiny vyšetřených septických hříbat

Multiplex qPCR eseje jsou momentálně v procesu sestavování a testování ve spolupráci s Tilia Laboratories. Za nejčastější původce neonatální sepse byla stanovena E. Coli, Klebsiella sp., Enterobacter spp., Salmonella spp. Actinobacillus spp., Pseudomonas spp., Proteus spp, Streptococcus spp., Enterococcus spp., Staphylococcus spp., Bacillus spp., Corynebacterium spp., EHV1. Pro sestavení multiplex qPCR u septických artritid E. Coli, Actinobacillus spp, Klebsiella spp, Staphylococcus spp, Streptococcus spp a Rhodococcus equi. U průjmových onemocnění Clostridium perfringens, Clostridium difficile, Salmonella sp., Rhodococcus equi, Lawsonia intracellularis, Rotavirus a Coronavirus. Multiplex qPCR pro detekci patogenů ve vzorku tracheálního výplašku, nebo bronchoalveolární laváže, zahrnuje equinní herpesvirus 1/4, virus equinní arteritidy (EAV), Influenza A, Streptococcus spp., Streptococcus equi subsp. equi a Rhodococcus equi.

Závěr

Detekce patogenů z krve septických hřibát nedosahuje ve srovnání s mikrobiologickým kultivačním vyšetřením dostatečné senzitivity, což potvrzuje výsledky publikované v humánní medicíně.

Citlivost záchytu bakterií v synoviální tekutině se na základě výsledků z roku 2019 jeví vyšší než u mikrobiologické kultivace.

Multiplex qPCR (SeptiFast) se osvědčila pro detekci patogenů u akutních pacientů s bakteremií v humánní medicíně (Josefson et al. 2011). Senzitivita a specifita nově sestavených multiplex qPCR esejí bude vyhodnocena a porovnána s výsledky mikrobiologické kultivace.

Vzhledem k nízkému počtu vyšetřených pacientů bude projekt pokračovat i v roce 2021.

Seznam literatury:

1. *Morgenstern, C., Renz, N., Cabric, S., Perka, C., & Trampuz, A. (2018). Multiplex polymerase chain reaction and microcalorimetry in synovial fluid: can pathogen-based detection assays improve the diagnosis of septic arthritis?. The Journal of rheumatology, 45(11), 1588-1593.*
2. *Wong, D.M., Ruby, R.E., Dembek, K.A., Barr, B.S., Reuss, S.M., Magdesian, K.G., Olsen, E., Burns, T., Slovis, N.M. and Wilkins, P.A., 2018. Evaluation of updated sepsis scoring systems and systemic inflammatory response syndrome criteria and their association with sepsis in equine neonates. Journal of Veterinary Internal Medicine, 32(3), pp.1185-1193.*

3. Hytychová, T. and Bezděková, B., 2015. Retrospective evaluation of blood culture isolates and sepsis survival rate in foals in the Czech Republic: 50 cases (2011–2013). *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 25(5), pp.660-666.
4. Josefson, P., Strålin, K., Ohlin, A., Ennefors, T., Dragsten, B., Andersson, L., Fredlund, H., Mölling, P. and Olcén, P., 2011. Evaluation of a commercial multiplex PCR test (SeptiFast) in the etiological diagnosis of community-onset bloodstream infections. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 30(9), pp.1127-1134.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 121/2020/FVL

Vliv koncentrace spermií a glycerolu na parametry motility epididymálních spermií po rozmrazení inseminační dávky

MVDr. Petra Andrlová, MVDr. Miroslava Mráčková, Ph.D., MVC Kitti Horváthová, Doc. MVDr. Markéta Sedlinská, Ph.D.

Oddělení reprodukce, Klinika chorob koní, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

V současné době je k mrazení ejakulovaných i epididymálních spermií hřebců jako základní kryoprotektivum používán glycerol. Některé studie ukázaly, že koncentrace glycerolu vyšší jak 2,5 % však spermiím už výrazně škodí a snižují tedy kvalitu inseminačních dávek. Většina těchto studií probíhala při relativně nízké koncentraci spermií 100-200 x 10⁶ v ml, což znamená, že takto připravené inseminační dávky se nutně skládají z více pejet (obvykle 5–10), což je nepraktické z hlediska prostoru při uchovávání i při samotné manipulaci při inseminaci klisny. Z předchozí studie autorů vyplynulo, že koncentrace glycerolu a jeho škodlivost pro spermie je úzce spojena právě s koncentrací spermií použitých při přípravě inseminační dávky, proto by bylo výhodné využívat pro mrazení vyšší koncentraci spermií. Kvalita inseminační dávky je po rozmrazení posuzována nejčastěji v souvislosti s procentem motilních spermií, při běžném posuzování dat z měření parametrů motility po rozmrazení pomocí CASA systému poměrně jasně vyplývá, že motilita obvykle přímo souvisí s fertilizační schopností spermií. Proto hodnocení inseminační dávky po rozmrazení pomocí CASA systému zůstává stále velmi důležité zvláště pro svoji jednoduchost a relativně dobrou dostupnost. Cílem projektu tedy bylo ověřit teorii, že motilita epididymálních spermií po rozmrazení je závislá na koncentraci kryoprotektiva glycerolu a koncentraci spermií, která je při mrazení použita.

Materiál a metodika

Odebírané vzorky

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

Postup získání spermií

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

Příprava a mrazení spermií

Po získání spermií došlo k orientačnímu posouzení motility spermií ve světelném mikroskopu (Motilita 0). V případě, že motilita získaných spermií byla zhodnocena jako nižší než 10 %, vzorek byl z pokusu vyloučen. Dále byla motilita spermií objektivně posouzena pomocí CASA systému (Motilita I), vzorky byly zcentrifugovány, supernatant odsát a spermie resuspendovány v ředidle (*Gent Extender, Minitübe International*) tak, aby vznikly tři vzorky s různou koncentrací spermií (250×10^6 v ml, 500×10^6 v ml, 1000×10^6 v ml). Tyto 3 vzorky byly dále rozděleny na tři části, kdy do každé bylo přidáno jiné množství kryoprotektiva glycerolu tak aby konečná koncentrace glycerolu byla 2 %; 4 % a 6 %. Od jednoho hřebce bylo tedy nakonec získáno 9 různých vzorků. Motilita u každého vzorku byla následně vyhodnocena na přístroji CASA (Motilita II₁₋₉).

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

Posouzení spermií po rozmrazení

Nejdříve po pěti dnech od zamrazení byly pejety rozmrazeny při teplotě 38 °C po dobu 30 vteřin a na přístroji CASA byla posouzena motilita spermií bezprostředně po rozmrazení vzorku (Motilita III₁₋₉). Dále byly všechny vzorky ponechány ve vodní lázni při teplotě 38 °C a motilita spermií byla posouzena za 60; 120 a 180 minut po rozmrazení (motilita IV₁₋₉, V₁₋₉, VI₁₋₉).

Výsledky

Hlavním cílem projektu bylo ověřit teorii, že vhodná koncentrace kryoprotektiva glycerolu v ředidle pro mrazení spermií ovlivňuje motilitu epididymálních spermií po rozmrazení, a závisí na koncentraci spermií, která je při mrazení použita. V naší studii jsme tuto hypotézu potvrdili. Nejlepší motilitu vykazovaly vzorky naředěné na koncentraci 1000×10^6 v ml (průměr motilit M_{III-VI} 2,175), nejhorší motilitu vykazovaly vzorky naředěné na koncentraci 500×10^6 v ml (průměr motilit M_{III-VI} 1,55). Zároveň ale nejlepší motilitu vykazovaly vzorky s koncentrací glycerolu 4 %, nejhorší naopak vzorky s koncentrací glycerolu 2 %. Výsledky jsou zahrnuty v Tab. 1 a 2.

Tímto se dostáváme k dalšímu cíli naší studie, jímž bylo určit ideální rozsah koncentrace spermií a koncentraci glycerolu, která je ideální pro mrazení epididymálních spermií, v závislosti na jejich přežitelnosti po rozmrazení. Z našich výsledků vyplývá jako ideální vzorek 8, ve kterém byla koncentrace spermií 1000×10^6 v ml, s koncentrací glycerolu 4 %. Tento vzorek byl nejméně závislý na čase, tzn., že dosahoval podobných výsledků M_{III} i M_{VI} . Nicméně do 60 min vykazoval nejlepší motilitu vzorek 9 (koncentrace spermií 1000×10^6 v ml a glycerolu 6 %). Nejhorších výsledků bylo dosaženo u vzorku 4 (koncentrace spermií 500×10^6 v ml a glycerolu 2 %), nicméně tento vzorek měl již srovnatelné parametry s ostatními za 2-3 hodiny po rozmrazení.

Tab. 1.: Průměrné motility vzorků v závislosti na koncentraci v čase 1-3 hodiny po rozmrazení

Motilita	Koncentrace spermií		
	250×10^6	500×10^6	1000×10^6
M_{III}	2,433	1,800	2,133
M_{IV}	2,033	1,967	2,833
M_V	1,467	1,267	1,900
M_{VI}	1,400	1,167	1,833
průměr vzorků	1,833	1,550	2,175

Tab. 2.: Průměrné motility vzorků s různými koncentrací glycerolu v čase 1-3 hodiny po rozmrazení

Motilita	Koncentrace glycerolu		
	2 %	4 %	6 %
M_{III}	1,633	2,467	2,267
M_{IV}	1,800	2,800	2,233
M_V	1,600	2,033	1,300
M_{VI}	1,600	1,533	1,267
průměr vzorků	1,658	2,208	1,767

Do celkového vyhodnocení bylo zařazeno celkem 10 vzorků. Několik vzorků bylo ze studie vyřazeno kvůli nízkým motilitám již po preparaci a výplachu z nadvarlat, při výplachu některých

varlat nebylo získáno dostatečné množství spermií, aby mohly být připraveny vzorky se všemi koncentracemi.

Závěr

Velkým přínosem projektu je získání nových, dosud nepublikovaných výsledků z dané problematiky a zároveň vytvoření fungující laboratorní metodiky pro zpracování epididymálních spermií hřebců. V naší studii se jako nejideálnější ukázala koncentrace spermií 1000×10^6 v ml a koncentrace glycerolu 4 %. Protože jsme výzkum provedli u relativně malého množství vzorků, je třeba ve výzkumu dále pokračovat a doposud získané výsledky ověřit. Nicméně právě díky této studii nám bylo umožněno získat první výsledky a vytvořit precizní metodiku, která je použitelná nejen pro další výzkum, ale i pro praktické použití v kritických situacích.

Seznam literatury:

1. Barrier Battut I, Kempfer A, Lemasson N, Chevrier L, Camugli S, Prediction of the fertility of stallion froze-thawed semen using a combination of computer-assisted motility analysis, microscopical observation and flow cytometry. *Theriogenology* 2017;97:186-200.
2. Marcias Garcia B, Ortega Ferrusola C, Aparicio IM, Miro-Moran A, Morillo Rodriguez A, Gallardo Bolanos JM, Gonzales Fernandez L, Balao da Silva CM, Rodriguez Martinez H, Tapia JA, Pena FJ: Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: Effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. *Theriogenology* 2012;77:1280-1289.
3. Mráčková M, Horáčková E, Vyvial M, Vinkler A, Krisová Š, Bodeček Š, Sedlinská M: Effects of glycerol concentration on the motility of equine spermatozoa after thawing. *Acta Vet. Brno* 2017;86:11-16.
4. Neuhauser S, Bollwein H, Siuda M, Handler J: Comparison of the effect of five semen extenders on the quality of frozen-thawed equine epididymal sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2019;79:1-8.
5. Olaciregui M, Gil L, Monton A, Luno V, Jerez RA, Marti JI: Cryopreservation of epididymal stallion sperm. *Cryobiology* 2014;68:91-95.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 115/2020/FVL

Prevence a terapie karence zinku u telat pomocí různých forem Zn (ZnO, Bioplex Zn, nano sloučeniny Zn)

VLČEK M.¹, GEBOLISZOVÁ K.², URBAN J., SLÁDEK V.

Klinika chorob přežvýkavců a prasat¹, Klinická laboratoř pro velká zvířata², Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Zinek zastupuje v organismu širokou škálu funkcí a jeho dostatečný příjem je důležitý pro správný vývoj. V současné době je u telat nejvíce využíváno zinku v anorganické formě (ZnO), který se však v organismu vstřebává pouze do 10 % a je tedy ve velké míře vylučován z těla. Na rozdíl od nich, jsou formy organické (např. zinek-methionin v Bioplex Zn®, Alltech) organismem využívány až ze 60-80 %.¹ Nanosloučeniny jsou v současné době předmětem výzkumu, ale předpokládá se jejich vysoká biodegradabilita.

Ve studii porovnávající vliv organicky vázaného zinku ve formě Bioplexu s telaty v kontrolní skupině, kterým ke krmivu nebyl přidáván navíc žádný zinek, bylo zjištěno, že po 90-denním podávání 30 mg/ Zn-Methioninu/ kg sušiny, došlo u ošetřených zvířat k výrazně vyššímu nárůstu hladiny SOD. Dále byly zjištěny vyšší hodnoty u sérové hladiny zinku, albuminu, urey a imunoglobulinů.² U telat, kterým bylo podáváno 300ppm Zn-Met/Zn-Lys byla zjištěna vyšší hodnota sérového zinku než u těch, kterým byl podáván ZnO ve stejném množství. Nicméně však ani u jedné skupiny nebyl pozorován významný vliv na imunitní parametry (lymfocyty, IL-2, polymorfonukleáry)³ V průběhu roku 2019 bylo v Klinické laboratoři pro velká zvířata FVL VFU Brno vyšetřeno 208 vzorků krve telat a karencní hodnoty zinku byly zjištěny u 27 % telat.

Materiál a metodika

V rámci pokusu bylo vybráno 40ks telat Holštýnského plemene o hmotnosti 35-50 kg po nekomplikovaných porodech. Zvířata byla rozdělena do 4 skupin po 10 kusech: 1. skupina kontrolní, která přijímala zinek vyskytující se pouze v mléčné výživě a startéru, 2. skupina měla k dietě přidanou anorganickou formu zinku (ZnO), 3. skupina formu organickou (Bioplex Zn), a 4. skupina dostávala dietu obohacenou o nanosloučeniny zinku (Monolaurin Zn). Pokus byl prováděn u telat ve věku od 2. -7. dne stáří po dobu mléčné výživy do 49. dne. Po ukončení pokusu zůstala zvířata v chovu majitele při dodržení veterinárních podmínek.

Telatům byla 2. -7. den po narození odebrána krev z *v. jugularis* (maximálně 6 ml na jeden odběr). Druhý odběr krve probíhal ve 30. dnech stáří. Poslední, třetí odběr byl proveden ve 49. dni stáří.

Po narození byla telata přemístěna do profylaktoria, kde pobývala po dobu jednoho dne a byla krmena 2-3 l mleziva do 2 h po narození, za dvě hodiny poté dostala další 2 l. Následně byla ustájena v individuálních venkovních kotcích s přístupem k vodě a startéru. Mezi 2.-5. dnem života byla dvakrát denně krmena nativním mlékem. Od 6. do 35. dne dostávala dvakrát denně mléčnou náhražku, poté byla od 36. do 42. dne jejich krmná dávka složena z poloviny vodou a z poloviny mléčnou náhražkou. Třetí odběr vzorků krve probíhal 43. - 49. den, kdy telata přecházela na dietu složenou pouze z vody a startéru. Během pokusu byla telatům z 1. skupiny podávána dieta bez dalších aditiv zinku. U ošetřených skupin byl zinek přidáván do diety v množství 40 mg/tele/den.

Po odběru byla stanovena glukóza v krvi pomocí kapesního glukometru. Stanovení zbylých parametrů v krevním séru a plné krvi bylo provedeno v Klinické laboratoři pro velká zvířata, FVL VFU Brno. V krvi byly stanoveny tyto parametry: sérová hladina zinku, SOD, ALP, celková bílkovina, imunoglobuliny, Ca, P, Mg, urea. Biochemické parametry byly měřeny na biochemickém analyzátoru KONELAB 20XT a minerální profil byl stanoven pomocí atomové absorpční spektrometrie (AAS). Během posledního odběru byl telatům odebrán vzorek trusu na stanovení mikrobiomu.

Výsledky

U telat ve všech čtyřech skupinách (K-kontrola, NA-nanozinek, O-Bioplex Zn a A-ZnO) byly vyhodnoceny zadané biochemické a hematologické parametry se zaměřením na stanovení sérové hladiny zinku a jeho rozdíly mezi jednotlivými odběry a skupinami. Během prvního odběru, tj. po narození ve věku 2.-7. dní věku, nebyly zaznamenány žádné statisticky významné rozdíly v hladině sérového zinku mezi skupinami. Na rozdíl od druhého odběru ve věku 30. dní, kdy jsme naměřili statisticky významně vyšší hladinu ve skupině s organicky vázaným zinkem oproti kontrolní skupině ($p < 0,05$). Dále byly naměřeny statisticky významně vyšší hodnoty u skupiny s organicky vázaným Zn oproti anorganickému ($p < 0,01$). Během třetího odběru v době odstavu (cca 49. den věku) byly zaznamenány vyšší hodnoty zinku u skupiny s organicky vázaným zinkem oproti kontrolní skupině ($p < 0,01$).

Za fyziologickou (referenční hodnotu) sérového zinku jsme považovali hodnotu 12,2 – 18,0 $\mu\text{mol/l}$ ⁴. V našem poklusu jsme se s deficiencemi ve větší míře neselekávali (Tab. č. 1). Během prvního odběru byla karence zjištěna u 9 % v kontrolní skupině, u 18 % u skupiny s nanozinkem a organicky vázaným Zn a ve skupině s anorganicky vázaným zinkem tomu nebylo u žádného zvířete. Další deficitní hodnoty byly naměřeny během třetího odběru u 8 % zvířat v kontrolní skupině.

Průměrná naměřená hodnota Zn během prvního odběru byla u K 17,204 $\mu\text{mol/l}$, NA 17,857 $\mu\text{mol/l}$, O 18,237 $\mu\text{mol/l}$ a A 19,289 $\mu\text{mol/l}$. Během druhého odběru jsme naměřili průměrnou hodnotu u K 19,101 $\mu\text{mol/l}$, NA 19,692 $\mu\text{mol/l}$, O 20,991 $\mu\text{mol/l}$ a A 18,337 $\mu\text{mol/l}$. U třetího odběru K 16,714 $\mu\text{mol/l}$, NA 17,440 $\mu\text{mol/l}$, O 19,510 $\mu\text{mol/l}$ a A 18,278 $\mu\text{mol/l}$ (Tab.č.2).

Dle výsledků můžeme zhodnotit že u skupin, kterým byl dodáván zinek, byly naměřeny jeho vyšší hodnoty v séru. Nejlépe se jeví dodávání zinku v organické formě. Nanoformy zinku neměly tak výrazný vliv na hladinu zinku v séru, jak jsme předpokládali.

% deficitních vzorků ($\mu\text{mol Zn/l}$)	1. odběr				2. odběr				3. odběr			
	K	NA	O	A	K	NA	O	A	K	NA	O	A
> 12,2	1	2	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0
12,2 - 18,0	3	4	3	4	3	2	1	4	10	8	5	5
18,01 a <	7	5	6	6	9	11	10	7	1	5	8	6
Deficience	9 %	18 %	18 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	8 %	0 %	0 %	0 %

Tab. č. 1 Výskyt deficitních vzorků během jednotlivých odběrů (*Fyziologická hladina: 12,2 – 18,0 $\mu\text{mol/l}$; K-kontrola, NA-nanozinek (monolaurin Zn), O-organicky vázaný Zn (Bioplex Zn), A-anorganicky vázaný zinek (ZnO)*)

Průměrné hodnoty Zn v séru ($\mu\text{mol/l}$)					
		K	NA	O	A
1. odběr	X	17,204	17,857	18,237	19,489
	SD	4,426	4,033	4,577	4,449
2. odběr	X	19,101	19,692	20,991	18,337
	SD	2,048	2,030	1,840	3,057
3. odběr	X	16,714	17,440	19,510	18,278
	SD	1,088	2,761	2,774	2,773

Tab. č. 2 Průměrná hladina zinku v séru (*X-střední hodnota, SD-směrodatná odchylka; K-kontrola, NA-nanozinek (monolaurin Zn), O-organicky vázaný Zn (Bioplex Zn), A-anorganicky vázaný zinek (ZnO)*)

Seznam literatury:

1. NEVILLE F. SUTTLE, Cabi 2010. Mineral Nutrition of Livestock, 4th Edition. 579
2. DRESLER, SYLVA, JOSEF ILLEK, AND LADISLAV ZEMAN. "Effects of organic zinc supplementation in weaned calves." Acta Veterinaria Brno 85.1 (2016): 49-54.
3. KINCAID, R. L., B. P. CHEW, AND J. D. CRONRATH. "Zinc oxide and amino acids as sources of dietary zinc for calves: effects on uptake and immunity." Journal of Dairy Science 80.7 (1997): 1381-1388.
4. PÍŠŤKOVÁ K., DANIELOVÁ L., ILLEK J.: "Laboratorní diagnostika u potravinových zvířat – praktická cvičení", Brno 2016, str. 93

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 110/2020/FVL

Využití imunokontracepce v regulaci pohlavní aktivity kozlů

Eva Indrová¹, Adriana Hochmanová¹, Dára Brabcová²

Klinika chorob přežvýkavců a prasat, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹, student 4. ročníku, Fakulta veterinárního lékařství²

Úvod

Kastrace kozlů jsou jedním z nejčastějších zákroků. Kastraci je možné provádět nekrvavými metodami, jako jsou velmi časté elastické kroužky, tzv. „gumičky“, Burdizzo kleštěmi, případně krvavými metodami, které zahrnují orchiektomii s pokrytým či nepokrytým semenným provazcem. Všechny tyto zákroky jsou spojeny s větší či menší bolestí a s mnoha možnými postkastračními komplikacemi. Tzv. imunologická kastrace neboli vakcinace, je založena na principu injekčně aplikované látky, která navodí produkci protilátek proti GnRF. GnRF je zodpovědný za stimulaci tvorby gonadotropních hormonů LH a FSH. Zatím jedinou registrovanou vakcínou v ČR, kterou lze používat k imunologické kastraci, je přípravek Improvac (syntetický peptidový analog GnRF spojený s Diphtheria Toxoidem, výrobce Zoetis) určený pro prasata. Aplikace přípravku probíhá ve dvou dávkách v rozmezí čtyř týdnů. První dávkou se stimulují imunitní paměťové buňky, ale ještě neovlivňuje funkci varlat. Nástup imunity (vyvolání anti-GnRF protilátek) nastává v průběhu jednoho týdne po druhé aplikaci. Následuje patrné zmenšení varlat, snížené libido a snížená spermatogeneze. Účinky imunokastrace na pohlavní aktivitu kanců jsou zdokumentovány velmi dobře¹. U malých přežvýkavců je provedených studií velmi málo². V našem pokusu jsme se zaměřili na kontinuální sledování nástupu účinku preparátu Improvac na pohlavní aktivitu pohlavně dospělých kozlů, kterou jsme zjišťovali pomocí měření koncentrací testosteronu, vyšetření ejakulátu a histologického vyšetření tkáně varlat u kozlů. Vzhledem ke kontinuálnímu sledování jsme zvolili metodu průběžných bioptických odběrů varletní tkáně. Cílem studie bylo také ověřit metodiku průběžných bioptických odběrů pro vyšetření funkčnosti spermiogenní tkáně varlat.

Materiál a metodika

Kozli (celkem 20ks) byli nakoupeni již jako 14 denní a jsou ustájeni na Klinice chorob přežvýkavců a prasat. Pokusy byly zahájeny u kozlů ve věku 5-6 měsíců na začátku připouštěcí sezóny (začátek září) a ukončeny za 4 měsíce (konec prosince). Původně byl začátek pokusu plánován již na začátek srpna, avšak dle výsledků ejakulátu, byl začátek posunut na září, kdy

již většina kozlů měla kvalitní spermiogram. Pokusné skupině (11ks) byl aplikován preparát Improvac (s.c., 2 ml pro toto), aplikace byla zopakována za 4 týdny. První biopsie varlat byla provedena při první aplikaci preparátu, následně probíhají odběry ve 14 denních intervalech, celkem 8 krát. Excizní biopsie jednorázovou bioptickou jehlou je prováděna v krátkodobé celkové anestezii izofluranem pomocí inhalační masky, v premedikaci 0,2 mg/kg xylazin i.m. Místo pro biopsii je vyholeno a připraveno dle běžného operačního protokolu. Nad místem biopsie je proveden řez kůží scrota v maximální nutné délce a následně je provedena biopsie pomocí jednorázové bioptické jehly o průměru 0,8mm. Rána po biopsii je sešita jedním stehem vstřebatelným materiálem. Kůže je sešita horizontálním U - stehem nevstřebatelným materiálem. Stehy jsou vždy vyjmuty při následné biopsii. Po zákroku je tři dny aplikován ketoprofen v dávce 3 mg/100 kg i.m. Bioptáty jsou u všech kozlíků odebírány v jeden den vždy ze stejného místa, místa následujících biopsií jsou měněna dle předem určeného schématu. Bioptáty jsou fixovány v 10% formaldehydu a dále zpracovány obvyklým způsobem v histologické laboratoři Ústavu histologie a embryologie VFU Brno. Histologické vyšetření spermatogenního epitelu semenotvorných kanálků varlat je prováděno na Klinice chorob přežvýkavců ve spolupráci s MVDr. Petrem Čížkem, Ph.D. z Ústavu histologie a embryologie. U kozlíků je zároveň sledována velikost varlat ve 14 denních intervalech. Současně s biopsií je odebírána krev z *vena jugularis*. Sérum je odesíláno do laboratoře Synlab ke stanovení koncentrace testosteronu. Zároveň je prováděna elektroejakulace. Ejakulát je vyšetřován na analyzátoru spermatu (CASA), současně je sledována integrita membrán (barvení eosin/nigrosin) a zhotoveny preparáty pro následné morfologické vyšetření. Koncentrace spermií je počítána v Burkerově komůrce. Nyní je provedeno 6 odběrů vzorků a jsou plánovány ještě dva odběry. Kontrolní skupině (9ks) nebyl podán preparát Improvac. Biopsie varlat, odběr ejakulátu a krve je prováděn podle stejného schématu jako v pokusné skupině. V kontrolní skupině byla v průběhu pokusu čtyři zvířata vyřazena z důvodů nevhodnosti (2x malý vzrůst, včetně varlat, 1x atrofie varlat, 1x spermiogranulom). Celkem tedy zůstalo 5 kontrolních kozlů.

Výsledky

Z výsledků je patrné, že po první aplikaci preparátu již do čtrnácti dnů statisticky signifikantně klesá hladina testosteronu ($p < 0,0001$), měsíc a půl po druhé aplikaci jsou hodnoty u většiny pokusných kozlů pod hladinou detekce. V kontrolní skupině jsou průměrné koncentrace testosteronu ve všech odběrech konstantní. Velikost varlat pokusné skupiny se signifikantně zmenšila, ať už se jedná o délku ($p < 0,0001$) či šířku ($p < 0,01$), ve srovnání s velikostí na začátku experimentu. Velikost varlat (délka) u kontrolní skupiny se mírně zmenšila, avšak toto

zmenšení nebylo statisticky signifikantní. Koncentrace spermií v ejakulátu je v pokusné skupině zatím bez signifikantních rozdílů, ačkoliv je patrný pokles mezi předposledním a posledním odběrem (911 818 spermií/mm³ vs. 652 272 spermií/mm³). Koncentrace spermií u kontrolní skupiny je ve všech odběrech bez signifikantních změn. Motilita spermií pokusné skupiny měřena analyzátozem (CASA) vykázala statisticky signifikantní snížení ($p < 0,05$) v posledních dvou odběrech. Motilita spermií kontrolní skupiny zůstává nezměněna. Výrazné změny byly nalezeny při morfologickém vyšetření spermií v pokusné skupině, kdy byl pozorován kontinuální nárůst počtu morfologicky změněných spermií, v posledních třech odběrech statisticky velmi signifikantní ($p < 0,0001$). U kontrolní skupiny je stále pozorována normospermie v průměru 80 -90%. Veškeré průměrné hodnoty z pokusné skupiny a z kontrolní skupiny jsou zaznamenány v tab. 1 resp. tab. 2. Histologické preparáty zatím byly zpracovány jen ze čtyř bioptických odběrů. V posledních vzorcích jsou patrné tendence změny poměru výskytu jednotlivých vývojových stádií spermií (prodlužující se spermatidy vs. prodloužené spermatidy). Avšak tento trend je zatím významně pozorován jen u jedinců, u nichž je reakce na preparát velmi výrazná a již po 14 dnech po druhé aplikaci preparátu měli výrazně sníženou koncentraci spermií a nulovou motilitu. Současně byly u kozlíků zaznamenány nežádoucí reakce na vakcínu. Šest kozlíků po aplikaci kulhalo po první aplikaci na končetinu, kde byl subkutánně za lopatku aplikován preparát. U třech těchto kozlíků se v místě aplikace objevila nekróza kůže velikosti cca 5x5 cm. Hojení nekrózy probíhalo spontánně bez nutné terapeutické intervence. U jednoho kozlíka byla při posledním pokusu zjištěna orchitis, jedná se o kozlíka z kontrolní skupiny.

Tabulka 1: Průměrné hodnoty sledovaných parametrů v jednotlivých odběrech (A-F) prováděných v rozestupu 14 dnů u pokusné skupiny.

Pokusná skupina	A	B	C	D	E	F
Koncentrace testosteronu (nmol/l)	39,53	8,77	3,37	1,34	0,81	0,22
délka P varle (cm)	8,36	7,65	7,49	6,36	6,00	5,08
délka L varle (cm)	7,97	7,57	7,31	6,60	5,89	4,87
šířka P varle (cm)	5,41	5,33	5,04	4,96	4,44	3,94
šířka L varle (cm)	5,11	4,9	4,89	4,78	4,65	4,2
motilita spermií (%)	44,27	60,09	50,64	41,00	36,64	32,45
Koncentrace spermií (v mm ³)	775273	338318	873636	910909	911818	652273
Normospermie (%)	87,18	89,91	90,91	60,70	25,94	10,36

Tabulka 2: Průměrné hodnoty sledovaných parametrů v jednotlivých odběrech (A-F) prováděných v rozestupu 14 dnů u kontrolní skupiny.

Kontrolní skupina	A	B	C	D	E	F
Koncentrace testosteronu (nmol/l)	29,79	24,50	21,47	33,60	18,81	29,60
délka P varle (cm)	7,42	6,88	7,38	6,84	6,94	6,85
délka L varle (cm)	8,1	7,64	8	7,48	6,58	6,6
šířka P varle (cm)	4,78	4,84	4,94	5,06	4,8	4,5
šířka L varle (cm)	5,26	5,38	5,34	5,54	5,08	5,13
motilita spermií (%)	78,20	51,50	61,25	58,33	64,75	62,50
Koncentrace spermií (v mm ³)	673 000	596 000	574 400	590 000	628 000	549 000
Normospermie (%)	87,20	89,75	89,75	90,00	83,08	85

Diskuse a závěr

Bioptická metoda pro kontinuální sledování vývoje varletní tkáně byla vyzkoušena poprvé (dle dostupné zahraniční literatury). Úspěšnost odběrů byla 100%, v některých případech byl bioptický vzorek nepatrně menší, ale po následném zpracování, i tak dobře hodnotitelný. Rány po biopsiích se velmi dobře hojily, nezaznamenali jsme žádné hnisavé reakce. Bioptické vzorky zatím nebyly všechny zpracovány a z posledních vzorků zatím není pozorována výrazná změna spermiogeneze, což je dáno i tím, že spermiogeneze u kozlů trvá přibližně 60 dní a poslední zpracované histologické vzorky jsou odebírány 14 dní po druhé aplikaci preparátu. Avšak vliv preparátu je zcela zřejmý z výsledků rapidně se snižujících koncentrací testosteronu, zmenšováním velikostí varlat a snižování hodnot ve spermioqramu kozlů.

Seznam literatury:

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

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 108/2020/FVL

Příspěvky

Fakulty veterinární hygieny a ekologie

Prevalence a druhové složení zoonotických bakterií rodu *Rickettsia* v pijáku lužním (*Dermacentor reticulatus*)

Alena Balážová, Pavel Široký

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

Úvod

Piják lužní (*Dermacentor reticulatus*) je druhem klíštěte, které se v rámci současných klimatických oscilací šíří na sever a zasahuje tak stále více i na území České republiky (1). Je významným přenašečem nemocí, například psí babesiózy (2), patogenních bakterií *Anaplasma phagocytophilum* (3) a různých druhů rickettsií. S šířením vektora lze předpokládat také šíření a častější výskyt příslušných onemocnění.

Bakterie rodu *Rickettsia* se dělí na 4 skupiny, z nichž dvě hlavní jsou skupina způsobující tyfus (Typhus Group, TG) a skupina způsobující skvrnitě horečky (Spotted Fever Group, SFG) (4). Pijáci lužní přenášejí zástupce SFG rickettsií, přičemž z našeho území byly popsány dva druhy, *Rickettsia helvetica* a *R. raoultii* (5), ze Slovenska je pak znám další druh *R. slovaca* (6). Tyto rickettsie způsobují onemocnění se širokým spektrem příznaků, od asymptomatických či velmi mírných (teplota, slabost) až po závažné lymfadenopatie (TIBOLA – Tick-borne lymphadenopathy či DEBONEL – *Dermacentor*-borne necrosis erythrema and lymphadenopathy). Závažnější formy jsou obvykle způsobeny druhy *R. slovaca* a *R. raoultii* (7).

Cílem této práce bylo zjistit druhové distribuci a prevalenci rickettsií v pijácích lužních z lokalit v ČR, na Slovensku, v Maďarsku a pro srovnání také v Chorvatsku. Dále bylo cílem určení druhového složení rickettsií v přenašečích a zhodnotit riziko nákazy.

Materiál a metodika

Materiál použitý v této práci pocházel především z projektu GAČR (č.524/09/0715) z let 2009-2011 a dále se jednalo o materiál sesbíraný pro dizertační práci vypracovanou v loňském roce na našem pracovišti (8). Vybrali jsme ty lokality, ze kterých je dostupný dostatečný počet jedinců – pro předpokládanou prevalenci 5 % je k potvrzení výskytu patogenu doporučený počet vzorků na lokalitu alespoň 59 (9). Celkem se jednalo o 16 lokalit (4 z České republiky, 6 ze Slovenska, 5 z Maďarska a 1 z Chorvatska). Tyto staré sběry byly doplněny o čerstvé vzorky z letošního roku, pocházející ze tří lokalit na jižní Moravě (jednotlivé lokality viz tab. 1). To nám umožnilo zjistit, zda dochází ke změnám prevalencí v čase. Celkem bylo vyšetřeno 1 671 ks pijáků lužních (820 samic a 851 samců).

Izolace DNA ze vzorků byla provedena metodou alkalické hydrolýzy (ČR, Slovensko) a komerčními kity k izolaci DNA (Maďarsko, Chorvatsko). Nový materiál byl izolován pomocí alkalické hydrolýzy, aby se metoda nelišila od původní, a bylo tak umožněno porovnání výsledků. Pro detekci patogenů byla využita metoda duplex qPCR vyvinutá na našem pracovišti (10).

Sekvenovány byly geny *ompA* a *ompB* amplifikované pomocí již vyzkoušených metodik používaných v minulosti (11, 12), samotnou sekvenaci provedla firma Macrogen (Amsterdam, Nizozemí).

Data o prevalenci a intenzitě infekce byla vyhodnocena v programu Quantitative Parasitology. V programu Geneious v současné době generujeme fylogenetické analýzy sekvenčních dat získaných z našeho vlastního materiálu a z databáze GenBank.

Výsledky

Průměrná prevalence bakterií rodu *Rickettsia* v pijácích byla 48,4 % a významně se nelišila mezi pohlavími (Chi-kvadrát test, $p=0,233$). Nejnižší zaznamenanou prevalencí bylo 18,7 % v čerstvých vzorcích z jihomoravské Lednice, zatímco nejvyšší byla 74,4 % na slovenské lokalitě Lándor u řeky Váh (výsledné prevalence viz tab. 1).

Srovnání starých a čerstvých vzorků ukazuje konzistentní zastoupení pozitivních klíšťat v populaci a změna v čase není na blízkých lokalitách ani v jednom případě významná. Konkrétně byly srovnávány dva sběry z Lednice z let 2009 a 2020 (Chi-kvadrát test, $p=0,316$), dále sousední lokality u Moravské Nové Vsi (rok 2009) a Týnce (rok 2020), které jsou od sebe vzdáleny asi 2 km (Chi-kvadrát test, $p=0,178$) a lokality Mikulčice (rok 2009) a Hodonín (rok 2020) vzdálené cca 5 km (Chi-kvadrát test, $p=0,739$). V oblasti okolo Lednice byla prevalence opakovaně výrazně nižší (okolo 20 %), než v lokalitách u řeky Moravy (okolo 60 %). Možným vysvětlením tohoto fenoménu je relativní izolovanost lednické populace pijáků od ostatních, zatímco u řeky Moravy jsou populace propojeny na velké ploše a klíšťata si mohou efektivně předávat patogeny. Podobně nízkou prevalenci (22,2 %) má i lokalita Klížska Nemá na Slovensku, zde jsme ovšem kvůli epidemiologické situaci nemohli zopakovat vzorkování a nemáme tedy aktuální data pro srovnání.

Náhodně vybrané pozitivní vzorky byly sekvenovány a srovnáním sekvencí s Genbank v nich byla potvrzena přítomnost bakterií druhu *Rickettsia raoultii*. Její výskyt máme zaznamenán ze všech lokalit na Jižní Moravě a Slovensku a také ze dvou testovaných lokalit v Maďarsku. Přítomnost jiných druhů tohoto rodu zatím nebyla prokázána, avšak čerstvé vzorky z ČR budou ještě sekvenovány a vyhodnoceny.

Tabulka 1. Přehled námi testovaných lokalit pijáků lužních (*Dermacentor reticulatus*) a v nich zjištěných prevalencí bakterií rodu *Rickettsia*

lokality	země	rok sběru	souřadnice	Prevalence v % (počet pozitivních/celkový počet)
Lanžhot	ČR	2011	48°41'18"N 16°59'22"E	54,4 (49/90)
Mor. Nová Ves	ČR	2009	48°46'54"N 17°04'36"E	58,9 (53/90)
Týnec	ČR	2020	48°46'23"N 17°02'59"E	48,9 (44/90)
Lednice	ČR	2009	48°49'08"N 16°48'23"E	22,2 (20/90)
Lednice	ČR	2020	48°49'08"N 16°48'23"E	18,7 (14/75)
Mikulčice	ČR	2009	48°47'57"N 17°05'35"E	73,3 (66/90)
Hodonín	ČR	2020	48°51'22"N 17°05'18"E	71,1 (64/90)
Ključovec	Slovensko	2011	47°47'06"N 17°42'40"E	63,3 (57/90)
Klížska Nemá	Slovensko	2011	47°45'29"N 17°47'26"E	22,2 (20/90)
Čičov	Slovensko	2011	47°45'32"N 17°44'58"E	44,4 (40/90)
Jurský Chlm	Slovensko	2011	47°48'06"N 18°31'08"E	34,4 (31/90)
Lándor	Slovensko	2011	47°47'36"N 18°08'14"E	74,4 (67/90)
Studienka	Slovensko	2011	48°32'02"N 17°08'26"E	68,9 (62/90)
Kisbodak	Maďarsko	2011	47°53'53"N 17°30'31"E	50,0 (45/90)
Dunaremete	Maďarsko	2011	47°53'33"N 17°30'52"E	43,3 (39/90)
Hévíz	Maďarsko	2013	46°47'14"N 17°11'54"E	58,9 (53/90)
Gyadai	Maďarsko	2011	47°50'60"N 19°06'26"E	51,9 (41/79)
Kondorfa	Maďarsko	2006	46°53'42"N 16°23'57"E	37,7 (29/77)
Zlatna Greda	Chorvatsko	2018	45°42'53"N 18°51'27"E	57,8 (52/90)

Závěr

Přítomnost druhu *Rickettsia raoultii*, způsobujícího závažnější formy onemocnění, a jeho vysoká prevalence, pohybující se místy až kolem 70 %, ukazují na vysokou míru rizika při kontaktu s vektorem – pijákem lužním. Pokud bude zachován současný trend šíření tohoto druhu klíštěte, může se zároveň zvyšovat také význam rickettsióz jako šířících se chorob.

Seznam literatury:

- 1) KARBOWIAK, G.: The occurrence of the *Dermacentor reticulatus* tick – its expansion to new areas and possible causes. *Annals of Parasitology*. 2014, 60(1), 37-47.
- 2) SPRONG, H.; FONVILLE, M.; DOCTERS VAN LEEUWEN, A.; DEVILLERS, E.; IBAÑEZ-JUSTICIA, A.; STROO, A.; HANSFORD, K.; CULL, B.; MEDLOCK, J.; HEYMAN, P.; COCHEZ, C.; WEIS, L.; SILAGHI, C.; MOUTAILLER, S.: Detection of pathogens in *Dermacentor reticulatus* in northwestern Europe: evaluation of a high-throughput array. *Heliyon*. 2019, 5(2).
- 3) RYBÁŘOVÁ, M.; ŠIROKÝ, P.: Occurrence of *Anaplasma phagocytophilum* in three sympatric tick species in the South Moravia, Czech Republic. *Biologia*. 2017, 72(4).
- 4) MALACUSO, K. R.; Paddock, C. D.: Tick-borne Spotted Fever Group Rickettsioses and Rickettsia Species. In SONENSHINE D. E.; ROE, R. M.; eds.: *Biology of Ticks*, Vol. 2. Oxford University Press, 2014, 211-250.
- 5) RUDOLF, I.; VENCLÍKOVÁ, K.; BLAŽEJOVÁ, H.; BETÁŠOVÁ, L.; MENDEL, J.; HUBÁLEK, Z.; PAROLA, P.: First report of *Rickettsia raoultii* and *Rickettsia helvetica* in *Dermacentor reticulatus* ticks from the Czech Republic. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2016, 7(6), 1222-1224.
- 6) ŠVEHLOVÁ, A.; BERTHOVÁ, L.; SALLAY, B.; BOLDIŠ, V.; SPARAGANO O.A.E.; ŠPITALSKÁ, E.: Sympatric occurrence of *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* ticks and *Rickettsia* and *Babesia* species in Slovakia. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2014, 5(5), 600-605.
- 7) PAROLA, P.; ROVERY, C.; ROLAIN, J. M.; BROUQUI, P.; DAVOUST, B.; RAOULT, D.: *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii* in tick-borne Rickettsioses. *Emerging infectious diseases*, 2009, 15(7), 1105–1108.
- 8) BILBIJA, B.: Application of various genetic markers to studies on population structure and taxonomy of ticks. PhD thesis, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic 2020.
- 9) DIGIACOMO, R. F.; KOEPESELL, T. D.: Sampling for Detection of Infection or Disease in Animal Populations. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1986, 189, 22-23.
- 10) BALÁŽOVÁ, A.; BALÁŽ, V.; ONDRUŠ, J.; ŠIROKÝ, P.: Duplex qPCR assay for detection and quantification of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2020; 11, 101462.
- 11) REGNERY, R. L.; SPRUILL, C.L.; PLIKAYTIS, B.D. Genotypic Identification of Rickettsiae and Estimation of Intraspecies Sequence Divergence for Portions of 2 Rickettsial Genes. *Journal of Bacteriology* 1991, 173, 1576-1589.
- 12) CHOI, Y. J.; LEE S. H.; PARK H. K.; KOH Y. S.; LEE K. H.; BAIK H. S.; CHOI M. S.; KIM I. S.; JANG W. J.: Evaluation of PCR-based assay for diagnosis of spotted fever group rickettsiosis in human serum samples. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2005, 12, 759-763.

Tato práce byla financovaná grantem IGA 218/2020/FVHE VFU Brno

Srovnání účinků oxidu titaničitého a Magnéliho fáze suboxidu titanu na pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*)

Hana Čaloudová, Zuzana Koutková, Jana Cahová, Jana Čaloudová, Patrik Predný, Veronika
Doubková, Jana Blahová

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

Úvod

Oxid titaničitý (TiO_2) je široce využívanou sloučeninou, mezi jejíž vlastnosti se řadí fotokatalytická aktivita, dobré elektrické vlastnosti, díky jeho vysoké dielektrické konstantě, a výborné optické vlastnosti, díky vysoké odrazivosti světla a indexu lomu. Je stabilní, málo toxický a nerozpustný ve vodě. Standardně se vyskytuje ve třech krystalických strukturách, kterými jsou anatas, rutil a brookit (1). Využití nachází například ve fotovoltaice, výrobě barev či kosmetiky, jako UV filtr (2). Magnéliho fáze suboxidů titanu (dále Magnéli TiO_x) je novým materiálem s velkým potenciálem pro budoucí použití. Jedná se o substechiometrické oxidy titanu ($\text{Ti}_x\text{O}_{2x-1}$, kde x je mezi 4 a 9), jejichž krystalická mřížka se liší od struktur standardního TiO_2 (rutilu) chybějícím atomem kyslíku. V důsledku čehož mají jedinečné chemické, optické a fyzikální vlastnosti, včetně velké elektrické vodivosti srovnatelné s grafitem (3, 4). Díky těmto vlastnostem mají potenciál pro průmyslové aplikace, jako je elektrokatalýza, fotovoltaika, výroba baterií, a také k sanaci vody (4). V současnosti jsou publikovány pouze 2 vědecké studie zabývající se vlivem Magnéli TiO_x na ryby, které však zahrnují pouze akutní testy na embryích (5, 6). Cílem tohoto experimentu bylo provedení chronického růstového testu s využitím TiO_2 a Magnéli TiO_x a hodnocení jejich vlivu na biometrické, hematologické, biochemické a histopatologické parametry pstruha duhového a detekce hladin titanu v orgánech.

Materiál a metodika

Nejprve bylo připraveno krmivo s přídavkem TiO_2 a Magnéli TiO_x (komerčně dostupné, velikost částic obou látek se pohybuje okolo 800 nm) modifikovanou technologií drážkování mikročástic, a to smícháním částic se sorbentem a modifikovaným škrobem v poměru 1:10 a 1:100. Pevná směs byla promíchána v rychloběžném mixéru a aplikována na navlhčené pelety, které byly následně vysušeny. Experiment byl proveden v akreditovaném zařízení Ústavu zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství (Mendelova univerzita v Brně), s využitím 100 kusů juvenilních pstruhů duhových, kteří byli rozděleni do 10 akvárií po 10 ks, test byl proveden v duplikátu. Nasazena byla kontrolní skupina,

skupiny TiO_2 v koncentracích 0,01 % a 0,1 %, a Magnéli TiO_x v koncentracích 0,01 % a 0,1 %. Rybám bylo krmivo podáváno třikrát denně v dávce 1,5 % tělesné hmotnosti/den, dávka byla upravována po 14 dnech. Nejprve proběhla aklimatizační fáze trvající 2 týdny bez podávání testovacího krmiva z důvodu navyknutí ryb na testovací prostředí. Následovala šestitýdenní expoziční fáze, po které byl proveden odběr vzorků od poloviny ryb. Pokus pokračoval depurační fází po další 2 týdny, kdy bylo rybám podáváno pouze kontrolní krmivo, na konci této fáze byly odebrány vzorky zbývající poloviny ryb. V rámci odběrů byla rybám nejprve odebrána krev za účelem stanovení základních hematologických a biochemických parametrů a provedení krevních nátěrů pro stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů. Ryby byly poté omráčeny tupým úderem do temena a usmrceny přetětím žaberních oblouků. Všechny ryby byly změřeny (celková délka, délka těla, výška) a zváženy (hmotnost těla, hmotnost jater a sleziny), následovalo pitevní vyšetření, v průběhu kterého byly odebrány vzorky pro zjištění obsahu titanu v orgánech (žábra, játra, přední ledvina a střevo), stanovení základních parametrů oxidativního stresu (žábra, játra, zadní ledvina) a pro provedení histologického vyšetření (mozek, žábra, játra, kůže, svalovina, slezina, přední a zadní ledvina a střevo). Získaná data byla statisticky analyzována s využitím statistického programu Unistat 6.5. for Excel.

Výsledky

V připraveném krmivu byla za pomoci rentgenové fluorescence ověřena koncentrace titanu, dosaženy byly tyto výsledky – nedošlo ke kontaminaci kontrolního krmiva, obsah Ti byl $<0,00010$ %. V krmivu s předpokládanou koncentrací 0,1 % TiO_2 byla stanovena koncentrace Ti 0,111 %, ve skupině 0,01 % TiO_2 byla koncentrace Ti 0,007 %. V případě Magnéli TiO_x byla ve skupině 0,1 % stanovena koncentrace Ti 0,060 % a ve skupině 0,01 % byl zjištěn obsah 0,001 % Ti.

Při odběru na konci expoziční fáze pokusu byl posuzován vliv na exteriér ryb, jejich kondici a průměrný přírůstek. Pozitivní rozdíly oproti kontrole byly pozorovány převážně u ryb krmených granulami s přídatkem TiO_2 , patrnější byly zejména ve skupině TiO_2 0,1 %. U těchto ryb byl zaznamenán nižší index vysokohřbetosti, vyšší Fultonův koeficient vyživenosti a vyšší průměrný přírůstek. Dále byl v této skupině zjištěn vyšší hepatosomatický index, který však s hodnotami 2,28 ve skupině TiO_2 0,01 % a 2,34 ve skupině TiO_2 0,1 % svědčí o nadměrném zvýšení tučnosti jater oproti kontrole. Naopak ryby krmené granulami s obsahem Magnéli TiO_x měly průměrně nižší přírůstky a vykazovaly také snížené ukazatele kondice. Konkrétní hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Index vysokohřbetosti, Fultonův koeficient, hepatosomatický index a průměrný přírůstek na konci expoziční fáze

	Index vysokohřbetosti (Iv)	Fultonův koeficient (Fc)	Hepatosomatický index (HSI)	Průměrný přírůstek [g]
Kontrola	3,44	1,94	1,94	84,89
Magnéli TiO_x 0,01 %	3,44	1,87	1,87	80,98
Magnéli TiO_x 0,1 %	3,41	1,91	1,91	79,28
TiO₂ 0,01 %	3,27	2,28	2,28	85,00
TiO₂ 0,1 %	3,01	2,34	2,34	87,62

Dále bylo zjištěno, že expozice Magnéli TiO_x v koncentracích 0,1 % i 0,01 % ovlivňuje červený krevní obraz. V krvi ryb byla zjištěna erytrocytóza (fyziologické rozmezí hodnot pro pstruhovité ryby 0,8–1,5 · 10¹²/l), hodnoty hemoglobinu a hematokritu byly taktéž zvýšené ve srovnání s kontrolou, avšak pohybovaly se ve fyziologickém rozmezí. V případě ryb vystavených TiO₂ tento efekt pozorován nebyl. Počet leukocytů byl naopak snížen u skupin vystavených vyšší koncentraci Magnéli TiO_x a oběma koncentracím TiO₂. Je však nutno konstatovat, že se stále jedná o hodnoty v rámci fyziologického rozpětí (10–60 · 10⁹/l). Konkrétní hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2. Výsledky hematologického vyšetření na konci expoziční fáze

	Erytrocyty [10¹²/l]	Hemoglobin [g/l]	Hematokrit [l/l]	Leukocyty [10⁹/l]
Kontrola	1,44	74,46	0,29	28,00
Magnéli TiO_x 0,01 %	1,70	83,80	0,33	27,25
Magnéli TiO_x 0,1 %	2,12	84,41	0,33	22,80
TiO₂ 0,01 %	1,37	76,81	0,30	22,00
TiO₂ 0,1 %	1,48	75,00	0,29	21,00

Závěr

Dosažené výsledky prokázaly negativní vliv Magnéli TiO_x na juvenilního pstruha duhového již při nižší koncentraci testované látky v krmivu, a to jak na snížení ukazatelů kondice, tak změnami v krevním obraze. Naopak ryby, kterým bylo podáváno krmivo s obsahem TiO₂ vykazovaly dobrou kondici a přírůstek. Negativní vliv byl u těchto skupin pozorován mírně sníženým počtem leukocytů a větším protučněním jater. Komplexní zhodnocení potenciálně negativních účinků testovaných látek proběhne po provedení všech plánovaných analýz a jejich statistickém zpracování.

Seznam literatury:

- 1) SUNGUR Ş. Titanium Dioxide Nanoparticles. In: O. V. KHARISSOVA, L. M. T. MARTÍNEZ a B. I. KHARISOV. Handbook of Nanomaterials and Nanocomposites for Energy and Environmental Applications. Cham: Springer International Publishing, 2020, 1-18. ISBN 978-3-030-11155-7.
- 2) KLAINE, S. J., P. J. J. ALVAREZ, G. E. BATLEY, et al. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. Environmental Toxicology and Chemistry. 2008, **27**(9), 08-090. ISSN 0730-7268.
- 3) SMITH, J. R., F. C. WALSH a R. L. CLARKE. Electrodes based on Magnéli phase titanium oxides: the properties and applications of Ebonex® materials. Journal of Applied Electrochemistry. 1998, **28**, 1021–1033. ISSN 0021-891X.
- 4) WALSH, F. C. a R. G. A. WILLS. The continuing development of Magnéli phase titanium suboxides and Ebonex® electrodes. Electrochimica Acta. 2010, **55**(22), 6342-6351. ISSN 0013-4686.
- 5) YANG, Y., B. CHEN, J. HOWER, M. SCHINDLER, C. WINKLER, J. BRANDT, R. GIULIO, J. GE, M. LIU a Y. FU. Discovery and ramifications of incidental Magnéli phase generation and release from industrial coal-burning. Nature Communications. 2017, **8**(1), 194. ISSN 2041-1723.
- 6) JEMEC KOKALJ, A., S. NOVAK, I. TALABER, et al. The first comprehensive safety study of Magnéli phase titanium suboxides reveals no acute environmental hazard. Environmental Science: Nano. 2019, **6**(4), 1131-1139. ISSN 2051-8153.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 217/2020/FVHE

Inteligentní a aktivní vlastnosti jedlých karagenanových a chitosanových obalů s přidavkem rostlinných extraktů

Dani Dordevic, Simona Jančíková, Karolína Těšíková, Bojan Antonic, Bohuslava Tremlová
*Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

Úvod

Produkce minimálně upravených potravin je v poslední době stále více žádanější, vyskytují se nejrůznější krájené zeleninové i ovocné saláty, u kterých je nutné zajistit, co nejdéle trvanlivost a atraktivnost pro spotřebitele, kdy se tak pro krájené kousky ovoce nebo zeleniny mohou použít různé povlaky na bázi polysacharidů, tuků a proteinů, které mohou základ povlak tvořit samostatně ale i společně v různých poměrech, dále také do jedlých povlaků mohou být přidávány různé přírodní extrakty, které obohacují povlak a tím také mohou zlepšovat vlastnosti balených potravin (1).

Materiál a metodika

Příprava vzorků

Zelená jablka – Golden delicious, země původu Itálie – byly oloupany a nakrájeny na kostky o rozměrech 1x1x1 cm.

Příprava film formujících roztoků a balení vzorků

Do kádinky bylo naváženo 1,5 g chitosanu, dále bylo přidáno 135 ml 1% kyseliny mléčné. Roztok byl míchán na magnetické míchače při teplotě 50°C a rychlosti otáček 500 rpm po dobu 15 min, následně byly ve film formujícím roztoku namáčeny kostky jablek po dobu 30 s. Poté byly přendány do plastové misky, zavřeny víčkem a uchovávány v lednici při 5°C. V případě přípravy roztoků s přidavkem extraktu byl nejprve připraven extrakt z modrého čaje, červeného zelí a batát, vždy bylo naváženo 10 g příslušného zdroje a následně navážka byla zalita 100 ml horké destilované vody. Extrakt byl po 10 minutách přefiltrován a ponechán vychladnout a následně přidáván do film formujících roztoků vždy v koncentraci 20 %. Poté následovalo ponoření jablek stejně jak je popsáno výše. Vzorky byly analyzovány v den 0, den 2 a den 7.

DPPH

Metoda DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) podle Sivaroobana et al. (2) s menšími úpravami byla použita pro stanovení antioxidační aktivity. Byl připraven extrakt – 1 g vzorku + 20 ml ethanol, extrakce probíhala na ultrazvukové lázni po dobu 30 min. Následně byl vzorek přefiltrován a smíchán s 0,1mM roztokem DPPH v ethanol. Absorbance byla měřena při 517 nm po 30minutové inkubaci ve tmě za

použití spektrofotometru (CE7210 DIET-QUEST, Cambridge, Anglie). Úbytek absorbance byl vyjádřen v procentech:

$$\text{DPPH [\%]} = [(\text{Abs}_{\text{DPPH}} - \text{Abs}_{\text{Vzorku}}) / \text{Abs}_{\text{DPPH}}] * 100$$

Obsah celkových polyfenolů

Stanovení celkového obsahu polyfenolů bylo provedeno dle Tomadoniho et al. (3) s menšími úpravami. Byl odvážen 1 g vzorku jablek, který byl extrahován s 10 ml destilované vody na třepačce po dobu 10 minut. Následně byl vzorek přefiltrován, byl odebrán 1 ml do 25 ml odměrné baňky, kam bylo následně přidáno 5 ml roztoku Folin.Ciocalteau a 4 ml uhličitanu sodného (75 g/l), následovala inkubace po dobu 30 minut ve tmě a změření absorbance při 765 nm. Výsledky byly vyjádřeny jako obsah kyseliny gallové vzorku.

Výsledky

Výsledky antioxidační aktivity zjištěné metodou DPPH během skladování jablek v různých druzích jedlých obalů jsou uvedeny v Tabulce 1. Ze získaných výsledků bylo zjištěno, že antioxidační aktivita ve zkoumaných vzorcích nebyla jednoznačná a v případě některých vzorků docházelo ke snižování zatímco u jiných docházelo během skladování ke zvyšování antioxidační aktivity. Obdobné kolísání hodnot bylo pozorováno v předchozích studiích, kdy bylo zjištěno, že hlavními sloučeninami zodpovědnými za zvyšování polyfenolů a tím i antioxidační aktivity jsou chlorogenová kyselina a prokyanidiny, které se s dobou skladování ve vzorcích krájených jablek zvyšovala, důvodem tohoto děje je aktivita polyfenol oxidázy, které je obsaženo různé množství v různých odrůdách jablek (4). V našem případě tedy můžeme předpokládat, že se ve vzorcích jablek nacházelo větší množství polyfenol oxidázy a tím se zabránilo rozpadu látek vykazujících antioxidační aktivitu. Tyto děje byly pozorovány především u vzorků balených do karagenanových obalů ať už s přídavkem extaktu nebo bez. U vzorků jablek s chitosanovým povlakem docházelo během skladování k většímu tmavnutí vzorků oproti jablkům bez obalu a s karagenanovým povlakem (Obr. 1). Obdobné hnědnutí jablek s chitosanovým obalem během skladování bylo pozorováno ve studii od Shyu et al. (5) ve srovnání s želatinovým povlakem.

Tabulka 1. Antioxidační aktivita zjištěná metodou DPPH (%) pro vzorky jablek

DEN 0		DEN 2		DEN 7
20,63 ± 0,32	Bez obalu	33,16 ± 1,39 ^a	Bez obalu	35,58 ± 0,16 ^a
	KAR	17,70 ± 0,06 ^b	KAR	24,50 ± 0,12 ^b
	CH _L	4,47 ± 1,26 ^{hc}	CH _L	1,87 ± 0,18 ^c
	CH _{LMČ}	18,07 ± 1,21 ^{be}	CH _{LMČ}	2,18 ± 0,28 ^c
	KAR _{MČ}	10,79 ± 1,07 ^{dfgh}	KAR _{MČ}	22,72 ± 0,14 ^d
7,78 ± 0,15	CH _{LČZ}	14,98 ± 0,27 ^{ef}	CH _{LČZ}	2,27 ± 0,22 ^c
	KAR _{ČZ}	18,15 ± 0,14 ^b	KAR _{ČZ}	25,86 ± 0,14 ^e
	CH _{LBT}	9,85 ± 0,18 ^{eg}	CH _{LBT}	4,86 ± 0,17 ^f
	KAR _{BT}	4,99 ± 0,03 ^h	KAR _{BT}	11,97 ± 0,19 ^g

*horní index znázorňuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi řádky



Obrázek 1. Vzhled balených jablek po 2 dnech od začátku pokusu (A-chitosanový obal, B-bez obalu, C-karagenanový obal)

V Tabulce 2 jsou uvedeny výsledky obsahu celkových polyfenolů ve vzorcích balených do různých druhů jedlých obalů. V případě analýzy polyfenolů bylo zjištěno obdobně jako u výsledků DPPH, že u jablek balných do chitosanových obalů docházelo ke snížení obsahu polyfenolů oproti karagenanovým obalům. Nejvyšší hodnoty obsahu polyfenolů u jablek po 7 dnech skladování byly zjištěny u vzorků bez obalu, KAR, KAR_{MČ} a KAR_{ČZ}. K vyššímu obsahu celkových polyfenolů u nebalených vzorků mohlo docházet z důvodu, že u ostatních vzorků byl před analýzou vzorek zhomogenizován včetně obalu, který byl součástí krájených jablek a mohlo tak dojít k „naředění obsahu polyfenolů“. U vzorků s karagenanovým obalem bylo pozorováno zvyšování obsahu polyfenolů mezi dnem 2 a 7, zatímco u vzorků s chitosanovým obalem bylo pozorováno snižování obsahu polyfenolů. Musí být také zdůrazněno, že ani v předešlých studiích nebyla nalezena obecná pravidla pro zvyšování nebo naopak snižování polyfenolů během skladování a to z důvodu, že celkový obsah polyfenolů závisí na mnoha faktorech, zvyšování polyfenolů zapříčiňuje aktivita fenylalanin amoniak lyázy, enzymu podpurujícího syntézu polyfenolů – jeho aktivita se zvyšuje při řezání a loupání. Zatímco pokles polyfenolů způsobuje

polyfenol oxidáza, která také způsobuje hnědé zbarvení jablek. Jak je vidět na Obr. 1, tak nízký obsah polyfenolů se vyskytuje u vzorků s chitosanovým obalem, které byly oproti vzorkům bez obalu a s karagenanovým povlakem více zbarvené do hněda (1).

Tabulka 2. Celkový obsah polyfenolů (mg kyseliny gallové/g) pro vzorky jablek

DEN 0		DEN 2		DEN 7
0.312 ± 0.000	Bez obalu	0.330 ± 0.000 ^a	Bez obalu	0.477 ± 0.002 ^a
	KAR	0.176 ± 0.001 ^b	KAR	0.351 ± 0.001 ^b
	CH _L	0.097 ± 0.001 ^c	CH _L	0.075 ± 0.000 ^c
	CH _{LMČ}	0.135 ± 0.000 ^d	CH _{LMČ}	0.079 ± 0.000 ^d
	KAR _{MČ}	0.168 ± 0.000 ^e	KAR _{MČ}	0.201 ± 0.000 ^e
0.379 ± 0.000	CH _{LČZ}	0.128 ± 0.000 ^f	CH _{LČZ}	0.071 ± 0.001 ^c
	KAR _{ČZ}	0.218 ± 0.000 ^g	KAR _{ČZ}	0.287 ± 0.004 ^f
	CH _{LBT}	0.183 ± 0.000 ^h	CH _{LBT}	0.122 ± 0.002 ^g
	KAR _{BT}	0.227 ± 0.001 ⁱ	KAR _{BT}	0.193 ± 0.000 ^h

*horní index znázorňuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi řádky

Závěr

Bylo zjištěno, že při použití povlaku pro balení krájených kousků jablek je vhodnější použít povlaky s karagenanovým základem, kdy nedocházelo ke hnědnutí jablek během 7-denního skladování oproti vzorkům jablek s chitosanovým povlakem, kde bylo hnědnutí pozorováno a jablka by tak nebyla pro konzumenty tolik atraktivní.

Seznam literatury:

- 1) COFELICE, Martina, Francesco LOPEZ a Francesca CUOMO. Quality Control of Fresh-Cut Apples after Coating Application. Foods [online]. 2019, 8(6) [cit. 2020-11-29]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods8060189
- 2) SIVAROOBAN, T., N.S. HETTIARACHCHY a M.G. JOHNSON. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. Food Research International [online]. 2008, 41(8), 781-785 [cit. 2020-11-29]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2008.04.007
- 3) TOMADONI, B., L. CASSANI, A. PONCE, M.R. MOREIRA a M.V. AGÜERO. Optimization of ultrasound, vanillin and pomegranate extract treatment for shelf-stable unpasteurized strawberry juice. LWT - Food Science and Technology [online]. 2016, 72, 475-484 [cit. 2020-11-29]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2016.05.024
- 4) RÖSSLE, Christian, Hilde H. WIJNGAARD, Ronan T. GORMLEY, Francis BUTLER a Nigel BRUNTON. Effect of Storage on the Content of Polyphenols of Minimally Processed Skin-On

Apple Wedges from Ten Cultivars and Two Growing Seasons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010, 58(3), 1609-1614 [cit. 2020-11-29]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf903621y

- 5) SHYU, Yung-Shin, Guan-Wen CHEN, Shao-Ching CHIANG a Wen-Chieh SUNG. Effect of Chitosan and Fish Gelatin Coatings on Preventing the Deterioration and Preserving the Quality of Fresh-Cut Apples. *Molecules* [online]. 2019, 24(10) [cit. 2020-11-29]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24102008

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 229/2020/FVHE

Optimalizace metod pro detekci *Helicobacter pylori* a zjištění jeho výskytu v syrovém mléce

Aneta Grondělová, Zora Štástková, Pavlína Navrátilová, Ivana Bednářová, Petra Furmančíková,

Daniela Nečasová

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

Úvod

Helicobacter pylori je gram negativní, mikroaerofilní pohyblivá bakterie kolonizující žaludeční sliznici. Infekce *H. pylori* má přímou souvislost s výskytem závažných onemocnění člověka, jako je chronická gastritida, duodenální vřed a rakovina žaludku. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny, která je součástí Světové zdravotnické organizace, v roce 1994 klasifikovala *Helicobacter pylori* jako karcinogen skupiny 1 (1). Cesty přenosu a rezervoáry této bakterie jsou témata, která jsou předmětem diskuse mnoha výzkumných prací, nebyly však dosud přesně objasněny. Epidemiologické důkazy a výskyt *H. pylori* v potravinách živočišného původu, vegetabilních potravinách a ve vodě, potvrzují hypotézu předloženou mnoha autory, a to že bakterie je potravinovým patogenem (2). Od objevu bakterie *H. pylori* se klasická kultivační metoda používá v humánní medicíně jako rutinní diagnostický test a je považována za „zlatý standard“ mezi metodami. *H. pylori* je náročná bakterie vyžadující média bohatá na živiny, mikroaerofilní prostředí, vysokou vlhkost vzduchu (96-100 %) a pH blízké hodnotě 7,0. Média jsou obvykle obohacena o krev (redukční činidlo) a specifická antibiotika. Kultivační metoda byla v řadě studií používána pro stanovení přítomnosti *H. pylori* v mléce. Z publikovaných studií vyplývá, že výsledky metody nejsou při vyšetření potravin optimální (2,3,4). Z dalších metod, které byly využity pro detekci *H. pylori* v potravinách, se jeví jako úspěšná imunomagnetická separace (IMS) následovaná molekulárně-biologickou metodou (PCR) (3). Vysokou citlivost vykazují molekulárně-biologické metody umožňující specifickou sekvenční amplifikaci DNK mikroorganismu spolu s molekulární typizací kmenů. K identifikaci *H. pylori* v potravinách byly vyvinuty multiplex PCR (MT-PCR), Nested-PCR, PCR v reálném čase (real time PCR), reverzně transkripční PCR (RT-PCR) (2). Cílem práce bylo sestavit vhodný postup pro detekci *H. pylori* s využitím kultivační, imunologické a molekulárně-biologické metody a následně stanovit jeho přítomnost ve vzorcích syrového mléka pocházejícího z oblasti Moravy na území České republiky.

Materiál a metodika

Vzorky

Ve studii byly analyzovány bazénové vzorky kravského mléka ($n = 78$) a individuální vzorky kozího mléka ($n = 52$) pocházející z farem na Moravě. Vzorky byly odebrány v období od června do září 2020. Bazénové vzorky kravského mléka byly získány na svozových linkách tří mlékáren zpracovávajících mléko, které odebírají mléko z farem chovajících mléčný skot v oblasti Morava v České republice. Vzorky byly odebírány automaticky (autosamplerem) při přejímce mléka na farmě do sterilních vzorkovnic. Individuální vzorky kozího mléka byly získány ručním dojením do sterilních vzorkovnic. Vzorky byly přepravovány a skladovány při teplotě 4–6 °C. Vyšetření vzorků v laboratoři proběhlo do 24 hodin po odběru.

Kultivační metoda

Přímá kultivace vzorků proběhla na Helicobacter agaru, který byl připraven z následujících složek: Brain Heart Infusion Broth (Oxoid LTD., Hampshire, UK), Norit® A (Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany), bramborový škrob (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA), Yeast Extract (Oxoid), Agar Bacteriological (Oxoid), dále defibrinované koňské krve, koňského séra, obohacovadla A (Dulab s.r.o., Dubné, ČR) a směsi antibiotik: vankomycinu (30 000 j./ml) (Mylan Pharmaceuticals s.r.o., Praha, ČR), kolistinu (30 000 j./ml) (Teva Pharmaceuticals, s.r.o., Praha, ČR) a trimetoprimu (1500 j./ml) (Sigma-Aldrich). 50 µl vzorku mléka bylo kultivováno na Petriho miskách s Helicobacter agarem. Inkubace misek proběhla při 37 °C po dobu 9 dní v anaerostatu, za mikroaerofilních podmínek (5 % O₂, 15 % CO₂ a 80 % N₂) vytvořených pomocí vyvíječe CampyGen™ 2.5L (Oxoid). Po skončení inkubace byly suspektní kolonie (malé, jasné, průhledné, kopulovité kolonie) podrobeny ureázovému testu UREASAtest50 (TestLine Clinical Diagnosis s.r.o., Brno, ČR) pro průkaz ureázové aktivity *H. pylori*.

Nested-PCR

U této reakce se pro zvýšení specifity využívají dva páry primerů. Jeden pár vnějších primerů a jeden pár vnitřních primerů. Vnitřní primery nasedají na sekvenci, která je ohraničena vnějšími primery. Nejprve se provede reakce s vnějšími páry primerů a vzniklý produkt je využit jako templát pro reakci s vnitřními primery. Kombinací dvou párů primerů se zvýší pravděpodobnost amplifikace pouze daného, specifického úseku. Z mléka byla přímo vyextrahována DNA *H. pylori* pomocí QIAamp® DNA Blood Mini Kitu (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) dle návodu poskytnutého výrobcem. K amplifikaci byly použity oligonukleotidové primery dle publikace Quaglia et al. (2009). Vnější oligonukleotidové primery s označením Hp 1 (5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3') a Hp 2 (5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAAACGC-3') byly použity k amplifikaci *glmM* genu *H. pylori*

o délce 294 bp. Vnitřní primery s označením Hp 3 (5'-CTTTCTTCTCAAGCGGTTGTC-3') a Hp 4 (5'-CAAGCCATCGCCGGTTTTAGC-3') byly použity k amplifikaci vnitřní části tohoto genu o délce 252 bp (Generi Biotech s.r.o. Hradec Králové, ČR). Reakční směs byla připravena z PPP Master mixu (Top-Bio s.r.o., Vestec, ČR), PCR H₂O (Top-Bio s.r.o., Vestec, ČR), Hp 1 a Hp 2 (0.5 μM). K 23 μl této směsi byly přidány 2 μl vyextrahované DNA. Nested-PCR probíhala pomocí termocycleru za následujících podmínek: 95 °C po dobu 2 minut, následovalo 33 cyklů (94 °C 1 min, 61 °C 2 min, 72 °C 1,5 min.), závěrečná syntéza 72 °C po dobu 5 minut a zchlazení na 6 °C. Po skončení amplifikace byly 2 μl konečného produktu z první reakce přidány do druhé reakční směsi stejného složení jako u první reakce, pouze s rozdílem přidávaných primerů (Hp 3 a Hp 4). Podmínky amplifikace druhé reakce byly následující: 95 °C po dobu 2 minut, následovalo 30 cyklů (94 °C 1 min, 62 °C 2 min, 72 °C 1,5 min), závěrečná syntéza 72 °C po dobu 5 minut. Vzorky byly zchlazeny opět na 6 °C. K detekci PCR produktů byla použita elektroforetická separace v 1,5% agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem s následnou vizualizací pod UV světlem. Elektroforéza probíhala při 120 V, 90 mA, 60 minut. Jako marker byl použit DNA Ladder o velikosti 100–4000bp (Lonza Rockland, Inc., Rockland, USA). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *H. pylori* pocházejícího ze vzorku humánní žaludeční sliznice. Kmen *H. pylori* byl poskytnut Mikrobiologickým oddělením Fakultní nemocnice u sv. Anny, Brno.

Pyloritop® Ag

Imunochromatografický test Pyloritop® Ag (Biosynex, Francie) je určený k detekci antigenu *H. pylori* ve vzorcích lidské stolice. Pomocí tohoto kitu byla testována přítomnost antigenu *H. pylori* ve vzorcích mléka. 80 μl vzorku mléka, bylo napipetováno do sběrné zkumavky obsahující ředící pufr. Protřepáním došlo k promíchání vzorku s pufrem. Po 2 minutách se do jamky pro přidání vzorku na testovací kazetě přenesly 2 kapky roztoku ze sběrné zkumavky. Výsledek byl odečten po 10 minutách. Pozitivní výsledek byl indikován červeným proužkem v testovací linii (T) a kontrolní zóně (C). Červený proužek o různé intenzitě zbarvení v testovací linii (T) byl také hodnocen jako pozitivní. V případě negativního výsledku byl červený proužek pouze v kontrolní zóně (C). Jako neplatný výsledek bylo hodnoceno neobjevení proužku v kontrolní zóně (C).

Výsledky

Využití kultivační metody pro izolaci *H. pylori* ze vzorků potravin, zejména pokud obsahují vysoké počty doprovodné mikroflóry, je náročné a zdlouhavé, protože vyžaduje selektivní media s antibiotiky, mikroaerofilní podmínky a dlouhou dobu kultivace (až 9 dní). Další nevýhodou kultivační metody je neschopnost zachytit kokoidní, nekultivovatelnou formu bakterie (VNC - viable nonculturable form).

V naší studii nebyla kultivační metodou prokázána přítomnost *H. pylori* v žádném z vyšetřených vzorků. Kromě již zmíněných důvodů, mohly mít vliv na růst bakterie nepříznivé podmínky v době mezi odběrem vzorků a jejich vyšetřením (převoz vzorků do laboratoře a skladování při chladírenských teplotách a za aerobních podmínek). Metodou Nested-PCR bylo z celkového počtu 78 bazénových vzorků syrového kravského mléka pozitivních na přítomnost bakterie *H. pylori* 32 (41 %) vzorků. Z analyzovaných 52 individuálních vzorků syrového kozího mléka touto metodou bylo pozitivních 30 (58 %) vzorků. Na rozdíl od kultivační metody je možné metodou Nested-PCR detekovat i nekultivovatelnou formu bakterie. Stanovením citlivosti testu Pyloritop® Ag, jsme zjistili, že lze využít i pro detekci antigenu *H. pylori* v mléce. Testem Pyloritop® Ag však nebyla potvrzena přítomnost *H. pylori* ve vzorcích. Důvodem mohou být nízké počty této bakterie v mléce.

Závěr

Studie potvrdila, že z metod, které byly zavedeny pro detekci *H. pylori* ve vzorcích syrového mléka, se jeví jako vysoce citlivá a specifická metoda Nested PCR. Vysoká citlivost metody umožňuje detekovat malý počet bakteriálních buněk. Pomocí PCR však není možné zjistit životaschopnost vyšetřované bakterie v potravinách. Výsledky studie prokázaly přítomnost DNA *H. pylori* ve vysokém procentu vzorků syrového kozího a kravského mléka původem z různých chovů mléčného skotu v oblasti Moravy v České republice. Toto vysoké procento dokazuje, že syrové mléko je zdrojem bakterie *H. pylori* a může představovat riziko pro konzumenta.

Seznam literatury:

- 1) GUESSOUM, M., GUECHI, Z., ADNANE, M. First-time serological and molecular detection of *Helicobacter pylori* in milk from Algerian local-breed cows. *Veterinary World* [online]. 2018, 11(9), 1326-1330 [cit. 2020-03-05]. DOI: 10.14202/vetworld.2018.1326-1330. ISSN 09728988.
- 2) QUAGLIA, N. C., DAMBROSIO, A. *Helicobacter pylori*: A foodborne pathogen? *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2018, 24(31), 3472-3487 [cit. 2020-03-10]. DOI: dx.doi.org/10.3748/wjg.v24.i31.3472.
- 3) VELÁZQUEZ, M., FEIRTAG, J. M. *Helicobacter pylori*: characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implicating foods and water. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1999, 53, 95-104 [cit. 2020-04-01].
- 4) GOMES, B. C., DE MARTINIS, E. C. P. The significance of *Helicobacter pylori* in water, food and environmental samples. *Food Control* [online]. 2004, 15 (5), 397-403 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1016/S0956-7135(03)00106-3. ISSN 09567135.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 224/2020/FVHE

Studium vlivu orální aplikace mikroplastů na organismus pstruha duhového s důrazem na střevní mikroflóru

Aneta Hollerová, Nikola Hodkovicová, Jana Blahová, Zuzana Koutková, Jana Cahová,

Veronika Doubková

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

Úvod

V posledních letech se výroba plastů po celém světě dramaticky zvyšuje a je považována za vážnou hrozbu pro vodní prostředí. Mikroplasty jsou částice o velikosti 20 µm až 5 mm a vznikají degradací plastových materiálů. Částice vstupují do potravního řetězce prostřednictvím bezobratlých organismů, jejichž orálním příjmem se tyto kontaminanty dostávají do dalších necílových organismů. Možné negativní dopady konzumace mikroplastů zahrnují snížení nutriční hodnoty stravy, poškození tkání nebo zvýšení míry expozice patogenů (1,2). Cílem tohoto projektu je rozšíření poznatků týkajících se účinků polystyrénových mikročástic na zdravotní stav pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), zejména na jeho střevní mikroflóru v experimentálních podmínkách. Testované částice byly podávány v krmivu, a to v koncentracích 0,5; 2 a 5 %.

Materiál a metodika

Projekt je zaměřený na sledování potenciálního negativního vlivu mikroplastů na zdravotní stav pstruha duhového. Vlastní realizace spočívá v provedení subchronického testu toxicity po dobu šesti týdnů. Z důvodu nepříznivé epidemiologické situace v letošním roce byl přesunut začátek vlastního testu, proto jeho realizace ještě probíhá. Jeho ukončení proběhne v polovině prosince tohoto roku. Test probíhá v akreditovaném zařízení Ústavu zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství (Mendelova univerzita v Brně).

V experimentu jsou sledovány potenciálně negativní účinky polystyrénových mikročástic (EPRUI Biotech Co. Ltd, Čína), které jsou testovaným jedincům aplikovány v krmivu. Před začátkem experimentu byla provedena komplexní charakterizace těchto částic a následně byly využity pro přípravu krmiva, které je podáváno testovaným organismům. Experiment probíhá v návaznosti na data a zkušenosti získané z předchozí studie provedené s mikroplastovými částicemi polyethylenu.

Před zahájením vlastního experimentu byly ryby náhodně rozděleny do 8 testovacích nádrží po 20 ks ryb. V experimentu je kontrolní skupina a 3 pokusné skupiny, všechny skupiny jsou v duplikátu (tzn. celkem 160 ks ryb). Před začátkem pokusu proběhla 14-denní fáze aklimatizace, jejímž účelem bylo

navyknutí pokusných ryb na podmínky experimentálního prostředí a podávané krmivo. Po aklimatizaci byl zahájen vlastní experiment, kdy testovaným jedincům se začalo podávat speciálně připravené krmivo s přísadkou polystyrenových mikročástic. Krmivo bylo připraveno patentovanou impregnační metodou. Testované koncentrace mikroplastových částic aplikované do krmiva vychází z již proběhlého experimentu s polyethylenovými mikročásticemi, a jsou 0,5, 2 a 5 %. V průběhu experimentu jsou pravidelně analyzovány fyzikálně-chemické parametry vody a dále jsou průběžně sledovány přírůstky hmotnosti (průběžné vážení po 14 dnech pro úpravu krmné dávky), mortalita, případné změny chování a odchylky od zdravotního stavu.

V závěru pokusu bude provedeno usmrcení ryb tupým úderem do hlavy. Hlavním cílem je analýza složení střevní mikroflóry a vliv na druhy *Lactobacillus spp.* a *Brevinema* za pomoci odběru vzorků střevního obsahu. Ze vzorků bude izolována DNA, která bude následně předložena k qRT-PCR analýze s cílem identifikace hlavních skupin střevních mikroorganismů se zaměřením speciálně na výše uvedené druhy. Sledováno bude případné ovlivnění jejich vzájemného poměru u exponovaných skupin vůči kontrolní skupině. Tato analýza bude doplněna o histologické vyšetření a snímky z elektronového mikroskopu k ověření prostupnosti mikročástic střevní stěnou. Vzorky střeva budou odebrány z více míst ke zjištění vlivu na různé úseky trávicího traktu. Následně bude vyhodnocen vliv mikroplastů na ukazatele hematologického, biochemického a imunologického profilu ryb. V rámci experimentu budou odebrány také vzorky tkání pro ověření průniku mikročástic do tkání ryb za pomoci elektronové mikroskopie a histologického vyšetření. Dílčím cílem bude zjištění vlivu na genovou expresi vybraných pro a protizánětlivých genů (např. *cyp1a*, *tnf-a*, *il1b*, *il10* apod.) za pomoci metody kvantitativní RT-PCR. Získaná data budou následně statisticky analyzována s využitím statistického programu Unistat. Pokud data budou splňovat podmínku normálního rozdělení (Shapiro-Wilkův test) a homogeneity rozptylu (Levenův test), budou pro zjištění rozdílů sledovaných parametrů využita jednofaktorová analýza rozptylu a test mnohonásobného porovnání – Tukey-HSD test. V případě nesplnění podmínky normality, bude další testování probíhat s využitím vícevýběrového mediánového testu.

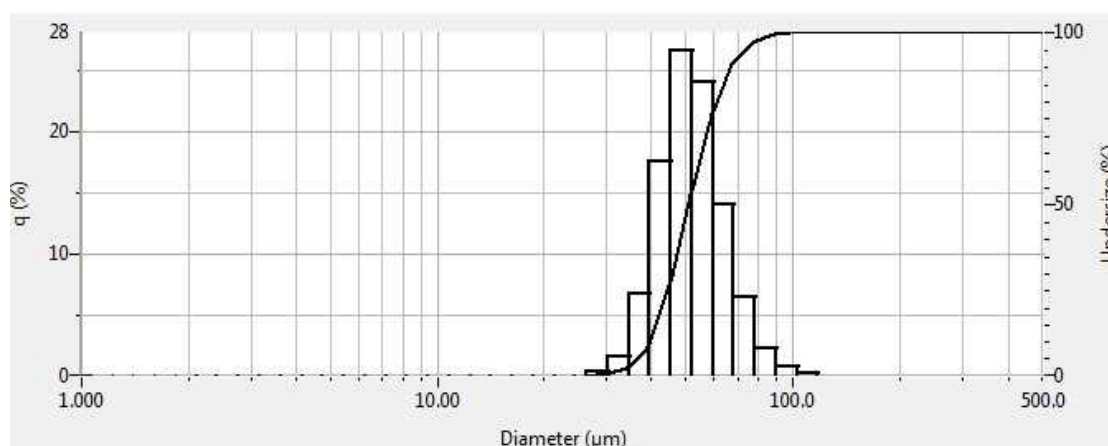
Výsledky

Kvůli špatné epidemiologické situaci došlo k odložení začátku experimentu. Experiment v současné chvíli ještě probíhá, proto nejsou výsledky plánovaných analýz k dispozici. Prozatím byly provedeny dílčí analýzy, ve kterých byl proveden návrh primerů specifických pro střevní tkáň (*il7*, *il2*, *igT*, *tlr5*). Dále byla také ověřena jejich funkčnost pomocí gelové elektroforézy. Pro validaci PCR metody byly využity vzorky vybraných tkání, které byly získány v rámci předchozí studie zaměřené na vliv

polyethylenových mikročastic. Validací byla zjištěna velikost výsledných produktů, která se pohybovala mezi 100 - 250 bp (páry bází). Přítomnost nežádoucích dimerů nebyla zjištěna.

Ve spolupráci s Masarykovou univerzitou bylo také provedeno komplexní zhodnocení měrného povrchu polystyrenových mikročastic, které byly použity pro testování. S využitím laserového rozptylového analyzátoru velikosti částic LA-960 (HORIBA) byly provedeny kontrolní analýzy. Použité částice mají průměrnou velikost $52,5 \pm 11,5 \mu\text{m}$ (mediánová hodnota – $50,8 \mu\text{m}$, modus – $48,9 \mu\text{m}$). Detailní výsledky analýzy jsou vedeny v histogramu na obrázku 1.

Obrázek 1. Histogram znázorňující distribuci velikosti polystyrénových mikročastic použitých v subchronickém testu toxicity na pstruhu duhovém



Závěr

Kvůli špatné epidemiologické situaci experiment v současné chvíli ještě probíhá, proto nejsou výsledky plánovaných analýz zatím k dispozici. Do této doby byly provedeny dílčí, přípravné a kontrolní analýzy. Hlavním cílem projektu je zvýšení povědomí o možnostech snížení spotřeby plastů, zejména proto, že se jedná o látky těžce degradovatelné a perzistující v životním prostředí. Tento experiment na juvenilních stádiích pstruha duhového představuje významnou součást hodnocení dopadu mikroplastů právě na vodní organismy a znečištění vod a přinese cenné a aktuální informace o problematice kontaminace vodních potravních řetězců.

Seznam literatury:

- 1) AVIO, C.G., GORBI, S., REGOLI, F. 2017. Plastics and microplastics in the oceans: From emerging pollutants to emerged threat. *Marine Environmental Research* 128:2–11. DOI: 10.1016/j.marenvres.2016.05.012.
- 2) HIDALGO-RUZ, V., GUTOW, L., THOMPSON, R.C., THIEL, M. 2012. Microplastics in the marine Environment: A review of the methods used for identification and quantification. *Environmental Science & Technology* 46:3060–3075. DOI: 10.1021/es2031505.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 212/2020/FVHE

Soap production from waste frying oils

Simona Jancikova, Bojan Antonic, Karolina Tesikova, Dani Dordevic, Bohuslava Tremlova

Department of Plant Origin Foodstuffs Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Introduction

Large amounts of waste are produced every day in the world and with the increase in population, there is an increasing trend (1). One of the major problems in waste treatment is the waste fried oil used in households, restaurants and industry for food heat treatment (2). Annual worlds production of different kinds of edible oils was estimated at 200 million tons (3). A part of used oil is collected and utilized, but still, a large amount ends up in the sewers. This further causes problems in sewage treatment systems as well as negatively affect the wildlife if it enters rivers directly. It is, therefore, necessary to work on finding ways to utilize as much of this waste as possible (4).

Soap production is one of the ways to reuse fried oil. Soaps are formed in the process of saponification in which fatty acids from oil react with base (usually potassium or sodium hydroxide). In this process, no waste products are created and it does not require energy, so it can be called economically sustainable green technology. Soap as a product degrades faster than oil so that also from the waste management point of view it is more acceptable (5).

The study aimed to look into the possibility of using the fried oils in the soap production and to assess the differences in physical properties between the soaps made from fresh and from fried oils.

Materials and methods

The soap samples were made from fresh and fried rapeseed, sunflower and palm oil. Simulation of French fries frying was done to obtain fried oil samples. Frying was done in 5 stages that were defined by total polar matter (TPM) until the limit value of 24% TPM (above which the fried food is not safe for human consumption) was achieved. The recipe for soap samples consisted of 130 g of oil, 17.52 g of NaOH and 49.40 g of distilled water. The mixing was done according to the cold saponification process (6). The process of oil processing with measured TPM levels and accordingly sample names are shown in Table 1. The samples were analyzed for following parameters: pH, moisture, total alkali, total fat content (7), foaming (8), hardness and stickness.

Results

The measured parameters done on experimentally produced soaps are shown in Table 2. The parameters pH, moisture, total fat content and total alkali showed high similarity among all the samples, and values obtained were comparable with the literature data (Table 2). The range of values for those parameters can describe the high quality of obtained soap samples. Data obtained for foaming and the textural parameters hardness and stickiness vary among the samples. Though, no clear trend was found that would correlate to the frying oil degree.

The PCA analysis (Figure 1) showed the significant differences between all samples with the visible cluster groups of soaps made from the same type of oil.

Table 1. Description of soap samples abbreviations and corresponding oil TPM% levels

Sample	Abbreviation	TPM level (%)
Controls	0R, 0S, 0P	5
Sample 1 sets	1R, 1S, 1P	6.5
Sample 2 sets	2R, 2S, 2P	10
Sample 3 sets	3R, 3S, 3P	15
Sample 4 sets	4R, 4S, 4P	20
Sample 5 sets	5R, 5S, 5P	24

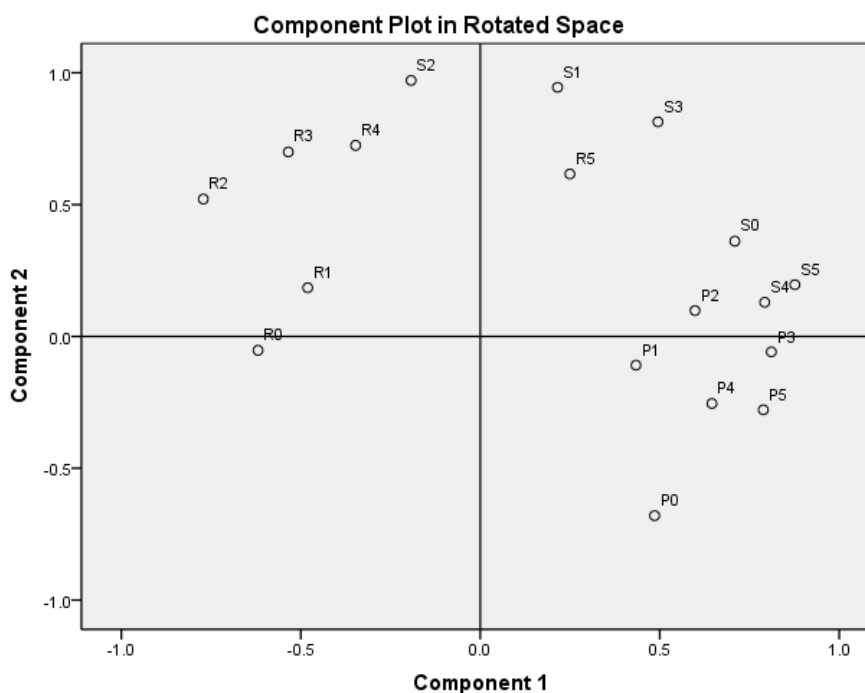


Figure 1. PCA analysis of parameters obtained in the soap samples

Table 2. Obtained results from physical soap samples testing

Sample	pH	Moisture	Total fat content	Total alkali	Foaming	Hardness	Stickness
0R	9.67 ± 0.00	7.43 ± 0.17	82.34 ± 1.34	0.00 ± 0.00	49 ± 10	2320 ± 130	-622 ± 116
	9.80 ± 0.00	7.06 ± 1.73	81.96 ± 1.56	0.00 ± 0.00		2424 ± 257	-430 ± 34
1R	10.08 ± 0.00	9.91 ± 0.52	80.00 ± 2.20	0.00 ± 0.00	47 ± 8	1654 ± 235	-318 ± 59
	10.08 ± 0.00	9.82 ± 1.48	81.61 ± 1.12	0.00 ± 0.00		1256 ± 183	-326 ± 65
2R	10.11 ± 0.00	9.21 ± 1.44	83.31 ± 1.10	0.00 ± 0.00	42 ± 11	1414 ± 128	-405 ± 38
	10.08 ± 0.00	8.16 ± 0.87	84.33 ± 0.65	0.00 ± 0.00		1521 ± 185	-457 ± 31
3R	9.58 ± 0.00	6.44 ± 0.67	85.98 ± 0.51	0.00 ± 0.00	25 ± 7	786 ± 51	-411 ± 92
	9.85 ± 0.00	8.28 ± 1.11	84.35 ± 0.84	0.00 ± 0.00		856 ± 133	-299 ± 31
4R	10.06 ± 0.00	9.32 ± 0.17	83.32 ± 0.14	0.00 ± 0.00	42 ± 12	457 ± 23	-148 ± 34
	10.07 ± 0.00	7.87 ± 0.82	84.67 ± 0.62	0.00 ± 0.00		804 ± 105	-153 ± 69
5R	9.48 ± 0.00	6.26 ± 1.45	86.31 ± 1.09	0.00 ± 0.00	27 ± 10	1352 ± 155	-442 ± 20
	9.59 ± 0.00	6.83 ± 1.32	85.77 ± 0.99	0.00 ± 0.00		1272 ± 118	-471 ± 45
0S	10.13 ± 0.01	7.07 ± 0.16	85.44 ± 0.13	0.00 ± 0.00	20 ± 9	4990 ± 402	-794 ± 101
	10.16 ± 0.00	8.80 ± 1.22	83.81 ± 0.92	0.01 ± 0.01		3866 ± 276	-346 ± 85
1S	10.07 ± 0.00	8.58 ± 1.00	83.93 ± 0.76	0.00 ± 0.00	21 ± 5	3243 ± 363	-287 ± 96
	10.13 ± 0.01	7.40 ± 0.06	85.00 ± 0.13	0.00 ± 0.00		3023 ± 296	-427 ± 127
2S	10.13 ± 0.01	7.40 ± 0.06	85.00 ± 0.13	0.00 ± 0.00	13 ± 1	296	127
	10.00 ± 0.00	8.21 ± 0.29	84.10 ± 0.25	0.03 ± 0.01		3037 ± 370	-568 ± 75
3S	9.97 ± 0.00	8.04 ± 0.11	84.58 ± 0.09	0.00 ± 0.00	14 ± 2	3319 ± 348	-496 ± 146
	10.00 ± 0.00	0.11	0.09	0.00		16 ± 3	348

Conclusion

Based on the analysis done on experimentally obtained samples, it can be concluded that it is possible to produce the soaps from waste frying oils that will maintain good quality physical properties. Certainly, that more experiments in that field and more different types of analysis should be done.

References:

- 1) HERVA, Marta, Belmira NETO a Enrique ROCA. Environmental assessment of the integrated municipal solid waste management system in Porto (Portugal). *Journal of Cleaner Production* [online]. 2014, 70, 183-193 [cit. 2020-11-29]. ISSN 09596526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2014.02.007
- 2) LOPES, Marlene, Sílvia M. MIRANDA a Isabel BELO. Microbial valorization of waste cooking oils for valuable compounds production – a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* [online]. 2020, 50(24), 2583-2616 [cit. 2020-11-29]. ISSN 1064-3389. Dostupné z: doi:10.1080/10643389.2019.1704602
- 3) Statista.com. Available online: <https://www.statista.com/statistics/263937/vegetable-oils-global-consumption/> (accessed on 5 May 2020).
- 4) NIKOLAOU, Ioannis E., Konstantinos I. EVANGELINOS a S. ALLAN. A reverse logistics social responsibility evaluation framework based on the triple bottom line approach. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2013, 56, 173-184 [cit. 2020-11-29]. ISSN 09596526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2011.12.009
- 5) MAOTSELA, Tlameo, Gwiranai DANHA a Edison MUZENDA. Utilization of Waste Cooking Oil and Tallow for Production of Toilet “Bath” Soap. *Procedia Manufacturing* [online]. 2019, 35, 541-545 [cit. 2020-11-29]. ISSN 23519789. Dostupné z: doi:10.1016/j.promfg.2019.07.008
- 6) ADIGUN, Oludoyin, Charles MANFUL, Natalia PRIETO VIDAL, et al. Use of Natural Antioxidants from Newfoundland Wild Berries to Improve the Shelf Life of Natural Herbal Soaps. *Antioxidants* [online]. 2019, 8(11) [cit. 2020-11-29]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox8110536
- 7) VIVIAN, Onyango P., Oyaro NATHAN, Aloys OSANO, Linda MESOPIRR a Wesley Nyaiyeti OMWOYO. Assessment of the Physicochemical Properties of Selected Commercial Soaps Manufactured and Sold in Kenya. *Open Journal of Applied Sciences* [online]. 2014, 04(08), 433-440 [cit. 2020-11-29]. ISSN 2165-3917. Dostupné z: doi:10.4236/ojapps.2014.48040
- 8) WARRA, AA, LG HASSAN, SY GUNU a SA JEGA. Cold-Process Synthesis and Properties of Soaps Prepared from Different Triacylglycerol Sources. *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences* [online]. 2011, 18(2) [cit. 2020-11-29]. ISSN 0794-5698. Dostupné z: doi:10.4314/njbas.v18i2.64350

The work was financed by grant agency IGA VFU Brno 228/2020/FVHE

Efekt farmakologicky účinných látek na embryonální a juvenilní stádia ryb

Denisa Medková^{1,2}, Pavla Sehonová¹, Josef Václavík¹, Nikola Hodkovicová^{3,4}, Zdeňka Svobodová¹

¹Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, ²Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita Brno, ³Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, ⁴Oddělení infekčních chorob a preventivní medicíny, Výzkumný ústav veterinárního lékařství Brno

Úvod

Jedním z hlavních důvodů výskytu reziduí léčiv v životním prostředí je jejich neustále vzrůstající spotřeba společně s nízkou účinností jejich odstranění v čistírnách povrchových vod. Přestože se tyto látky v životním prostředí vyskytují pouze v nízkých koncentracích, může mít jejich dlouhodobé působení negativní vliv na organismy vodního prostředí. Koncentrace reziduí léčiv, zejména psychoaktivních látek, antibiotik a analgetik narůstají jak v povrchových vodách, tak i v sedimentech, tkáních organismů a dostávají se do potravního řetězce. Např. antidepresivum fluoxetin, které patří k nejčastěji detekovaným antidepresivům ve vodním prostředí, se ukládá v sedimentech v koncentracích 34–152 ng/g (1). U ryb a ostatních vodních živočichů se fluoxetin kumuluje převážně v nervové tkáni, játrech, ledvinách a gonádách v koncentracích 140–1020 ng/g (2). Zvláště ohrožená mohou být raná vývojová stádia organismů, která ještě nemají dostatečně vyvinuté obranné mechanismy a organismy na vrcholu potravního řetězce – dravé ryby. Cílem práce bylo posoudit vliv reziduí farmakologicky účinných látek s různými mechanismy účinku, konkrétně fluoxetinu, nortriptylinu, tramadolu a enrofloxacinu, na embryonální a juvenilní stádia různých druhů ryb.

Materiál a metodika

Byl proveden akutní embryonální test toxicity v souladu s metodikou OECD 236 (3), ve kterém byla oplozená vajíčka kapra obecného (*Cyprinus carpio*), sumce velkého (*Silurus glanis*), lína obecného (*Tinca tinca*) a dánia pruhovaného (*Danio rerio*) vystavena expozici nortriptylinu, tramadolu (oboje v koncentracích 0,1; 1; 10; 1 000 a 25 000 µg/l) a enrofloxacinu (v koncentracích 0,1; 1; 10; 1 000 a 100 000 µg/l) po dobu 96 hodin. Embrya byla do testu nasazena do 60–90 minut po oplození do 48 jamkových mikrotitračních destiček. Během pokusu byla embrya umístěna do růstové komory s konstantní teplotou $26 \pm 1^\circ\text{C}$ a fotoperiodou 12 hodin světlo a 12 hodin tma. Každých 24 hodin docházelo k výměně roztoků a kontrole koagulace embrya, absence tvorby somitů, nedokonalému oddělení ocasu od žloutkového vaku a nepřítomnost srdečního tepu, morfologické změny a čas líhnutí.

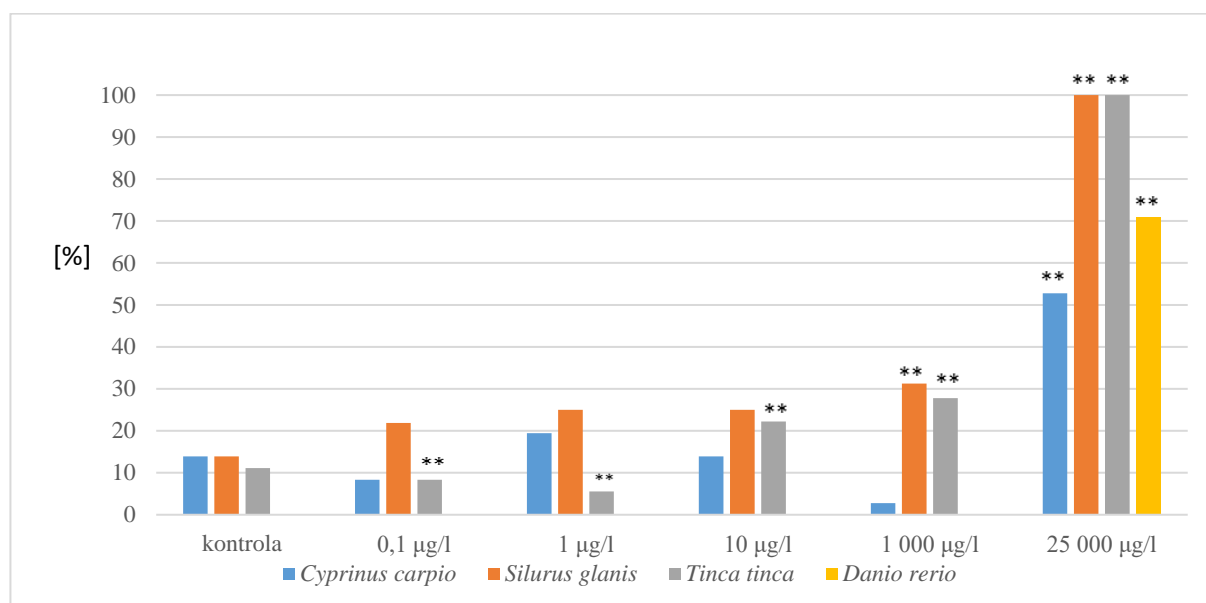
Po 96hodinové expozici byly vzorky odebrány na hodnocení změn genové exprese vybraných genů zodpovědných za vývoj raného organismu (oko, mozek, játra, skelet).

Dále byl proveden 42denní růstový test na pstruhu duhovém dle metodiky OECD 215. Testovaná látka fluoxetin byla pomocí impregnační metody zabudována do krmiva Biomar 921. Testovací koncentrace (0,1; 1; a 10 mg/kg) vycházely z koncentrací běžně se vyskytujících ve vodním prostředí – bentos, sediment. Krmivo bylo rybám podáváno 3x denně, stabilita pokusných podmínek byla ověřována pravidelným měřením fyzikálních a biochemických parametrů (pH, t, O₂%, amoniak, dusitany, chloridy). V závěru pokusu byla rybám odebrána krev na hematologické a biochemické vyšetření. Poté, co bylo provedeno utracení ryb, došlo k hodnocení morfologických parametrů a následnému odběru vzorků z jednotlivých tělních tkání na další vyšetření (histologie, oxidativní stres, stanovení reziduí). Výsledky byly hodnoceny v programu Unistat 5.6 for Excel. Statistická významnost byla hodnocena na hladině $p < 0,05$ a $p < 0,01$ a porovnána ke kontrole. V průběhu testu akutní toxicity na embryích ryb byly získány výsledky o vlivu enrofloxacinu, nortriptylinu a tramadolu na embrya sumce velkého, kapra obecného a lína obecného. Testy byly rovněž provedeny na dániu pruhovaném, které je pro tento typ testu standardizovaným organismem.

Výsledky

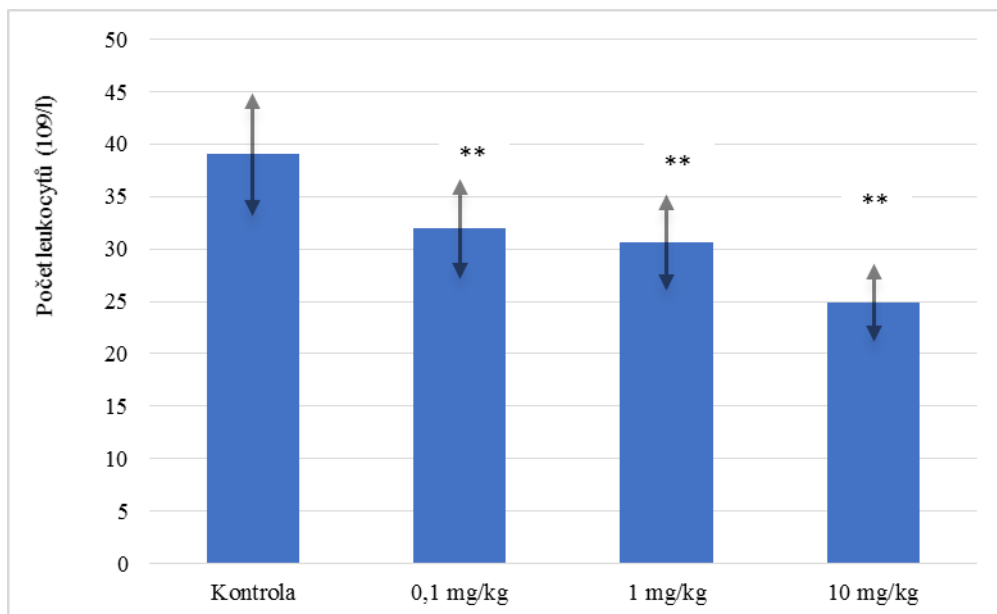
Expozice tramadolu nevedla u žádné testované koncentrace ani jednoho sledovaného druhu k statisticky významným změnám s jedinou výjimkou, a to byl statisticky významně nižší počet vylíhlých jedinců druhu lín obecný v čase 48 hodin po oplození ve všech koncentracích. V časech 72 a 96 hodin po oplození už však tento rozdíl pozorován nebyl. Ke zpomalení líhnutí v čase 48 hodin po oplození u jedinců lína obecného vedla též expozice enrofloxacinu ve všech testovaných koncentracích (s výjimkou 10 µg/l, kde však byla hodnota $p = 0,0504$), v dalších dnech testu už však tento rozdíl pozorován rovněž nebyl. U jedinců druhu kapra obecného byl po expozici enrofloxacinu v koncentraci 100 000 µg/l pozorován statisticky vyšší výskyt vývojových deformit ve srovnání s kontrolou. Nejtoxičtější bylo ze sledovaných léčiv tricyklické antidepresiv nortriptylin. U všech testovaných organismů byla v nejvyšší testované koncentraci 25 mg/l pozorována statisticky významně vyšší mortalita ve srovnání s kontrolou (graf 1). U kapra obecného byl v této koncentraci pozorován zároveň statisticky vyšší výskyt malformit. Rychlost líhnutí byla ovlivněna u kapra obecného v koncentraci 25 mg/l v čase 72 hodin po oplození a u lína obecného ve všech testovaných koncentracích kromě nejvyšší testované (kde však byl nízký počet přeživších) v čase 48 hodin po oplození. Exprese mRNA sledovaných 8 genů zodpovědných za vývoj orgánových soustav a skeletu byla v případě dánie pruhovaného nejvíce ovlivněna po expozici tramadolu, a to i v environmentálně-relevantní koncentraci

0,1 µg/l. Změny byly pozorovány vždy alespoň u jednoho genu ze všech 4 sledovaných oblastí vývoje organismu – vývoj srdce, jater, mozku a skeletu. Po expozici enrofloxacinu došlo i v nejnižší testované koncentraci 0,1 µg/l ke zvýšení exprese mRNA u genů zodpovědných za vývoj skeletu, jater a mozku. Expozice nortriptylinu v testovaných koncentracích 0,1 a 10 µg/l vedla ke zvýšení exprese mRNA genu *paxb6* zodpovědného za vývoj mozku. Naproti tomu kapr obecný se ukázal být nejcitlivější vůči nortriptylinu. Tato látka ovlivnila v obou testovaných koncentracích expresi genů zodpovědných za vývoj jater, srdce, mozku i skeletu. Expozice enrofloxacinu neovlivnila pouze expresi genu zodpovědného za vývoj srdce. Expozice tramadolu v obou testovaných koncentracích ovlivnila expresi mRNA u genů zodpovědných za vývoj skeletu a jater.



Graf 1. Mortalita embryí ryb [%] po 96 hod. expozici nortriptylinu (** značí $p < 0,01$)

Za účelem posouzení vlivu antidepresiv vyskytujících se v potravním řetězci vodního prostředí byl proveden růstový test na pstruhu duhovém, kde bylo antidepresivum fluoxetin aplikováno do krmiva. U pstruha duhového byl zjištěn statisticky významný pokles leukocytů u všech exponovaných skupiny (0,1; 1 a 10 mg/kg) ve srovnání s kontrolou (graf 2). Tento výsledek svědčí o imunosupresivních účincích fluoxetinu, které mohou hrát roli ve vzniku sekundárních infekcí. Dále byly zjištěn statisticky významně nižší obsah triacylglycerolů v krevní plazmě u skupiny exponované nejvyšší testované koncentrace (10 mg/kg) ve srovnání s nejnižší testovanou koncentrací (0,1 mg/kg). Tento výsledek vede k domněnce, že se triacylglyceroly ukládají v některých orgánech, jako jsou například játra (bude podpořeno/vyvráceno výsledky histologického vyšetření).



Graf 2. Počet leukocytů [10⁹/l] u pstruha duhového po expozici fluoxetinu (** značí p<0,01)

Závěr

Z uvedených výsledků vyplývá, že i nízké, environmentálně-relevantní, koncentrace testovaných látek mohou negativně ovlivnit vývoj a imunitu raných a juvenilních stádií ryb žijících v povrchových vodách České republiky.

Seznam literatury:

- 1) LAJUENESSE, A., SMYTH, S.A., BARCLAY, K., SAUVE, S., GAGNON, C., 2012. Distribution of antidepressant residues in wastewater and biosolids following different treatment processes by municipal wastewater treatment plants in Canada. *Water Research*. 46, 5600 – 5612.
- 2) CHU, S., METCALFE, C.D., 2007. Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1163, 112 – 118.
- 3) OECD 2013. Test No 236: Fish Embryo acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, France.

Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 208/2020/FVHE

Metody stanovení kortizolu ve slinách prasat a jejich využití při posuzování welfare prasat

Michaela Němečková, Petr Chloupek

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

Úvod

Úroveň welfare můžeme kromě Welfare protokolů sledovat i za pomoci měření aktivity osy hypotalamus – hypofýza – nadledviny (HPA). Působením stresu dochází ke zvýšení aktivity této osy, jejímž výsledkem je zvýšení hladiny stresových hormonů včetně kortizolu v krvi, v dalších tělních tekutinách a ve faeces (1). V důsledku zlepšování welfare došlo k vývoji neinvazivních metod odběru vzorků. Jsou vypracovány metodiky, podle nichž lze stanovit hladinu kortizolu v moči, slinách, mléce, trusu nebo srsti (2). S ohledem na minimalizování stresu při odběru vzorku, živočišný druh a technologii chovu byly jako vhodný vzorek zvoleny sliny. Mezi volným sérovým kortizolem a kortizolem ve slinách dochází k signifikantní korelaci (3).

Informací o metodách stanovení kortizolu ve slinách prasat není mnoho a v těch dostupných se autoři často rozcházejí. Cook et al. (3) prokázali maximální koncentraci kortizolu ve slinách v čase 5 minut po provedení stresové zátěže (fixace pomocí smyčky). Jiní autoři prokázali nejvyšší koncentraci kortizolu ve slinách za 4 - 5 hodin po stresu, který způsobila manipulace a přeskupení zvířat. Podobně jako u slin, i u výsledků hladiny kortizolu v krvi se čas, kdy nastala nejvyšší hladina kortizolu, u různých autorů liší. Prunier et al. (4) zaznamenali nejvyšší hladinu kortizolu v krvi 30 minut po kastraci. V dalších studiích se setkáváme s nejvyšší hladinou kortizolu v krvi v rozmezí mezi 30 a 60 minutami (5). Tento fakt je zajisté ovlivněn i tím, že ve většině případů jsou vzorky odebírány právě v časech 0, 30, 60 a 120 minut po prováděném zákroku.

Lewis (6) informuje o tom, že kortizol je v odstředěném vzorku slin statisticky stabilní po pěti dnech při 4 °C a po třech měsících skladování při - 20 °C. Pro delší skladování je žádoucí teplota - 80 °C. Většina autorů však uvádí, že vzorky byly po odběru co nejdříve zmrazeny.

Materiál a metodika

Experiment byl rozdělen do tří samostatných studií. První studie byla zaměřena na zjištění nejvyšší hladiny kortizolu ve slinách po stresové zátěži, druhá studie byla zaměřena na sledování vlivu podmínek skladování vzorku na hladinu kortizolu a třetí studie byla zaměřena na porovnání dvou typů komerčně dostupných ELISA kitů specifických pro stanovení kortizolu. Pro experiment byla zvolena prasata (*Landrace x České bílé ušlechtilé prase*) v různých věkových kategoriích vhodných pro jednotlivé

studie. Vzorky byly vždy získány výtěrem dutiny ústní prasat vatovými tampony, které byly neprodleně po výtěru centrifugovány při 14 000 otáčkách po dobu 3 minut. Získali jsme tak vzorky slin, respektive orálních tekutin. Vzorky byly po odběru zmrazeny pomocí suchého ledu o teplotě $-79,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a transportovány do mrazicího boxu, kde byly do analýzy skladovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Analýza byla provedena pomocí komerčně dostupných ELISA kitů (Cortisol EIA kit) specifických pro stanovení kortizolu ve slinách všech druhů zvířat.

Ke zjištění nejvyšší hladiny kortizolu ve slinách po stresové zátěži byla využita selata ve věku 4 dnů ± 1 den a jako stresový faktor byla využita kastrace bez znecitlivění. Směsné vzorky slin byly odebrány vždy od všech kanečků v kotci jako párové, tedy před kastrací a po ní. Vzorky po provedení kastrace byly odbírány v časových intervalech 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 a 120 minut po ukončení manipulace se zvířaty. Tento experiment byl proveden v deseti opakováních. Po laboratorní analýze vzorků byla provedena statistická analýza dat v programu UNISTAT for Excel pomocí Wilcoxonova testu.

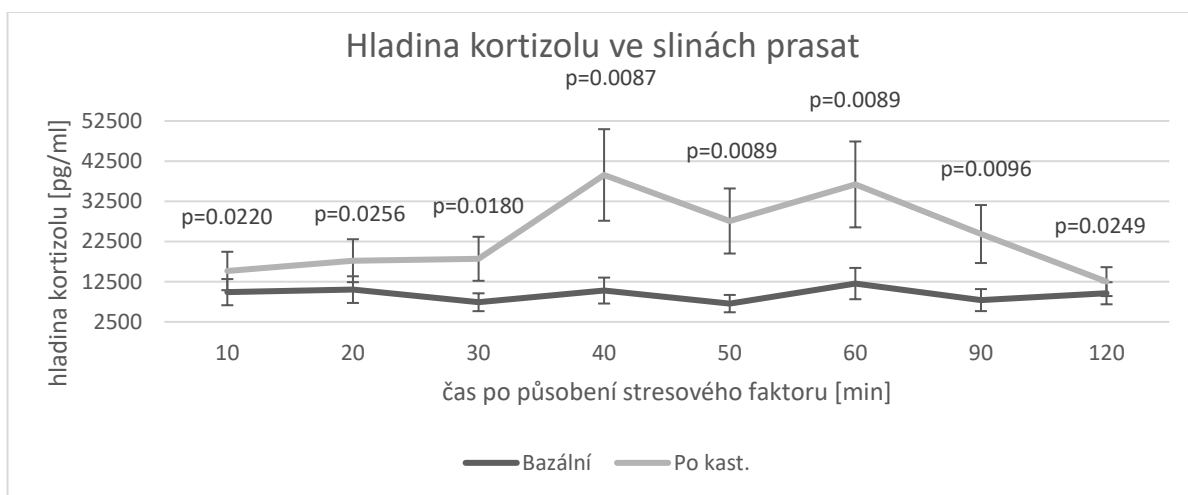
Pro sledování změn v hladině kortizolu v závislosti na podmínkách skladování byly vzorky odbírány od selat ve věku 28 ± 2 dny, přičemž vzorky byly od selat odbírány po provedení odstavu. Z jednotlivých vzorků byl vytvořen směsný vzorek, který byl po homogenizaci rozdělen na dílčí vzorky. Polovina z nich byla uložena do termobloku, který udržoval teplotu $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a druhá polovina vzorků byla uložena do lednice o teplotě $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$. Vzorky byly po skladování o délce 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 a 60 minut a dále 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 a 60 hodin zmrazeny. Tento experiment byl proveden v osmi opakováních. Po laboratorní analýze vzorků byla provedena statistická analýza dat v programu UNISTAT for Excel pomocí Wilcoxonova testu.

Pro porovnání výsledků stanovených metodou ELISA dvěma různými komerčně dostupnými kity bylo použito 15 dospělých březích prasnic. Jako stresor byla použita změna typu ustájení prasnic, ke které před porodem v chovu běžně dochází. Tyto prasnice byly přesunuty z volného skupinového ustájení do individuálních kotců, kde jsou ustájeny v porodních klecích. Individuální vzorky byly odbírány před přesunem, po přesunu a 2 hodiny po přesunu. Každý vzorek byl po odběru rozdělen na dvě poloviny a zmrazen. Následně byla jedna polovina vzorků zpracována pomocí komerčně dostupných ELISA kitů specifických pro stanovení kortizolu ve slinách (Cortisol EIA kit, který je určen pro všechny živočišné druhy, tedy ne specifický pro prasata) a u druhé poloviny byla provedena analýza pomocí komerčně dostupných ELISA kitů pro stanovení kortizolu u prasat (Pig Cortisol (COR) ELISA kit, který lze použít pro stanovení ve všech tělních tekutinách prasat, ne specificky ve slinách). Po laboratorní analýze vzorků byla provedena statistická analýza dat v programu UNISTAT for Excel pomocí stanovení korelačního koeficientu a F-testu. Dále byla tato data využita ke zjištění míry stresu, kterou u prasnic

vyvolá změna typu ustájení. Ke statistické analýze těchto dat byla použita Friedmanova dvoufaktorová analýza rozptylu.

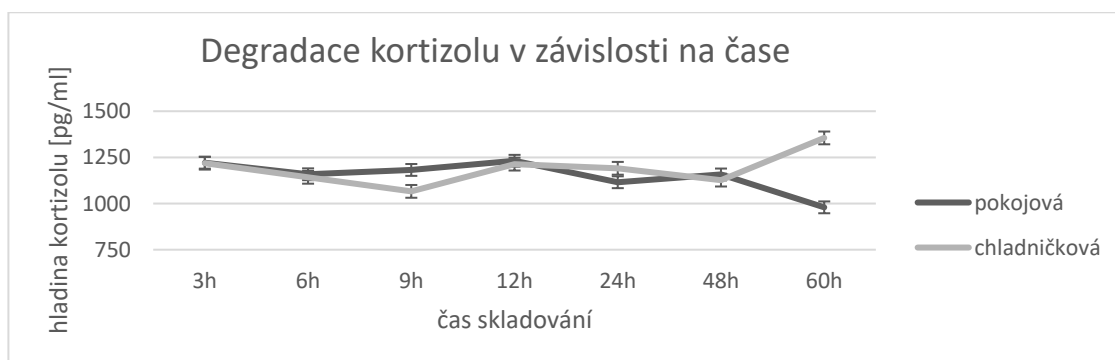
Výsledky

V první studii, jejímž cílem bylo zjistit v jakém časovém intervalu od stresové zátěže je hladina kortizolu nejvyšší, jsme prokázali statisticky nejvýznamnější rozdíl mezi hodnotami před a po kastraci v čase 40 minut po stresové zátěži (Graf 1).



Graf 1. Hladina kortizolu v jednotlivých časových intervalech po stresové zátěži

Cílem druhé studie bylo zjistit vliv podmínek skladování vzorku, konkrétně teploty a času, na změnu v hladině kortizolu ve vzorku slin. Po dobu 60 minut nebyl zjištěn statisticky významný vliv skladovací teploty na hladinu kortizolu ve vzorku. K viditelným změnám v hladině kortizolu v důsledku rozdílných skladovacích teplot dochází až po 60 hodinách skladování vzorku (Graf 2).



Graf 2. Vliv teploty a času na hladinu kortizolu ve vzorku slin

Cílem poslední studie bylo posoudit výsledky získané stanovením totožného vzorku pomocí dvou různých typů komerčně dostupných ELISA kitů. Bylo zjištěno, že výsledky stanovené pomocí kitů 1. typu (Cortisol EIA kit) a výsledky stanovené pomocí kitů 2. typu (Pig Cortisol (COR) ELISA kit) mezi sebou nekorelují a statisticky nebyla zjištěna žádná závislost mezi výslednými hodnotami získanými pomocí kitu 1. typu a kitu 2. typu. Bylo však zjištěno, že každý kit má jinou variabilitu hodnot a kit 1. typu je statisticky přesnější než kit 2. typu. Současně bylo v této studii zjištěno, že samotná manipulace a přehánění není pro prasnice nijak zásadně stresující, neboť mezi hladinami kortizolu před a po přehánění nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. Statistický významný rozdíl byl ale zjištěn mezi hladinami kortizolu před a 2 hodiny po přehánění.

Závěr

V první studii jsme zjistili, že nejvhodnější je odebírat vzorky právě 40 minut po stresové zátěži, jelikož zde můžeme posoudit skutečnou míru stresu vyvolanou konkrétním stresovým faktorem. Závěrem druhé studie je, že kortizol je ve vzorku slin stabilní minimálně po 48 hodin. Z výsledků třetí studie plyne, že pro použití v naší laboratoři je vhodnější kit 1. typu (Cortisol EIA kit), tedy kit specifický pro stanovení kortizolu ve slinách všech druhů zvířat. Můžeme tedy říct, že změna typu ustájení z volného skupinového ustájení do individuálního ustájení v porodní kleci vyvolává u prasnic před porodem určitou míru stresu.

Seznam literatury:

- 1) COOK, N. J., SCHAEFER, A. L., LEPAGE, P., MORGAN JONES, S. D. 1997. Radioimmunoassay for cortisol in pig saliva and serum. *Journal of agricultural food chemistry*. 45: 395-399.
- 2) MORMÉRDE, P., ANDANSON, S., AUPÉRIN, B., BEERDA, B., GUÉMÉNÉ, D., MALMKVIST, J., MANTECA, X., MANTEUFFEL, G., PRUNET, P., REENEN, C. G., RICHARD, S., VEISSIER, I. 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology a behaviour*. 92: 317-339.
- 3) COOK, N. J., SCHAEFER, A. L., LEPAGE, P., MORGAN JONES, S. D. 1996. Salivary vs. Serum cortisol for the assessment of adrenal activity in swine. *Canadian journal of animal science*. 76: 329-335.
- 4) PRUNIER, A., MOUNIER, A. M., HAY, M. 2005. Effects of castration, tooth resection or tail docking on plasma metabolites and stress hormones in young pigs. *American society of animal science*. 83: 216-222.
- 5) SUTHERLAND, M. A., DAVIS, B. L., BROOKS, T. A., MCGLONE, J. J. 2010. Physiology and behavior of pigs before and after castration: effect of two topical anesthetics. *Animal*. 4: 2071-2079.
- 6) LEWIS, J. G. 2006. Steroid Analysis in Saliva: An overview. *The clinical biochemist reviews*. 27: 139-146.

Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 206/2020/FVHE

Plazmidy s geny antibiotické rezistence a jejich šíření stimulované prebiotiky doplňovanými do výživy zvířat i lidí

Tomáš Nohejl^{1,2}, Kateřina Kavanová¹, Kristína Nešporová^{1,2}, Monika Dolejská^{1,2}

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

Úvod

Antibiotika jsou jedním z nejdůležitějších nástrojů moderní medicíny, která ztrácí svou moc kvůli rozvoji rezistence u bakterií. Tato studie se zaměřuje na antibiotickou rezistenci v konceptu „One Health“, jenž uznává, že zdraví lidí, zvířat a životního prostředí je vzájemně propojeno. Globální hrozbě šíření multirezistentních plazmidů mezi bakteriemi je nutné zamezit, proto znalost způsobu jejich šíření je v této problematice zásadní. Předcházející studie naznačují, že fruktooligosacharidy s krátkým řetězcem (scFOS) běžně doplňované do stravy zvířat a lidí mohou mít spojitost s šířením multirezistentních plazmidů mezi bakteriemi (1). Hlavním cílem této studie je objasnit rozšíření genů pro utilizaci fruktooligosacharidů u multirezistentních kmenů *E. coli* a stanovit tak rizika šíření těchto genů ve spojitosti s antibiotickou rezistencí v bakteriálních populacích.

Materiál a metodika

První částí této studie bylo vytvoření reprezentativní sbírky izolátů *E. coli* schopných efektivně metabolizovat scFOS. Byla vyšetřena rozsáhlá sbírka (cca 11 000 izolátů) *E. coli* rezistentních k antibiotikům pocházejících z různých zdrojů (od lidí, zvířat určených k produkci potravin, společenských zvířat a i prostředí) a oblastí (z Evropy, Severní a Jižní Ameriky, Afriky a Austrálie). Konkrétně byl proveden průkaz genu *fosT* kódující transportér fruktooligosacharidů s krátkým řetězcem za využití polymerázové řetězové reakce (PCR). V závislosti na geografickém původu a zdroji izolátu bylo vybráno více než 200 reprezentativních izolátů k následným experimentům.

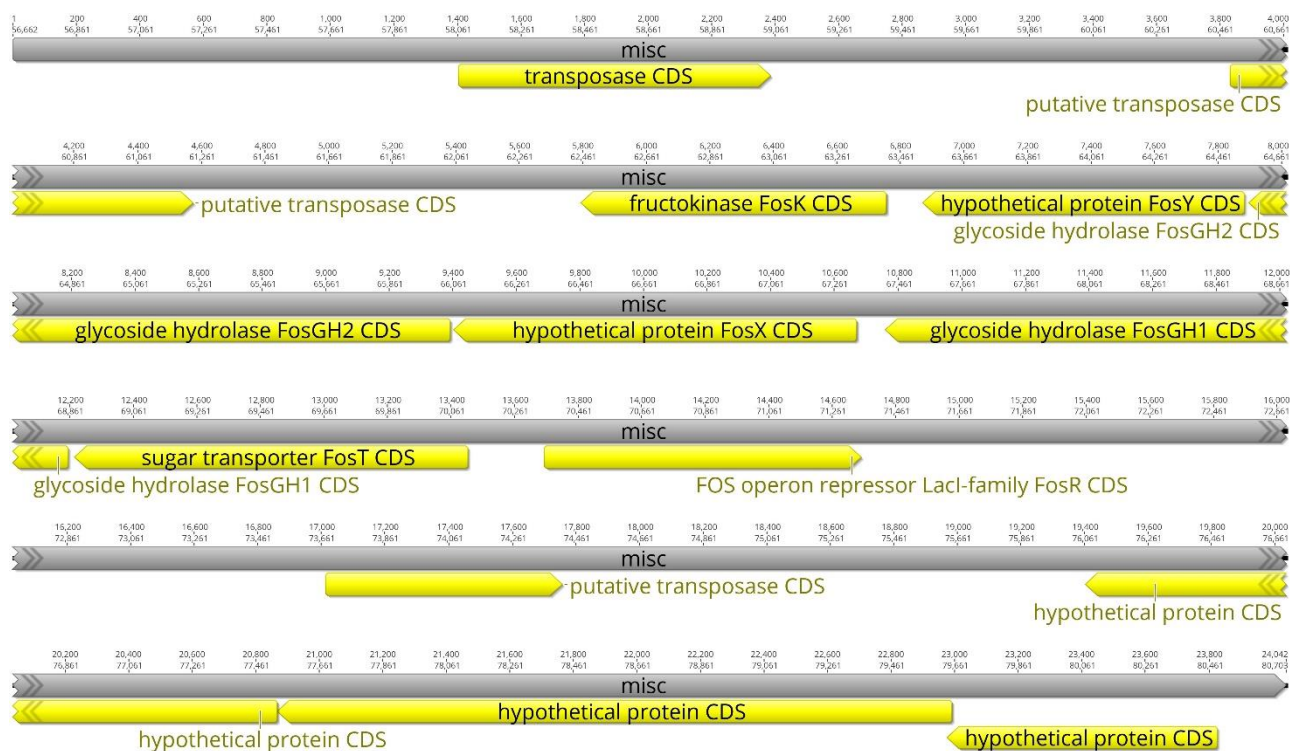
Reprezentativní izoláty s prokázaným genem *fosT* byly podrobeny testování metabolické aktivity růstem bakterií v minimálním médiu M9 s přídatkem scFOS jako jediného zdroje uhlíku. V dalším kroku byla u vybraných izolátů provedena extrakce genomové DNA, která byla podrobena celogenomovému sekvenování (WGS) na přístroji MiSeq (Illumina). Získaná data byla podrobena kvalitativní analýze (Trimmomatic) a následně bylo provedeno assembly (SPAdes). Metoda multi-locus sequence typing (MLST) přiřadila izoláty k různým sekvenčním typům neboli ST. Následně byly v těchto sekvencích pomocí nástroje ResFinder vyhledány geny antibiotické rezistence a pomocí nástroje PlasmidFinder vyhledány typy plazmidů různých inkompatibilních skupin. Získáním kompletní

sekvence jsme zjistili umístění genu *fosT* na chromozomu nebo plazmidu a určili tak možnou mobilizaci genu. Na základě genetického obsahu, původu a velikosti bylo vybráno 8 reprezentativních plazmidů pro konjugační experimenty.

Plazmidy nesoucí geny kódující rezistenci vůči antibiotikům a metabolismus scFOS byly izolovány z vybraných bakteriálních izolátů a poté přeneseny do laboratorního kmene *E. coli*. Pro zhodnocení rizika dalšího šíření plazmidů mezi bakteriemi se stanovila frekvence jejich konjugativního přenosu pomocí již zavedeného konjugačního protokolu (2). Samotná konjugace probíhala na agarovém médiu při 37 °C po dobu 1 hodiny.

Výsledky

Byla vytvořena sbírka multirezistentních izolátů převážně *E. coli* nesoucích geny pro utilizaci fruktooligosacharidů s krátkým řetězcem. Nedílnou součástí této sbírky jsou izoláty pocházející z lidí (novorozenci i klinické izoláty), ze zvířat (psi, kočky, ptactvo, ...) i z prostředí (odpadní vody, divocí ptáci, ...) z celého světa potvrzující původní záměr projektu, a to „One Health“ přístup. Přítomnost genu byla prokázána jak genotypovými testy a analýzami (PCR, WGS), tak i fenotypovým metabolickým testem růstu těchto izolátů v médiu s přidavkem scFOS jako jediného zdroje uhlíku. Metodou MLST byly izoláty přiřazeny k různým sekvenčním typům neboli ST (ST10, ST38, ST88, ST93, ST115, ST1250 a další).



Obrázek 1. Sekvence celého fos operonu včetně jeho začlenění do plazmidu pEQ1

Byla identifikována kompletní genetické informace u sbírky multirezistentních izolátů *E. coli* nesoucí geny pro utilizaci scFOS získané celogenomovým sekvenováním s následnou analýzou. Lokalizací a určením struktury daného operonu (Obrázek 1) pro metabolismus různých scFOS na bakteriálním chromozomu nebo plazmidu byla odvozena jeho spojitost s plazmidy nesoucí geny rezistence, a tak objasněna jeho možná mobilizace. Na základě výsledků z ResFinderu a PlasmidFinderu (Tabulka 1) byla zjištěna vysoká rozmanitost genů zprostředkovávající antibiotickou rezistenci (více typů beta-laktamáz, amfenikolů, sulfonamidů, fluorochinolonů, tetracyklinů a jiných) na plazmidech různých inkompatibilních skupin (IncF, IncHI1, IncHI2, IncI, IncX, IncY a dalších).

Tabulka 1. Přehled plazmidů a genů rezistence v souboru izolátů nesoucí gen *fosT*. Data získána pomocí celogenomového sekvenování s následnou bioinformatickou analýzou. Každý ze vzorků mohl nést více typů plazmidů i více genů rezistence.

Výstup PlasmidFinderu		Výstup ResFinderu		
Typ plazmidu (Inc)	Pozitivní vzorky (N = 201)	Rezistence k	Geny rezistence	Pozitivní vzorky (N = 201)
Bez plazmidu	42	Bez rezistence	-	0
IncF	117	beta-laktamovým antibiotikům	<i>bla</i> _{CMY} , <i>bla</i> _{ACT} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{HERA} , <i>bla</i> _{OKP-B} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM}	133
IncI	50	tetracyklinům	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (D)	77
IncHI1	29	sulfonamidům	<i>dfrA</i> , <i>sul</i>	70
IncB/O/K/Z	20	chinolonům	<i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>qnrB</i> , <i>qnrE</i> , <i>qnrS</i>	68
IncX1	20	aminoglykosidům	<i>aac</i> (3), <i>aadA</i> , <i>ant</i> , <i>aph</i>	61
IncX3	14	fosfomycinu	<i>fosA</i>	40
IncY	10	amfenikolům	<i>catA</i> , <i>catB</i> , <i>cmlA1</i>	21
IncHI2	5	makrolidům	<i>ere</i> (A), <i>mef</i> (B), <i>mph</i>	19
IncR	3	kolistinu	<i>mcr-9</i>	2
IncC	1	linkosamidům	<i>lnu</i> (G)	1
IncN	1			
IncQ1	1			
IncX2	1			

Závěr

Na základě konjugačních experimentů byla stanovena frekvence přenosu reprezentativních plazmidů zprostředkovávající metabolismus fruktooligosacharidů s krátkým řetězcem v kombinaci s geny pro antibiotickou rezistenci. Bylo tak určeno, že existuje riziko jejich šíření v bakteriálních populacích.

Seznam literatury:

- 1) DOLEJSKA M, et al. (2014) Complete sequences of IncHI1 plasmids carrying blaCTX-M-1 and qnrS1 in equine *Escherichia coli* provide new insights into plasmid evolution. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*; 69: 2388–2393.
- 2) WANG Y., et al. (2018) Occurrence of Highly Conjugative IncX3 Epidemic Plasmid Carrying blaNDM in Enterobacteriaceae Isolates in Geographically Widespread Areas. *Front Microbiol.* 2018;9:2272.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 214/2020/FVHE

Fitness štúdie a komparatívna genomika klinicky významných pandemicky rozšírených kmeňov

Escherichia coli

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

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

Úvod

Extraintestinálne patogénne *Escherichia coli* (ExPEC) kmene spôsobujú mnohé mimočrevné ochorenia u ľudí aj u zvierat, voči ktorým sa v humánnej aj veterinárnej medicíne využívajú najmä širokospektrálne beta-laktámy. *Escherichia coli* (*E. coli*) sekvenčného typu 131 (ST131) je klinicky významná a pandemicky rozšírená. Okrem toho disponuje rezistenciou k mnohým antibiotikám, medzi nimi aj rezistenciou k beta-laktámom, ktorá je často kódovaná génmi širokospektrálnych beta-laktamáz na plazmidoch. Plazmidy, ktoré poskytujú pre bunku výhody, predstavujú záťaž (*fitness cost*). Nedávne štúdie ukazujú, že určité úspešné línie baktérií si udržujú špecifické plazmidy aj v prostredí bez selekčného tlaku (1). Cieľom tejto štúdie je popísať a porovnať IncF plazmidy u izolátov rôzneho pôvodu, ako aj určiť vplyv týchto plazmidov na fitness prirodzeného hostiteľa *E. coli* ST131 v neselektívnych podmienkach.

Materiál a metodika

Z našej zbierky 400 ExPEC kmeňov získaných z ľudských vzoriek, ako aj zo spoločenských a divých zvierat aj prostredia, bolo na základe preliminárnych dát (2) vybraných 5 izolátov *E. coli* ST131, ktoré niesli 1 veľký IncF plazmid kódujúci ESBL gén *bla*_{CTX-M-15}.

Plasmid curing

Z divých kmeňov boli odstránené plazmidy metódou *plasmid curing* podľa prevzatého protokolu (3). Na elimináciu plazmidov bol použitý plazmidový konštrukt pMDP5_EC958 nesúci okrem génu rezistencie na chloramfenikol a citlivosti na sacharózu aj IncF replikón, ktorý slúžil na vytlačenie plazmidu z bunky na základe ich inkompatibility. Po odstránení IncF plazmidu kultiváciou na selektívnom médiu s chloramfenikolom bol z kmeňov odstránený pMDP5_EC958 na základe nestability v neselektívnom médiu. Prítomnosť plazmidov a konštrukt bola v každom kroku overená pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Do 1 bezplazmidového klonu bez mutácií z každého izolátu bol spätne vložený pôvodný plazmid slúžiaci ako kontrola.

Určenie relatívneho fitness kmeňov

U kmeňov boli zostrojené rastové krivky na základe merania rastu v neselektívnom médiu po dobu 22 hodín pri 37°C v intervaloch 10 minút pomocou prístroja Synergy HTX Microplate Reader (BioTek). Porovnávané boli divoké kmene so 4 príslušnými bezplazmidovými klonmi, ako aj so 4 bezplazmidovými klonmi so spätne vloženým plazmidom. Rastové krivky boli štatisticky vyhodnotené a boli určené základné parametre (maximálna rýchlosť rastu, maximálna optická denzita, plocha pod krivkou a *lag time*) smerodajné pre určenie relatívneho fitness porovnávaných kmeňov. Kmene boli tiež podrobené viac diskriminatívnym kompetíciám v tekutom neselektívnom médiu po dobu 22 hodín pri 37°C. V kompetícii boli vždy značené divé kmene a ich bezplazmidové klony, resp. divé kmene a ich bezplazmidové klony so spätne vloženým plazmidom. Výsledky kompetícií boli vyhodnocované pomocou prietokového cytometru NovoCyte (ACEA Biosciences) a softvéru NovoExpress V1.3 (ACEA Biosciences).

Izolácia DNA a sekvenovanie

Celogenómová DNA izolátov a ich bezplazmidových klonov určená na celogenómové sekvenovanie (WGS) pomocou krátkych čítaní bola získaná pomocou NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel). DNA knižnica bola pripravená kitom Nextera XT a sekvenovaná na platforme MiSeq (Illumina). Plazmidová DNA na sekvenovanie pomocou dlhých čítaní bola izolovaná kitom Roche Genopure Plasmid Midi Kit (Roche) a knižnica bola pripravená pomocou Rapid Barcoding Kit (Oxford Nanopore Technologies, ONT). Sekvenovanie prebehlo na prístroji MinION (ONT).

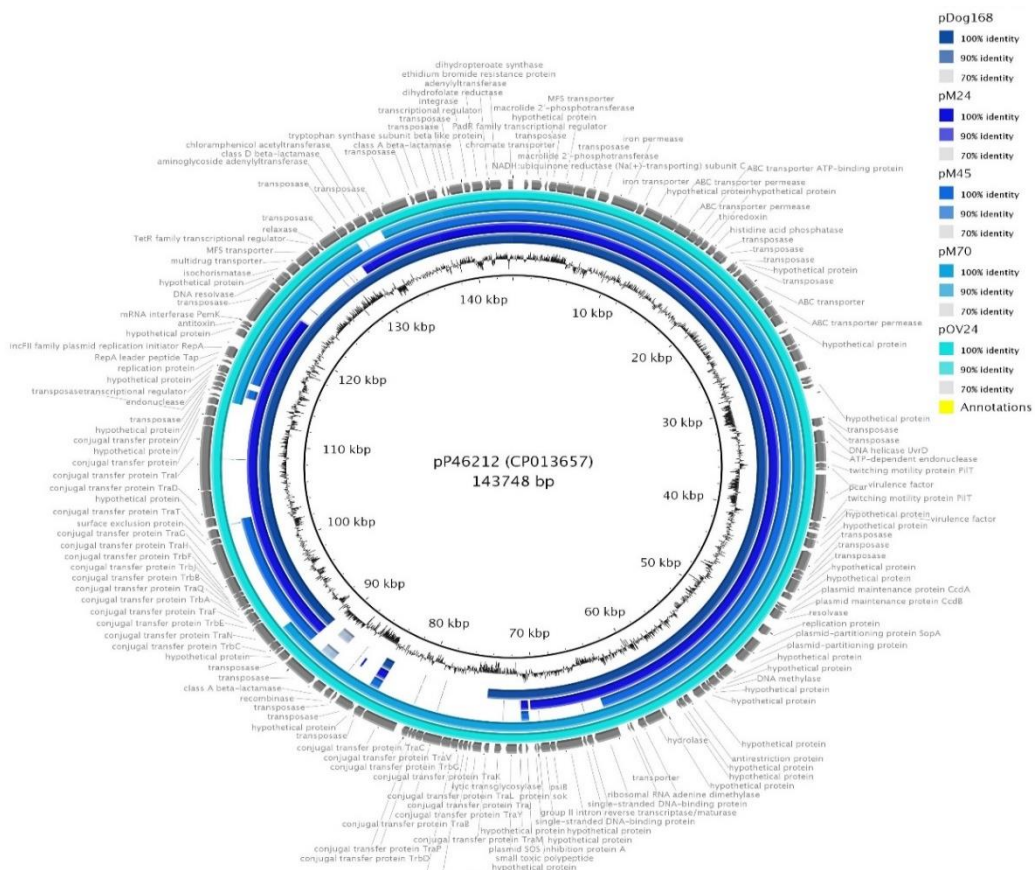
Bioinformatická analýza dát

Získané dáta boli kvalitatívne upravené programom Trimmomatic na štandard $Q \geq 30$. Plazmidové sekvencie divých kmeňov boli poskladané pomocou programu Unicycler za použitia kombinácie krátkych a dlhých čítaní. Presnosť kompletne zložených sekvencií plazmidov bola overená mapovaním presných krátkych čítaní pomocou algoritmu BWA. Zložené plazmidy boli anotované a porovnané pomocou programu BRIG s referenčnou sekvenciou vyhládanou v databáze GenBank. WGS dáta divých, bezplazmidových kmeňov aj bezplazmidových kmeňov so spätne vloženým plazmidom boli poskladané pomocou programu SPAdes. Divé kmene boli podrobené fylogenetickému analýze. Krátke čítania sekvencií bezplazmidových klonov a bezplazmidových klonov so spätne vloženým plazmidom boli namapované na príslušný divý kmeň algoritmom Bowtie2, na základe čoho sa programom Varscan určil počet jednonukleotidových mutácií (SNP) v ich chromozóme oproti príslušnému divému kmeňu.

Výsledky

Vybrané izoláty *E. coli* ST131 mali rôzny pôvod (ľudia, pes, odpadová voda), boli fylogeneticky príbuzné, ale len dva z nich tvorili klaster. Každý izolát obsahuje 1 veľký IncF plazmid o veľkosti 106-160 kb. Plazmidy sú komplexné, nesú minimálne 1 systém toxín-antitoxín (gény *hok-sok*, *pemK-pemI*), dva IncF replikóny (FAB formula F2:A1:B-) a mnohé gény rezistencie k antibiotikám. Prehľad základných dát k vybraným izolátom a plazmidom je uvedený v tabuľke 1. Všetky plazmidy sú nekonjugatívne a chýbajú im niektoré *tra* gény zodpovedné za konjugatívny prenos plazmidu. Výsledok komparácie plazmidov pomocou BRIG je vyobrazený na obrázku 1.

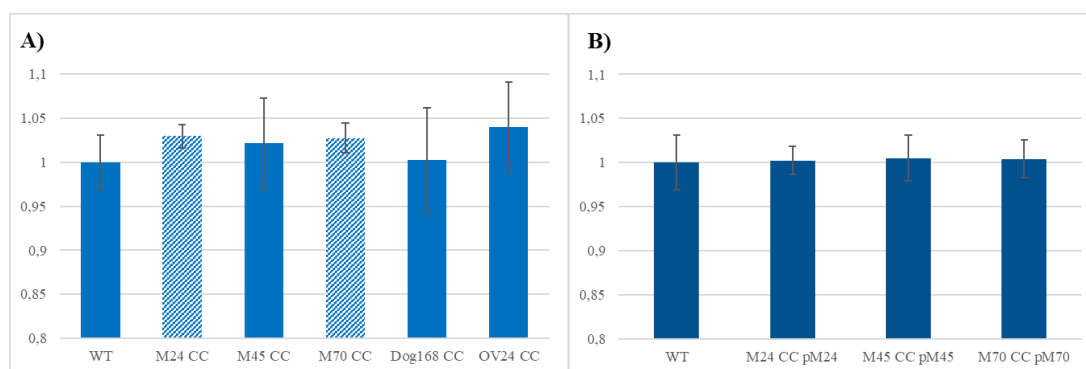
Pomocou *plasmid curing* metódy boli vytvorené bezplazmidové varianty izolátov, ktoré umožnili sledovať zmeny vo fitness *E. coli* ST131. Od každého izolátu boli vybrané aspoň 4 bezplazmidové klony. Na základe výsledkov sekvenovania a následných bioinformatických analýz týchto klonov boli vybrané také, ktoré neobsahovali žiaden SNP. Relatívny fitness príslušných bezplazmidových klonov bez SNP v porovnaní s divými kmeňmi, nezávisle od pôvodu izolátov, bol malý až nesignifikantný, rozdiely sú uvedené v tabuľke 1 a na obrázku 2. To implikuje, že IncF plazmidy pre svojho prirodzeného hostiteľa *E. coli* ST131 nepredstavujú záťaž ani v neselektívnom prostredí.



Obrázok 1. Porovnanie genetického obsahu IncF plazmidov

Tabuľka 1. Metadáta k vybraným reprezentatívnym izolátom. Relatívny fitness zvýraznený tučne bol oproti pôvodným izolátom signifikantný ($p < 0,05$). SD – smerodajná odchýlka.

Izolát	Pôvod	Veľkosť plazmidu	Beta-laktamázy	Iné gény rezistencie	Relatívny fitness (\pm SD)
OV24	Odpadová voda	160 kb	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{OXA-1}	<i>sul1</i> , <i>aadA5</i> , <i>mph(A)</i> , <i>dfrA17</i> , <i>tet(A)</i>	1,039 \pm 0,05
Dog 168	Pes	130 kb	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}	<i>sul1</i> , <i>aadA5</i> , <i>mph(A)</i> , <i>dfrA17</i> , <i>tet(A)</i>	1,003 \pm 0,06
M45	Človek	100 kb	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}	<i>sul1</i> , <i>aadA5</i> , <i>mph(A)</i> , <i>dfrA17</i> , <i>tet(A)</i>	1,021 \pm 0,05
M24	Človek	105 kb	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}	<i>sul1</i> , <i>aadA5</i> , <i>mph(A)</i> , <i>dfrA17</i>	1,029 \pm 0,01
M70	Človek	120 kb	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1}	<i>sul1</i> , <i>aadA5</i> , <i>mph(A)</i> , <i>dfrA17</i> , <i>tet(A)</i>	1,027 \pm 0,02



Obrázok 2. Porovnanie relatívneho fitness bezplazmidových klonov (A) a bezplazmidových klonov so spätne vloženým plazmidom (B) voči ich zodpovedajúcim divým kmeňom. WT – divý kmeň, CC – bezplazmidový klon. Vzorová výplň – signifikantné výsledky ($p < 0,05$)

Záver

Patogénne pandemicky rozšírené *E. coli* ST131 nesú komplexné IncF plazmidy poskytujúce mnohé výhody. Napriek tomu tieto plazmidy predstavujú len malú či dokonca nesignifikantnú záťaž aj v neselektívnom prostredí, kde neposkytujú výhodu v podobe antibiotickej rezistencie.

Zoznam literatúry:

- 1) JOHNSON, T.J., et al. Separate F-Type Plasmids Have Shaped the Evolution of the H30 Subclone of *Escherichia coli* Sequence Type 131. *mSphere*, 2016; 1(4): e00121-16.
- 2) JAMBOROVA, I., et al. Extensive Genetic Commonality among Wildlife, Wastewater, Community, and Nosocomial Isolates of *Escherichia coli* Sequence Type 131 (H30R1 and H30Rx Subclones) That Carry *bla*_{CTX-M-27} or *bla*_{CTX-M-15}. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018; pii: e00519-18.
- 3) HALE, L., et al. An efficient stress-free strategy to displace stable bacterial plasmids. *Biotechniques*, 2010; 48(3): 223-8.

Tato práca byla financovaná grantem IGA VFU Brno 215/2020/FVHE

Biomarkery stresu a oxidativního stresu ve slinách koní jako ukazatel narušení dobrého welfare

Lucie Pešková, Martin Hostovský

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

Úvod

Podmínky v chovu koní se v současné době poměrně liší od biologického základu, který je pro koně přirozený. Tyto změny přináší více či méně stresu a to například díky tréninku, závodům, přepravě, ale také již v důsledku nevhodného managementu chovu (1). Pro hodnocení projevů stresu koní jsou obvykle využívány invazivní či neinvazivní metody ze vzorků krve, faeces, moči, srsti nebo slin, pomocí behaviorálních ukazatelů, biochemických parametrů krve nebo hodnocení pomocí hormonů stresu. Volba neinvazivních metod pro hodnocení stresu je v současné době velmi žádaná, a proto je kladen důraz na rozvoj těchto neinvazivních metod. Fyziologická a behaviorální odpověď daného jedince na stres je velmi individuální, je tedy nezbytné hodnotit změny komplexně a tedy zaměřit na změny projevu chování, ale i hodnocení pomocí detailních analýz biochemických parametrů krátkodobého či dlouhodobého stresu. Stanovení biochemických parametrů krve koní je často využíváno také jako možné zhodnocení narušení psychického stavu, který nám podá souhrnný přehled o změnách v organismu. Biochemické parametry stresu u koní nejsou v současné době plně využívány, stejně tak jako hodnocení ve spojení s hormonálními změnami během stresového zatížení či bolestivých stavů (1). V současnosti se velmi rozvíjí také oblast hodnocení behaviorálních změn a etologie pomocí hodnocení výrazů tváře daného zvířete (2, 3), což se jeví jako velmi vhodné porovnání etologických změn v porovnání s fyziologií.

K narušení fyziologie organismu během stresu dochází již na úrovni poškození buněčných proteinů, lipidů a nukleových kyselin, jako následek účinků volných radikálů, které vznikají v důsledku nadměrné zátěže organismu také během stresu nebo chovem v nevhodných podmínkách. Pro zjištění míry oxidativního stresu organismu jsou běžně stanovovány koncentrace karbonylových sloučenin (CP) a míra lipoperoxidace (TBARS) a v současné době také pomocí antioxidační kapacity krevní plasmy (AOC) (4). Kromě tradičních ukazatelů stresu, jakými jsou biochemické parametry krve, se v současnosti studie zaměřují na ukazatele stresu z neinvazivních způsobů odběru biologických materiálů, jako například z moči, slin nebo faeces. V mnohých případech je jediným možným odběrem bez nadměrného stresování zvířat, právě neinvazivní, který se dá využít pro hodnocení krátkodobého i dlouhodobého stresu. Z tohoto důvodu se nyní ukazují analýzy biomarkerů ve slinách jako možný

indikátor stresu v souvislosti s bolestí (5) a změny hodnot biomarkerů ve slinách jsou porovnatelné se změnami biochemických parametrů krevní plasmy.

Cílem této první fáze komplexního projektu bylo vyhodnocení parametrů oxidativního stresu, kortizolu a vybraných biochemických parametrů slin hospitalizovaných koní s bolestivými stavy.

Materiál a metodika

Do projektu bylo zařazeno 20 koní (se souhlasem majitele v podobě informovaného souhlasu), kteří byli hospitalizováni na Klinice chorob koní VFU Brno. Nejprve bylo pořízeno video výrazů tváře dle metodiky hodnocení výrazu tváře EquiFACS. Dále proběhl neinvazivní (sliny) a invazivní (krev) odběr vzorků. Odběr slin byl proveden neinvazivně z interdentalního prostoru těsně před premoláry koně pomocí odběrového materiálu Sallivette (Salivette, Sarstedt, Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht, Germany), odběr krve byl proveden z vena jugularis do heparinizované zkumavky (Promed®) veterinárními lékaři kliniky, kteří prováděli odběr krve v rámci klinických veterinárních úkonů za účelem podpory klinické léčby, pro stanovení biochemického profilu a diagnózy. Vzorky byly následně odstředěny (10.000g/10 min) a zamrazeny při teplotě -80°C k další analýzám. Analýzy byly provedeny na Ústavu chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, FVHE, VFU Brno. Stanovení kortizolu ze slin bylo provedeno pomocí kitu Cortisol (Salivary) Human ELISA (BioVendor, Asheville, NC) s ohledem na instrukce výrobce a validace metod měření ve slinách u koní (6). Stanovení antioxidační kapacity (AOC) bylo provedeno dle metodiky Re et al. (7), běžně používanou pro plazmu, a upravena pro použití ve slinách koní. Stanovení míry lipoperoxidace ve slinách bylo pomocí upravené metodiky dle Ohkawa et al. (8) a Luschak et al. (9). Poškození proteinů z hlediska vlivu oxidativního stresu bylo hodnoceno pomocí metodiky měření karbonylových derivátů aminokyselin s DNPH (2,4-dinitrofenylhydrazin), dle metody Levine et al. (10) a Castegna et al. (11). Každý vzorek byl měřen v duplikátu. Všechny použité metody byly přizpůsobeny na mitrotitrační destičky a měřeny spektrofotometricky pomocí přístroje Varioskan™ Flash Multimode Reader (Thermo Fisher Scientific Inc.). Biochemické parametry slin (albumin, alkalická fosfatáza, amyláza, celková bílkovina, kreatinkináza, glukóza, kreatinin, laktát, triglyceridy, močovina) byly měřeny pomocí komerčních kitů (BioVendor – Laboratorní medicína a.s.) na biochemickém analyzátoru Thermo Scientific INDIKO (Thermo Fisher Scientific Inc.). Korelace sledovaných parametrů kortizolu, oxidativního stresu a biochemických parametrů byly hodnoceny pomocí statistické analýzy v programu Unistat 5. 6. for Excel.

Výsledky

Vybrané výsledky z biochemického stanovení jsou uvedeny v tabulce 1, kde jsou tučně zvýrazněny statisticky významné výsledky s pozitivní korelací (významnost $p < 0,01$) mezi testovanými parametry ve slinách koní. Zjištěné výsledky ukazují velkou míru korelace a jak je zřejmé, míra oxidativního poškození je v silné korelaci s vybranými biochemickými parametry. V případě korelace hladiny kortizolu je míra korelace nízká, avšak bude dále detailněji prozkoumána u většího množství koní. V případě parametrů neuvedených v tabulce nebyla míra korelace prokázána, avšak budou dále zahrnuty do dalších analýz a budou opětovně zkoumány. Díky těmto výsledkům bude snazší přizpůsobit následné neinvazivní odběry, následné analýzy, ale také připravit metodiku pro rozklíčování repertoáru chování spojeným se stresovým a bolestivým stavem.

Tabulka 1. Vybrané hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu pro biochemické parametry, kortizol a parametry oxidativního stresu ve slinách koní

	<i>ALB</i>	<i>CB</i>	<i>ALP</i>	<i>KREA</i>	<i>TG</i>	<i>UREA</i>	<i>CORT</i>	<i>TBARS</i>	<i>CP</i>	<i>AOC</i>
<i>ALB</i>		0,745	0,673	0,535	0,299	0,606	0,151	0,540	0,565	0,583
<i>CB</i>	0,745		0,670	0,421	0,401	0,679	0,177	0,614	0,390	0,604
<i>ALP</i>	0,673	0,670		0,459	0,228	0,723	0,383	0,331	0,1980	0,411
<i>KREA</i>	0,535	0,421	0,459		0,541	0,367	0,0100	0,640	0,655	0,634
<i>TG</i>	0,299	0,401	0,228	0,541		0,371	-0,003	0,675	0,568	0,6700
<i>UREA</i>	0,606	0,679	0,723	0,367	0,371		0,646	0,538	0,218	0,248
<i>CORT</i>	0,151	0,177	0,383	0,010	-0,003	0,648		0,237	-0,169	-0,241
<i>TBARS</i>	0,539	0,614	0,331	0,640	0,675	0,538	0,237		0,692	0,511
<i>CP</i>	0,565	0,390	0,198	0,655	0,568	0,218	-0,169	0,692		0,692
<i>AOC</i>	0,583	0,604	0,410	0,634	0,670	0,249	-0,241	0,511	0,692	

Vysvětlivky: ALB - albumin, CB - celková bílkovina, ALP - alkalická fosfatáza, AMY - amyláza, CK - kreatinínáza, GLC - glukóza, KREA - kreatinin, LAK - laktát, TG - triacylglyceroly, UREA - močovina, CORT - kortizol, TBARS - míra lipoperoxidace, CP - koncentrace karbonylovaných proteinů, AOC - celková antioxidační kapacita

Závěr

Z celkových výsledků je taktéž patrné, že možnosti využití slin koní jako biologického materiálu, může být velmi vhodnou metodou pro hodnocení stresu u koní, ale i dalších zvířat. Zvolené parametry nám ukazují velké možnosti v hodnocení stresu a welfare koní, tyto parametry nám mohou vhodně doplnit behaviorální a také další fyziologické změny, které nám pomohou lépe hodnotit welfare koní.

Seznam literatury:

- 1) AYALA, I, MARTOS NF, SILVAN G, GUTIERREZ-PANIZO C, CLAVEL JG, ILLERA JC. (2012): Cortisol, adrenocorticotropic hormone, serotonin, adrenaline and noradrenaline serum concentrations in relation to disease and stress in the horse. *Research in Veterinary Science*, 93 (1): 103-107.
- 2) WATHAN, J, BURROWS, AM, WALLER, BM, MCCOMB, K (2015): EquiFACS: The Equine Facial Action Coding System. *PLoS ONE* 10(8): p. 35.
- 3) DALLA COSTA E, PASCUZZO R, LEACH MC, DAI, F, LEBELT D, VANTINI S, et al. (2018): Can grimace scales estimate the pain status in horses and mice? A statistical approach to identify a classifier. *PLoS ONE* 13(8): p. 17.
- 4) FAZIO, F, CECCHINI, S, SAOCA, C, CAPUTO, AR, LANCELLOTTI, M, PICCIONE, G (2016): Relationship of Some Oxidative Stress Biomarkers in Jumper Horses After Regular Training Program. *Journal of Equine Veterinary Science*, 47: 20-24.
- 5) CONTRERAS-AQUILAR, MD, ESCRIBANO, D, MARTÍN-CUERVO, M, TECLES, F, CERÓN, JJ (2018): Salivary alpha-amylase activity and cortisol in horses with acute abdominal disease: a pilot study. *BMC Veterinary Research* 14: 156.
- 6) FUENTES-RUBIO, M., FUENTES, F., OTAL, J., QUILES, A., TECLES, F., CERÓN, J. J., HEVIA, M. L. 2015. Measurements of salivary alpha-amylase in horse: Comparison of 2 different assays. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*, 10(2): 122–127.
- 7) RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26 (9-10): 1231–1237.
- 8) OHKAWA, H., ORISHI, N., YAGI, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 92: 337-342.
- 9) LUSHCHAK, V.I., BAGNYUKOVA, T.V., HUSAK, V.V., LUZHNA, L.I., LUSHCHAK, O.V., STOREY, K.B., 2005. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 37: 1670–1680.
- 10) LEVINE, R.L., GARLAND, D., OLIVER, C.N., AMICI, A., CLIMENT, I., LENZ, A.G., AHN, B. SHALTIE, S., STADTMAN, E.R. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 186: 464–478.
- 11) CASTEGNA, A., THONGBOONKERD, V., KLEIN, J.B., LYNN, B., MARKESBERY, W.R., BUTTERFIELD, D.A. 2003. Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *Journal of Neurochemistry*. 85: 1394–1401.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 205/2020/FVHE

Stanovení kortizolu ve slinách koz při vybraných stresových situacích v chovu

Tereza Popelková, Zuzana Tšponová, Vladimíra Pištěková, Petra Vošmerová

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

Úvod

V chovech mléčných koz běžně nastávají nejrůznější stresové situace, které mohou narušit pohodu zvířat a se kterými se zvířata musejí vyrovnat. Koncept pohody zvířat je velmi složitý a je definován jako stav, ve kterém zvíře přežívá jako plně fyzicky a psychicky zdravý jedinec, který je schopen úspěšně se vyrovnávat s podmínkami prostředí (1, 2). Stále diskutovanou otázkou ale je, jak definovat dobré životní podmínky zvířat. Potencionálním ukazatelem dobrých životních podmínek a tím dobrého welfare zvířat je absence stresu (3). Je známo, že stres má negativní dopad nejen na růst zvířat, ale také na jejich produkci, reprodukci nebo náchylnost k nemocem (4).

Materiál a metodika

Odebírané vzorky

Celkem jsme vyšetřily 344 vzorků slin od celkového množství 100 koz plemene bílá krátkosrstá z biofarmy DoRA v Ratibořicích u Třebíče. Jedná se o extenzivní chov koz, který funguje na principech ekologického zemědělství. Jako stresové situace byly vybrány - první návštěva dojírny (strach z nového), odstav, nakládka, přeprava, zákroky prováděné člověkem (odčervení) a změna skupin (narušení sociální hierarchie). Pro první stresovou situaci - první návštěva dojírny bylo vybráno 10 koz (prvniček), kterým byly odebrány vzorky před a následně poté, co poprvé navštívily dojírnu. To samé bylo zopakováno za týden a poté za dva týdny. Pro stresovou situaci odstav bylo vybráno 8 kůzlat, kterým byly odebrány vzorky slin před odstavem a po odstavu. Pro nakládku a přepravu bylo vybráno vždy 15 kůzlat, kterým byly odebrány vzorky bazální, ihned po nakládce/přepravě a poté za 30 minut a za 1 hodinu. Stresová situace odčervení byla provedena celkem na 30 kozách - 10 kozám byly odebrány vzorky před a za 20 minut po odčervení, 10 kozám byly odebrány vzorky před a za 30 minut po odčervení a poslední skupině 10 koz byly odebrány vzorky slin před a poté za 40 minut po odčervení. Pro poslední stresovou situaci - narušení sociální hierarchie bylo vybráno 22 navzájem cizích koz. Těm byly odebrány vzorky bazální, za 1 hodinu po seskupení a poté znovu za týden a za dva týdny. Vzorky byly odebírány pomocí vatových štětiček, kterými se kozám vytřela dutina ústní. Poté byly vzorky zcentrifugovány při 1400 otáčkách po dobu 3 minut a uskladněny při teplotě - 80 °C až do analýzy.

ELISA

Pro analýzu jsme použily komerčně dostupné ELISA kity určené pro detekci kortizolu ve slinách u všech druhů zvířat. Detekční limity tohoto kitu jsou 100 – 3200 pg/ml a senzitivita je 17,3 pg/ml. Analýza proběhla dle přiloženého návodu a na závěr byla provedena kvantitativní kalorimetrická detekce kortizolu readerem Varioskan při vlnové délce 450 nm. Výsledky byly stanoveny po odečtení ze standardní křivky, která byla navržena v programu ELISA Software free. Takto získané výsledky byly statisticky zpracovány pomocí programu Unistat for Excel verze 6.5 za využití párového Studentova t-testu nebo Wilcoxonova testu a Friedmanovy analýzy rozptylu s opakovaným měřením. Rozdíly byly považovány za statisticky významné, když pravděpodobnost nulové hypotézy byla menší než 0,05 (tj. $p < 0,05$) a vysoce významné, pokud pravděpodobnost nulové hypotézy byla menší než 0,01 (tj. $p < 0,01$). Za statisticky nevýznamný výsledek byl označen výsledek, když pravděpodobnost nulové hypotézy byla větší než 0,05 (tj. $p > 0,05$).

Výsledky

Z výsledků vyplývá, že první návštěva dojírny je pro kozy stresující záležitostí, protože došlo ke statisticky významnému zvýšení hladin kortizolu ($p < 0,05$) po působení stresoru. Avšak za týden ani za dva týdny už hladiny kortizolu po návštěvě dojírny nebyly statisticky významně zvýšené ($p > 0,05$), což můžeme přikládat tomu, že si kozy na tuto situaci navykly a už jim nepůsobila stres.

Odstav kůzlat od matky je stresující, což potvrdily i hladiny kortizolu, které se po provedení odstavu statisticky významně zvýšily ($p < 0,05$). Proto je nezbytné provádět odstav postupný a kůzlata na tuto situaci navykat.

Nakládka zvířat do přepravního prostředku i samotná přeprava se rovněž ukázaly jako významné stresové faktory. Hladiny kortizolu hned po nakládce a poté i 30 minut po nakládce byly statisticky vysoce významně zvýšené ($p < 0,01$) v porovnání se vzorky bazálními. Vzorky odebrané 60 minut po nakládce už byly pouze statisticky významně zvýšené ($p < 0,05$), což znamená, že se hladiny kortizolu začaly opět snižovat a navracet k původním hodnotám. U přepravy byly hladiny kortizolu statisticky vysoce významně zvýšené ($p < 0,01$) ihned po přepravě, za 30 minut a 60 minut po přepravě.

Také odčervení jako zákrok prováděný člověkem se ukázalo být pro zvířata stresorem, ovšem statisticky významné zvýšení hladin kortizolu ($p < 0,05$) v porovnání s bazály jsme zaznamenaly pouze u vzorků odebraných za 20 minut po odčervení. U vzorků odebraných za 30 minut a 40 minut po odčervení ke statisticky významnému zvýšení hladin kortizolu v porovnání s bazály nedošlo ($p > 0,05$). Z toho můžeme usoudit, že nejvyšší hladiny kortizolu ve slinách jsou dosaženy právě 20 minut po stresové situaci.

Změny ve skupinách koz jsou pro zvířata stresující vzhledem k nastavování nové sociální hierarchie. To potvrzují i naše výsledky, kdy u vzorků odebraných za 60 minut po seskupení byly hladiny kortizolu statisticky významně zvýšené ($p < 0,05$) a stejně tak tomu bylo i po 1 týdnu od seskupení. Naopak po 2 týdnech už v hladinách kortizolu nebyly statisticky významné rozdíly ($p > 0,05$), což opět signalizuje, že už si kozy na sebe navykly a tato situace už pro ně nebyla stresující.

Tabulka 1. První návštěva dojírny - průměrné hladiny kortizolu v pg/ml a statistické vyhodnocení

	1. návštěva dojírny		po 1 týdnu		po 2 týdnech	
	BAZÁLY	PO	BAZÁLY	PO	BAZÁLY	PO
průměr	434,11	722,11	416,41	279,32	187,36	234,80
smodch	188,85	262,42	255,48	160,38	95,90	91,96
SEM	54,52	75,75	73,75	46,30	27,68	26,55
statistika	pár.t-test	0,015816	Wilcoxon	0,1934	pár.t-test	0,2089

Tabulka 2. Odstav - průměrné hladiny kortizolu v pg/ml a statistické vyhodnocení

	odstav	
	BAZÁLY	PO
průměr	237,30	350,95
smodch	130,45	85,17
SEM	41,25	26,93
statistika	Wilcoxon	0,0391

Tabulka 3. Nakládka a přeprava - průměrné hladiny kortizolu v pg/ml a statistické vyhodnocení

	nakládka				přeprava			
	BAZÁLY	0 MIN	30 MIN	60 MIN	BAZÁLY	0 MIN	30 MIN	60 MIN
průměr	223,38	691,07	862,20	573,86	501,58	889,22	863,74	938,91
smodch	112,05	512,04	833,64	654,64	162,26	277,39	338,47	470,07
SEM	28,93	132,21	215,24	169,03	41,89	71,62	87,39	121,37
statistika	F. Anova	0,0002	0,0001	0,0297	F. Anova	0,0033	0,0020	0,0033

Tabulka 4. Odčervení - průměrné hladiny kortizolu v pg/ml a statistické vyhodnocení

	odčervení - 20 min		odčervení - 30 min		odčervení - 40 min	
	BAZÁLY	PO	BAZÁLY	PO	BAZÁLY	PO
průměr	641,28	815,90	321,63	337,00	332,02	306,81
smodch	103,91	242,64	162,77	79,34	100,09	149,88
SEM	32,86	76,73	51,47	25,09	31,65	47,40
statistika	pár.t-test	0,0492	pár.t-test	0,7962	pár.t-test	0,6413

Tabulka 5. Změna skupin - průměrné hladiny kortizolu v pg/ml a statistické vyhodnocení

	změna skupin			
	BAZÁLY	1 HOD	ZA 1 TÝDEN	ZA 2 TÝDNY
průměr	273,44	440,86	426,32	315,30
smodch	239,48	173,73	128,77	169,87
SEM	51,06	37,04	27,45	36,22
statistika	F. Anova	0,0142	0,0200	0,5884

Závěr

Všechny zkoumané stresové situace v chovu koz se ukázaly být pro zvířata stresujícími, protože jsme zaznamenaly statisticky významné zvýšení hladin kortizolu ve slinách po působení stresoru v porovnání s bazálními hodnotami. I když jsou tyto situace v chovech nevyhnutelné, měli bychom se snažit je co nejvíce eliminovat, protože kromě negativního dopadu stresu na zvířata a jejich užitkovost je také stresový hormon kortizol vylučován do mléka, které konzumujeme.

Seznam literatury:

- 1) HUGHES, B. O. Behaviour as and index of welfare. Proceedings of the 5th European Poultry Conference. Malta Branch: World Poultry Science Association. 1976, s. 1005-1018.
- 2) BROOM, D. M. Indicators of poor welfare. British Veterinary Journal. 1986, vol. 142, s. 524-526.
- 3) HOFER, H.; EAST, M. L. Biological conservation and stress. Adv. Study Behav. 1998, vol. 27, s. 405-525.
- 4) KUMAR, B.; MANUJA, A.; AICH, P. Stress and its impact on farm animals. Frontiers in Bioscience. 2012, vol. E4, s. 1759-1767.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 202/2020/FVHE

Distribuce, prevalence a hostitelské druhy Snake Fungal Disease v České republice

Michal Příbyl¹, Markéta Hábová², Vojtech Baláz¹

¹Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, ²Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Plísňová onemocnění mají v současnosti stále významnější dopad na populace volně žijících zvířat. V případě plazů se do popředí dostává mykotická dermatitida hadů označovaná „snake fungal disease“ (SFD).

Původcem SFD je askomyceta *Ophidiomyces ophiodiicola*. Onemocnění se projevuje různými symptomy vždy počínaje drobnými lézemi, způsobenými proniknutím patogenu do pokožky (1). V některých státech USA byl patogen detekován na základě masivních úhynů v populacích volně žijících hadů (2). Na našem území byl původce izolován ze vzorku užovky podplamaté (*Natrix tessellata*), avšak masivní úhyny zatím nebyly sledovány (3).

Cílem práce bylo stanovení výskytu a prevalence onemocnění SFD u hadů ČR. Identifikace druhů citlivých k infekci *O. ophiodiicola* a vyhodnocení významu kožních lézí pro diagnostiku SFD. Popis rozšíření a prevalence *O. ophiodiicola* v oblasti vodní nádrže Brno a vyhodnocení významu pohlaví, tělesné kondice a polohy v rámci nádrže na pravděpodobnost výskytu positivity nebo projevů onemocnění. Součástí projektu byla také detekce *O. ophiodiicola* u hadů v soukromých chovech.

Materiál a metodika

Odběr vzorků a dat

Sběr vzorků probíhal po celou aktivní sezónu hadů od dubna do října 2020, menší část vzorků byla k dispozici z předchozího roku. Hadi byli odchyťováni přímo nebo pomocí speciálních manipulačních kleští. Pro zvýšení efektivity odchyťů jsme na území Brněnské přehrady instalovali 30 umělých úkrytů. Odběrům předcházelo získání anamnézy odchytených jedinců. Konkrétně se jednalo o stanovení tělesné délky, hmotnosti, určení věkové kategorie a pohlaví, posouzení klinických příznaků a zhotovení fotodokumentace. Stěry byly odebrány sterilními tampony vlhčenými deionizovanou vodou. Při provádění stěrů z ventrálních šupin a krypt jsme kladli důraz na vzorkování patologických lézí. Pro zlepšení detekce patogenu v prostředí jsme sbírali i exuvie hadů. Odebrané vzorky byly transportovány na silikagelu a uloženy při -20 °C. Čerstvě nalezené exuvie byly uloženy při 5 °C pro pokusy s kultivací *O. ophiodiicola*.

Zpracování vzorků

Izolace DNA byla provedena homogenizací vzorků pomocí zirkoniových kuliček a rozpuštěna v lyzačním pufru PrepMan. Získaný supernatant jsme uložili při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pro detekci patogenu jsme použili metodu kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) se specifickou sondou pro *O. ophioidiicola* cílenou na oblast ITS (4). Do samotné reakce jsme použili $10\times$ ředěné izoláty DNA, protože koncentrovaný PrepMan má částečně PCR-inhibiční účinek. Reakční směs obsahovala $5,75\text{ }\mu\text{l H}_2\text{O}$, $12,5\text{ }\mu\text{l Roche Probes Master (2}\times\text{)}$, $0,5\text{ }\mu\text{l Primer-F (20nM)}$, $0,5\text{ }\mu\text{l Primer-R(20nM)}$, $0,25\text{ }\mu\text{l SFD sondy (20nM)}$, $0,5\text{ }\mu\text{l bovinního sérového albuminu}$ a $5\text{ }\mu\text{l vzorku}$. Každý vzorek byl analyzován duplicitně. Jako pozitivní kontrola a kvantifikační standard sloužil gBlock fragment lineární dsDNA. Pro qPCR jsme použili přístroj LightCycler 480 a následující program: iniciace $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 minuty, následně 50 cyklů denaturace $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 vteřiny a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 vteřin amplifikace, s měřením fluorescence na konci každého amplifikačního kroku. Za pozitivní výsledek bylo považováno, pokud u vzorku došlo k amplifikaci v obou jamkách, amplifikační křivka měla typický sigmoidní tvar a průměrná hodnota Ct vzorku byla nad 40 cyklů. Vzorky u kterých došlo k amplifikaci, ale později než v 40 cyklu, nebo pouze v jedné ze dvou jamek, byly označeny jako „s nejasným výsledkem“ a re-analyzovány. Konfidenční intervaly prevalence byly spočítány v programu QuantitativeParasitology. Data o tělesné délce, hmotnosti, věkové kategorii, pohlaví a přítomnosti kožních lézí byly srovnány s výsledky qPCR v MS Excell. Pro identifikaci závislosti intenzity infekce a tělesné kondice jsme spočetli korelační koeficienty Ct hodnot, délky, hmotnosti a poměru hmotnosti/délky. Efekt pohlaví byl testován Chí-kvadrát testem, kdy se srovnával pozorovaný poměr pohlaví v množině SFD negativních a pozitivních hadů.

Pro kultivační pokusy jsme z qPCR pozitivně testovaných exuvií odebraly $\pm 1\text{ mm}^2$ kousky, které jsme při pokojové teplotě kultivovali na Dermatophyte Test Medium dle Taplina. Růst *O. ophioidiicola* je pomalý a je nutné selektovat ji od rychleji rostoucích plísní. Identita narostlých kolonií bude vyhodnocena qPCR a vzorky budou následně sekvenovány.

Výsledky

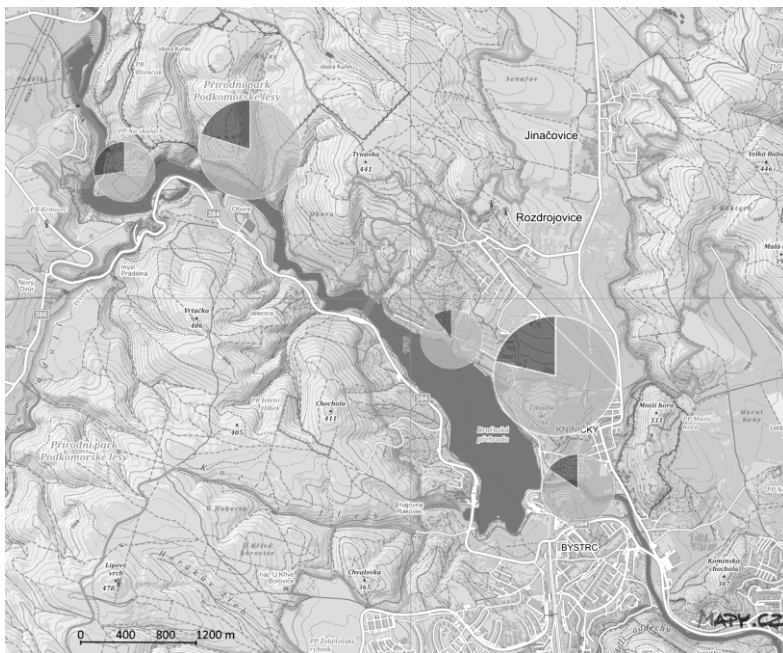
Celkově jsme získali vzorky z 308 jedinců ze všech druhů hadů žijících na našem území (*Coronella austriaca*, *Natrix natrix*, *N. tessellata*, *Vipera berus*, *Zamenis longissimus*), do analýz jsme zahrnuli také 61 exuvií. Provedli jsme pokusy kultivace *Ophidiomyces* z čerstvých exuvií. Na základě výsledků qPCR bylo identifikováno 51 pozitivních jedinců obou druhů rodu *Natrix*, u jednoho jedince *Coronella austriaca* jsme zaznamenali hraničně slabý pozitivní signál, který vyžaduje sekvenační potvrzení. Kromě Brněnské přehrady, která je hlavní studijní lokalitou, jsme původce SFD zaznamenali také

v oblasti Krušných hor u *N. natrix*. V NP Podýjí jsme *O. ophioidicola* nezaznamenali u žádné ze 17 *N. tessellata* a 2 *Zamenis longissimus*.

Tabulka 1. Přehledová tabulka výsledků qPCR analýz vzorků

Druh	počet jedinců	<i>O. ophioidicola</i> pozitivní	prevalence	95% konfidenční interval
<i>Coronella austriaca</i>	7	1	14,30%	0.70-55.4%
<i>Natrix natrix</i>	17	2	11,8%	2.14-35%
<i>Natrix tessellata</i>	271	50	18,5%	14-24%
<i>Vipera berus</i>	8	0	0	0-36,5%
<i>Zamenis longissimus</i>	5	0	0	0
Celkem	308	53		

Obrázek 1. Orientační mapa studijní lokality Brněnská přehrada. Grafy ilustrují pozorované prevalence v jednotlivých úsecích levého břehu přehrady (tmavá výseč +, světlá -).



V rámci studia populace *N. tessellata* na Brněnské přehradě jsme zaznamenali vychýlený poměr pohlaví 1,4:1 ve prospěch samců. Průměrná velikost vzorkovaných jedinců byla 592,4 mm a 76,7 g, s rozsahem min-max 170 – 980mm a 4 – 950g. Nezaznamenali jsme signifikantní rozdíly v prevalenci SFD mezi pohlavími (Chí-kvadrát test, $p = 0.971$) a intenzita infekce u pozitivních hadů nekorelovala s tělesnými rozměry (korelační koeficienty Ct s hmotností = 0,172, délkou = -0,096, poměrem hmotnost/délka = -0,156). Přítomnost kožních lézí bez dalších vyšetření není použitelná jako spolehlivý diagnostický nástroj – až 54,4 % (95% CI 41,2-66,7%) jedinců s lézemi bylo qPCR negativních, zatímco 10,3 % (95% CI 6,9-14,9 %) jedinců bez lézí bylo dle qPCR pozitivních. Jedinci bez lézí velmi často vykazovali

limitně nízké intenzity infekce – kolem Ct 40. Nezaznamenali jsme žádný úhyn s patognomickými příznaky SFD.

Závěr

Původce mykotické dermatitidy hadů, *O. ophiodiicola*, se v Česku prokazatelně vyskytuje v mnohem větším měřítku, než bylo dosud známo. Jeho rozšíření ale patrně není plošné a stále zasluhuje důkladný výzkum. Překvapivá je vysoká prevalence patogenu u populace kriticky ohrožené užovky podplamaté, *N. tessellata*, na Brněnské přehradě. V této populaci jsme pravidelně nacházeli jedince se zřetelnými lézemi, onemocnění ale pravděpodobně nezpůsobuje masovou nemocnost a mortalitu hadů, jaká byla popsána ze Severní Ameriky. Naše výsledky zároveň rozšiřují okruh druhů s prokázanou infekcí o *N.atrix* a *Coronella austriaca*.

Seznam literatury:

- 1) LORCH, J. M. et al. Experimental infection of snakes with *Ophidiomyces ophiodiicola* causes pathological changes that typify snake fungal disease. *MBio*. 2015, 6, s. 1–9.
- 2) ALLENDER, M.C. et al. *Chrysosporium* sp. infection in eastern massasauga rattlesnakes. *Emerg. Infect. Dis.*. 2011, 17, s. 2383–2384.
- 3) FRANKLINOS, L. H. V. et al. Emerging fungal pathogen *Ophidiomyces ophiodiicola* in wild European snakes. *Scientific Reports*. 2017, 7, s. 1–7.
- 4) BOHUSKI, E. et al. TaqMan real-time polymerase chain reaction for detection of *Ophidiomyces ophiodiicola*, the fungus associated with snake fungal disease. *BMC Veterinary Research*. 2015, 11(1).

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 226/2020/FVHE

Výskyt zoonotických agens u hibernujících savců v přírodních a městských cyklech

Veronika Seidlová, Monika Němcová, Kateřina Zúkalová, Tomáš Heger

Ústav ekologie a chorob zoolivřat, zvěře, ryb a včel, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Volně žijící zvířata jsou hostiteli mnoha bakteriálních patogenů a hrají tak zásadní roli v šíření některých nemocí (1), často se zoonotickým potenciálem. Jednou z nich je infekce celosvětového významu, leptospiróza, způsobená spirochetami rodu *Leptospira*. Patogenní kmeny *Leptospira* spp. mohou vstupovat do krevního řečiště, expandovat do organismu a kolonizovat ledviny hostitele z přes sliznice a odřenou nebo vlhkou pokožku (2, 3). Závažnost onemocnění pak závisí na zdravotním stavu hostitele, jeho věku či imunitní odpovědi (2).

Netopýři jako heterotermní živočichové jsou v boji proti patogenům unikátní. Schopnost udržovat metabolismus na různých hladinách intenzity včetně významných změn tělesné teploty (od 5 °C během hibernace přes 37 °C při běžné aktivitě a až po 41 °C během aktivního letu) ovlivňuje i parazitující mikroorganismy. Mnoho patogenů typických pro homiootermní živočichy není na podobné výkyvy teploty přizpůsobeno a dochází k inhibici jejich replikace (4, 5). Netopýři proto obvykle rychle překonávají akutní infekci bez viditelných příznaků. Na druhou stranu se ukazuje, že leptospiry mohou perzistovat v jejich renálních tubulech a následně mohou být dlouhodobě vylučovány močí (2, 3, 7); poměrně dlouho mohou přežívat i ve vnějším prostředí, zejména ve vodě nebo ve vlhké půdě. Netopýři přitom tradičně tvoří početné kolonie, kdy dochází k velice těsnému kontaktu mezi jednotlivci, a tím se zvyšuje riziko vzájemného přenosu patogenů (1, 8, 9). Tyto kolonie vznikají obvykle v obdobích potlačené imunity, během hibernace (5) a v období rozmnožování (5, 10). V jednotlivých koloniích tak může být vysoké procento pozitivních jedinců.

Ačkoliv jsou nejčastěji zmiňovanými nositeli a zdroji leptospirózy hlodavci (3, 6), také netopýři byli několika nedávnými studiemi (1, 10, 11) označeni za rezervoáry leptospirozy. Netopýři se objevují i v městských oblastech a může docházet ke kontaktu s domácími zvířaty a lidmi a ke kontaminaci lidských stanovišť (půda, voda, předměty) jejich močí a trusem (1, 10, 11). Netopýři tak mohou napomáhat cirkulaci leptospirózy v přírodních i městských cyklech a představovat potenciální riziko pro zdraví člověka.

Materiál a metodika

Odběr vzorků

Vzorky moči (n = 174) byly sbírány mezi lety 2014 a 2020 u netopýrů z České republiky, Polska, Arménie a Ruska. Moč byla odebírána neinvazivní metodou během spontánní mikce pomocí laboratorní pipety. Moč (10 – 550 μ l v závislosti na druhu netopýra) byla přepravována při 8 °C a před zpracováním uchována při -20 °C.

Extrakce DNA a PCR

Vzorky moči byly centrifugovány při 14 800 rpm a 4 °C po dobu 35 minut. Supernatant byl následně odstraněn a peleta byla použita pro extrakci DNA pomocí NucleoSpin[®] Microbial DNA extraction kit (Macherey-Nagel, Germany) podle pokynů výrobce. Stejným způsobem byla získána i pozitivní kontrola ze živé bakteriální kultury *Leptospira grippotyphosa* serovar P125. K identifikaci leptospir byla použita molekulárně biologická metoda PCR s celkovým objemem reakce 25 μ l: 12.5 μ l Q5[®] High-Fidelity 2X Master Mix (New England BioLabs, UK), 2 μ l nuclease free water (Bioron, Germany), 3 μ l DNA a dva páry primerů 1.25 μ l Lau01 and 1.25 μ l Lau02 (12), and 2.5 μ l LepF and 2.5 μ l LepR (13). Amplifikace probíhala s celkovým počtem 40 cyklů, které uvádí Ahmed et al. (12). Produkt amplifikační reakce byl analyzován pomocí elektroforézy na 2% agarozovém gelu při 100 V po dobu 45 minut s vizualizací pomocí barvy Serva DNA Stain G (Serva, Germany) pod UV zářením. Pozitivní PCR produkty byly enzymaticky přečištěny a komerčně sekvenovány (SEQme, Czech Republic). Jednotlivé sekvence byly porovnány s dostupnými sekvencemi a uloženy do databáze NCBI GenBank.

Statistická analýza

Pro data získána u druhu *Myotis myotis* (dostatečně početný dataset) byly testovány rozdíly v prevalenci mezi pohlavími, věkovými skupinami a jednotlivými odběrovými místy pomocí Chí-kvadrát tesu v programu Statistica for Windows[®] 13.2 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

Výsledky

Všechny vzorky moči netopýrů z Arménie (23) a Ruska (19) byly negativní. Ve vzorcích moči netopýrů z České republiky (22 %) a Polska (8,7 %) byly leptospiry detekovány (Tabulka 1).

Tabulka 1. Prevalence *Leptospira spp.*, pozitivní nálezy na jednotlivých odběrových lokalitách

Země	Lokalita	Negativní (n)	Pozitivní (n)	Celkem (n)	Prevalence (%)
Arménie	Magel cave	19	0	19	0 %
	Mine Shikakogh	4	0	4	0 %
Česká republika	Sloupsko-Šošůvské jeskyně	18	4	22	18,2 %
	Štoly Šimon a Juda	59	18	77	23,4 %
	Velká Střelničná	8	2	10	20 %
Polsko	Nietoperek	21	2	23	8,7 %
Rusko	Činětskij zakaznik	19	0	19	0 %
	Celkem	148	26	174	

Celkem 26 individuálních vzorků ze 4 netopýřích druhů (*Barbastella barbastellus* n=1, *Myotis bechsteinii* n=1, *Myotis myotis* n=23 a *Myotis nattereri* n=1) bylo pozitivní na přítomnost leptospir v moči (Tabulka 2).

Tabulka 2. *Leptospira* prevalence, pozitivní nálezy u jednotlivých testovaných druhů

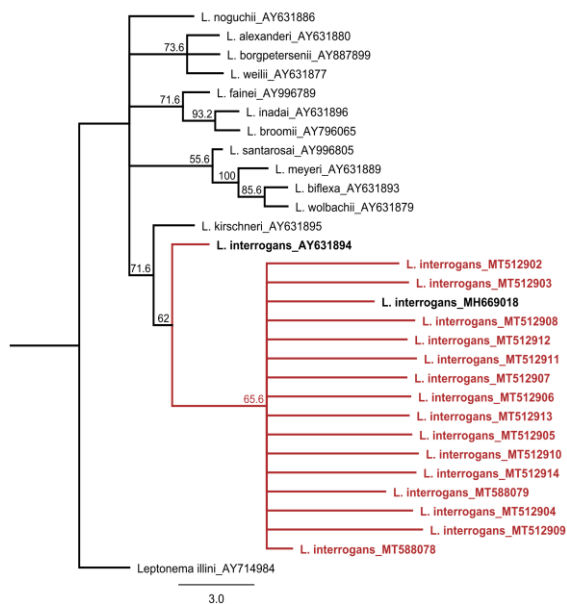
Druh	Negativní (n)	Pozitivní (n)	Celkem	Prevalence %
<i>Barbastella barbastellus</i>	4	1	5	20 %
<i>Murina hilgendorfi</i>	1	0	1	0 %
<i>Myotis bechsteinii</i>	0	1	1	100 %
<i>Myotis blythii</i>	20	0	20	0 %
<i>Myotis brandtii</i>	1	0	1	0 %
<i>Myotis daubentonii</i>	3	0	3	0 %
<i>Myotis gracilis</i>	2	0	2	0 %
<i>Myotis Myotis</i>	95	23	118	19,5 %
<i>Myotis nattereri</i>	2	1	3	33,3 %
<i>Plecotus auritus</i>	1	0	1	0 %
<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	19	0	19	0 %
Celkem	148	26	174	

Všechny sekvence získané analýzou jednotlivých pozitivních vzorků moči netopýrů byly přiřazeny k patogenní *Leptospira interrogans* (Tabulka 3, Graf 1).

Tabulka 3. Získané sekvence a jejich čísla uložená do databáze NCBI GenBank

Druh	Země	Číslo v GenBank	
		gen 16S rDNA	gen Lipl32
<i>Barbastella barbastellus</i>	PL	MT588078	NA
<i>Myotis nattereri</i>	PL	MT588079	NA
<i>Myotis myotis</i>	ČR	MT512902	MT482305
	ČR	MT512903	MT482306
	ČR	MT512904	MT482307
	ČR	MT512905	MT482308
	ČR	MT512906	MT482309
	ČR	MT512907	MT482310
	ČR	MT512908	MT482311
	ČR	MT512909	NA
	ČR	MT512910	NA
	ČR	MT512911	MT482312
	ČR	MT512912	NA
	ČR	MT512913	NA
	ČR	MT512914	NA

Graf 1. Zařazení získaných sekvencí do fylogenetického stromu



Všechny vzorky moči z netopýrů velkých (*Myotis Myotis*) z polského Nietoperku byly na přítomnost leptospir negativní, prevalence se proto u tohoto druhu netopýra mezi českými a polskými lokalitami významně lišila ($\chi^2 = 3,962$, $p = 0,047$). Prevalence na třech českých lokalitách se pohybovala od 18,2 do 23,4 % bez významných rozdílů ($p = 0,815$) (Tabulka 1). Nevýznamný rozdíl ($\chi^2 = 0,055$, $p = 0,814$) byl zaznamenán také mezi samicemi (23 %) a samci (21 %) a věkovými skupinami subadultní (26 %) vs dospělí (15 %) ($\chi^2 = 1,694$, $p = 0,429$).

Závěr

Tato studie poskytuje důkazy o přítomnosti bakterií *Leptospirra interrogans* v moči netopýrů včetně druhů (*Barbastella barbastellus*, *Myotis bechsteinii*, *M. myotis*, *M. nattereri*), u kterých doposud prokázána nebyla. Rozsah místní a druhově specifické prevalence byl 0 – 23 %; 0 – 100 %. Tato skutečnost poukazuje na roli netopýrů jako potenciálního zdroje leptospirózy; tohoto rizika by si měli být vědomy zejména osoby manipulující s netopýry a/nebo pracující v prostředí kontaminovaném močí netopýrů. Také metodika neinvazivního a neletálního odběru je pro monitoring leptospir u přísně chráněných druhů netopýrů vhodnější ve srovnání s metodami izolace leptospir z tkáně ledvin nebo průkazu protilátek v krvi. Metoda je přitom citlivá a umožňuje vyšetřit jednotlivce i na základě malého množství odebraného vzorku. Jedinou nevýhodou je, že leptospiry mohou být močí vylučování nepravidelně (10), proto může být skutečná prevalence bakterií rodu *Leptospira* v populaci vyšší, než ukazují výsledky.

Seznam literatury:

- 1) ALLOCATI, N., et al. Bat–man disease transmission: zoonotic pathogens from wildlife reservoirs to human populations. *Cell Death Discovery*, 2016, 2.1: 1-8.
- 2) FAINE, S. Factors affecting the development of the carrier state in leptospirosis. *Epidemiology & Infection*, 1962, 60.4: 427-434.
- 3) LEVETT, PN.; HAAKE, DA. *Leptospira* species (leptospirosis). *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 2010, 3059-3065.
- 4) O'SHEA, Thomas J., et al. Bat flight and zoonotic viruses. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20.5: 741.
- 5) BOUMA, Hjalmar R., et al. Hibernation: the immune system at rest? *Journal of Leukocyte Biology*, 2010, 88.4: 619-624.
- 6) THIERMANN, ALEJANDRO B. The Norway rat as a selective chronic carrier of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *Journal of Wildlife Diseases*, 1981, 17.1: 39-43
- 7) MONAHAN, Avril M., et al. Proteomic analysis of *Leptospira interrogans* shed in urine of chronically infected hosts. *Infection and immunity*, 2008, 76.11: 4952-4958.
- 8) DREXLER, Jan Felix, et al. Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerging Infectious Diseases*, 2011, 17.3: 449.
- 9) MGODE, Georgies F., et al. Seroprevalence of *Leptospira* infection in bats roosting in human settlements in Morogoro municipality in Tanzania. *Tanzania Journal of Health Research*, 2014, 16.1.

- 10) DIETRICH, Muriel, et al. Leptospira and paramyxovirus infection dynamics in a bat maternity enlightens pathogen maintenance in wildlife. *Environmental Microbiology*, 2015, 17.11: 4280-4289.
- 11) VASHI, Neelam A., et al. Bat-associated leptospirosis. *Journal of General Internal Medicine*, 2010, 25.2: 162-164.
- 12) AHMED, Siti Aminah, et al. Rapid diagnosis of leptospirosis by multiplex PCR. *The Malaysian journal of Medical Sciences: MJMS*, 2012, 19.3: 9.
- 13) MERIEN, F., et al. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992, 30.9: 2219-2224.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno IGA 221/2020/FVHE

Komparativní genomika rizikové linie *Escherichia coli* ST1250 z koní

Petra Šišmová^{1,2}, Dominika Chmelíčková¹, Adam Valček^{1,2}, Kristina Nešporová^{1,2},

Monika Dolejská^{1,2}

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

Úvod

Za původce infekčních onemocnění ve spojitosti s produkcí širokospektrých beta-laktamáz (ESBL) považujeme i čeleď *Enterobacteriaceae*, zahrnující bakteriální druh *Escherichia coli*. Kmeny *E. coli* jsou součástí běžné střevní mikroflóry, ale v určitých případech disponují-li virulenními faktory mohou vykazovat známky patogenity. Mezi rizikové linie *E. coli* u koní zahrnujeme i sekvenční typ ST1250. Výskyt ST1250 byl zaznamenán u hospitalizovaných koní nebo koní po prodělané antibiotické léčbě. Izoláty pocházely jak z České republiky, tak ze zahraničí napříč Evropou. Průkaz ESBL a genů kódujících tyto enzymy nesených plazmidy skupiny IncHI1 objasnil roli ST1250 v rozvoji antibiotické rezistence (1,2,3). Cílem práce bylo provedení komparativní genomiky izolátů ST1250 a zjištění specifických vazeb dané linie u koní.

Materiál a metodika

V rámci projektu byl analyzován soubor 79 izolátů *E. coli* ST1250 z koní z let 2008-2017. Sběrka zahrnovala jak konkrétní ST1250, tak i tzv. single (SLV) a double locus varianty (DLV) obsahující jednu popř. dvě rozdílné alely oproti kombinaci ST1250. Izoláty pocházely z České republiky (Klinika chorob koní na VFU Brno, n=19; Veterinární klinika v Heřmanově Městci, n=2 a farma Jalový dvůr, n=2) i od zahraničních spolupracovníků (z Nizozemska, n=18, Dánska, n=3, Německa, n=9 a Francie, n=1. Dalších 25 izolátů *E. coli* ST1250 včetně SLV a DLV byly získány z veřejné databáze (Enterobase, GenBank).

Profil citlivosti k 22 antibiotikům byl stanoven pomocí diskové difúzní metody dle CLSI (CLSI, 2018) a fenotyp ESBL a AmpC beta-laktamáz byl otestován využitím setu MASTDISCS™ test (D68C1 AmpC & ESBL Detection Set, Mast Diagnostics, UK). Detekce nejvýznamnějších genů rezistence k beta-laktamům (*bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*) byla provedena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a sekvenací ampliconů. Počet a velikost plazmidů se stanovila makrorestrikčním štěpením genomové DNA za využití S1 nukleázy. Schopnost horizontálního přenosu plazmidů nesoucí geny pro produkci ESBL byla otestována konjugačním experimentem.

Detailní analýza kmenů byla provedena metodou celogenomového sekvenování a poskytla informace o konkrétních úsecích genomu, které mohou být zodpovědné za specifické vazby mezi danou linií, geny rezistence, plazmidy a hostitelem. Celogenomová DNA byla izolována pomocí kitu NucleoSpin Tissue

(Macherey-Nagel). Příprava knihoven byla realizována využitím kitu Nextera XT DNA Library Preparation Kit, (Illumina). Samotné sekvenování bylo provedeno na přístroji MiSeq (Illumina). Získaná sekvenační data byla kvalitativně zpracována programem Trimmomatic v0.36. a následně assemblována do formátu fasta za využití software SPAdes v3.13.1. Pro jednotlivé parametry byly využity bioinformační nástroje ResFinder (geny antibiotické rezistence), VirulenceFinder (virulenční faktory) a PlasmidFinder (stanovení typu plazmidu). Komparativní genomika izolátů byla provedena softwarem BRIG s grafickým výstupem v podobě kruhového diagramu. Programem RAxML byla zpracována fylogenetická analýza a výsledky vizualizovány softwarem iTOL v4 (obr. 1).

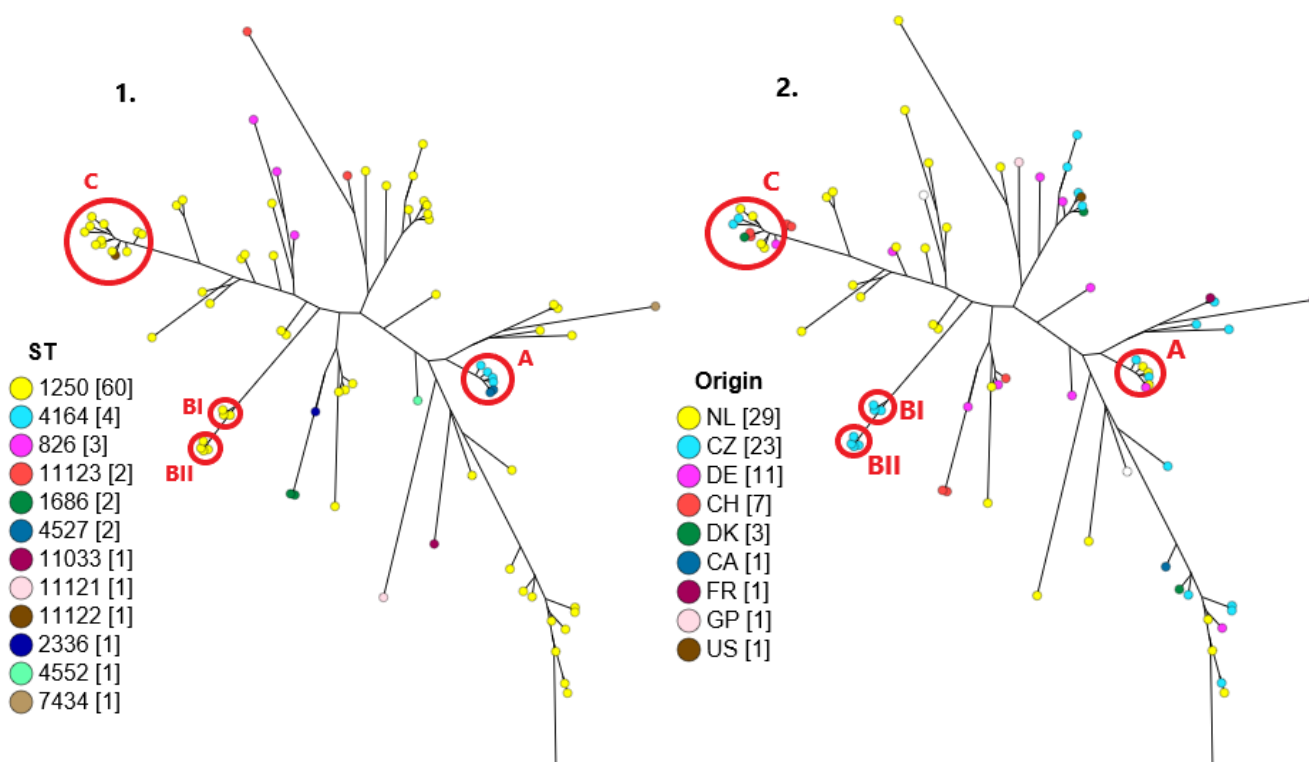
Výsledky

Projekt přinesl nové poznatky o genetické variabilitě kmene *E. coli* ST1250 včetně SLV/DLV v populaci koní z různých zemí Evropy. V rámci celogenomového sekvenování jsme určili konkrétní geny zodpovědné za rezistenci ke kriticky důležitým skupinám antibiotik, stanovili virulenční faktory a detailně charakterizovali plazmidy, které jsou jednou z možností přenosu genů antibiotické rezistence mezi bakteriemi. Na základě dat z přístroje Illumina Miseq byly izoláty osekvenovány metodou čtvrté generace s využitím technologie MinION, která nám poskytla informaci o dlouhých úsecích nukleotidů v porovnání s platformou Illumina. Zkombinováním výsledků v tzv. hybrid assembly jsme získali kompletní sekvenci plazmidu. Rozdíly v rámci jednotlivých plazmidů jsme následně detekovaly analýzou jednonukleotidových polymorfizmů (SNPs analýza).

Ve sbírce 79 izolátů byla prokázána fylogenetická podobnost (<8 SNP) pouze u 10 vzorků, ostatní izoláty se lišily v rozsahu 0-10490 SNP. Většina izolátů patřila do fyloskupiny B1 (73/79, 92,4%) a jednalo se primárně o ST1250 (60/79, 75,9%), následovanými ST1250-SLV/DLV ST4164 (4/79, 5,0%), ST826 (3/79, 3,3%), ST4527 (2/79, 2,5%), ST1686 (2/79, 2,5%) – obr. 1. Detekce *E. coli* ST1250 spolu s ST1250-SLV/DLV pozorovaná u koní ve srovnání s jinými zdroji poukázala na spojitost tohoto ST s koňmi. Ve studii provedené na nehospitalizovaných koních z Nizozemska (4) patřila nejběžnější skupina izolátů sekvenovaných v celém genomu k ST1250 (8/48, 16,7%) nebo ST1250-SLV/DLV (9/48 18,8%). Navzdory omezenému počtu veřejně dostupných sestav genomu *E. coli* ST1250 byla asociace tohoto klonu s koňmi (7/10, 70%) pozorována také v EnteroBase, kde pouze jeden z deseti ST1250 byl lidského původu, zatímco dva byli nedefinovaného původu. Mezi plazmidy dominoval výskyt IncHI1 z ST9 (56/62, 90,3%) nesoucí gen pro průkaz ESBL a ST2 (6/62, 9,7%). Vysoká prevalence konjugativního IncHI1/ST9 a jeho asociace s *bla*_{CTX-M-1} byla nedávno popsána (5) a dle výsledných dat vykazuje IncHI1/ST9 velmi dobrou adaptabilitu na *E. coli* u koní, zejména ST1250. Jednotlivé sekvence plazmidů IncHI1/ST9 byly vysoce konzervativní (> 98% podobnost) bez ohledu na zemi původu a lišily se pouze ve struktuře a integračním místě oblasti (MDR) a přítomností fos operonu. Fos operon pro využití fruktooligosacharidů s krátkým řetězcem byl detekován v 55

(55/79, 69,6%) izolátech a všechny nesly konjugativní plazmidy IncHI1/ST9. Srovnáním všech sestav konceptu genomu IncHI1/ST9 ze sekvenčních dat s krátkým čtením pomocí BRIG ukázalo, že fos operon je vysoce konzervovaný a nesený touto plazmidovou linií. Doposud byl výskyt fos operonu zjištěn pouze v probiotických, nikoli patogenních bakteriích, a to jako součást chromozomálně kódované části genomu.

Obrázek 1. Fylogenetický strom izolátů *E. coli* ST1250 a ST1250-SLV/DLV dle typu ST (1) a původu izolátů (2). Úzce příbuzné izoláty byly pozorovány pouze v podskupinách BI a BII, které se skládají z izolátů ze stejného místa odběru vzorků a ve stejném roce. U shluků A a C nebylo prokázáno žádné klonální šíření.



Testování citlivosti na antibiotika u fyzicky dostupných izolátů ($n = 54$) prokázalo rezistenci k 3 a více antibiotikům zahrnující sulfonamidy, aminoglykosidy, tetracyklin, trimetoprim a chloramfenikol. Pro průkaz ESBL byly detekovány geny *bla*_{CTX-M-1} (58/79, 73,4%), následovanými *bla*_{CTX-M-2} (6/79, 7,6%) a *bla*_{SHV-12} (7/79, 8,9%). Výsledky screeningu virulenních genů ukázaly, že některé izoláty neměly žádné faktory virulence, které by je klasifikovaly do patotypů *E. coli*, což podpořilo zjištění, že *E. coli* ST1250 a související ST jsou součástí komenzální mikrobioty u koní (4).

Závěr

Fylogenetická analýza prokázala výraznou rozmanitost izolátů kmene *E. coli* ST1250 včetně ST1250-SLV/DLV v populaci koní, což poukazuje na vysokou genetickou variabilitu tohoto klonu. Současně byla identifikována vazba této linie s epidemickou multidrogovou rezistencí plazmidové linie IncHI1/ST9 nesoucí gen *bla*_{CTX-M-1} kódující ESBL a přítomnost zmíněného fos operon pro utilizaci krátko-řetězcových fruktooligosacharidů.

Seznam literatury:

- 1) DOLEJSKÁ M. et al. Plasmids carrying *bla*_{CTX-M-1} and *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011, 66(4).
- 2) APOSTOLAKOS I. et al. Occurrence and molecular characteristics of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in faecal samples from horses in an equine clinic. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017, 72(7).
- 3) SADIKALAY S. et al. High genetic diversity of extended-spectrum β -lactamases producing *Escherichia coli* in feces of horses. *Veterinary Microbiology*. 2018, 2019.
- 4) HORDIJK, J. et al. Fecal Carriage of Extended-Spectrum- β -Lactamase/AmpC517 Producing *Escherichia coli* in Horses. *Applied and Environmental Microbiology*. 2020, 86(6).
- 5) DE LAGARDE, M. et al. Spread of multidrug resistance IncHI1 plasmids carrying ESBL gene *bla*_{CTX-M-1} and metabolism operon of prebiotic oligosaccharides in commensal *Escherichia coli* from healthy horses, France. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2020, 55(6).

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 204/2020/FVHE

Reprodukční strategie a hormony hmyzožravých netopýrů střední Evropy

Kateřina Zukalová, Veronika Seidlová, Monika Němcová, Tomáš Heger

Ústav ekologie a chorob zoovířat, zvířete, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Reprodukční strategie evropských druhů hmyzožravých netopýrů se liší od standardních strategií savců díky využívání tzv. opožděného oplodnění. Při páření, ke kterému dochází na podzim, si samice netopýrů před hibernací ukládají sperma v pohlavních cestách. K ovulaci a samotnému oplodnění vajíčka, jež jsou stimulovány hormonálně po změně tělesné teploty na konci hibernace, dochází ve střední Evropě obvykle koncem dubna.

Reprodukční fenologie netopýrů mírného pásma respektive její načasování i délka silně podléhají ekologickým a environmentálním podmínkám. Většina autorů uvádí jako nejdůležitější parametr teplotu vzduchu a množství srážek, s nimiž úzce souvisí dostupnost potravy (např. 1). Délka březosti v rámci jednoho druhu se tak může lišit v různých zeměpisných šířkách, mezi jednotlivými lety na stejné lokalitě i mezi různými jedinci v rámci jedné kolonie (např. 2). Přestože je doba březosti u některých druhů známá, výsledky jsou založeny na histologických vyšetřeních a většina prací je publikována před rokem 1980, kdy byli netopýři usmrcováni (např. 3). Z důvodu celosvětové ochrany všech druhů netopýrů a s rozvojem nových moderních diagnostických metod se otevírá prostor pro neinvazivní formy jejich výzkumu, který sice stále představuje minimální zásah do jejich života, ale neohrožuje početnost studovaných druhů ani kvalitu jejich genofondu.

Důležitou roli v plodnosti samic savců hraje tvorba a vylučování hormonů a jejich vzájemné ovlivňování. Jde o dráhu hypotalamus – hypofýza – pohlavní orgány. V různých fázích estrálního cyklu lze měřit koncentraci specifických hormonů v krvi či jiných tělních tekutinách, které jsou jejich ukazatelem (estrogeny, progesteron, folikulostimulační hormon atd.). I když se v současnosti odběr krve provádí u netopýrů relativně bezpečným způsobem (4) stále se jedná o zásah do integrity organismu. Vhodnou alternativou této metody se jeví možnost určení množství reprodukčních hormonů ze vzorků moči a trusu (5). Tato neinvazivní metoda umožňuje odběr vzorků od velkého počtu jedinců, či opakovaný odběr u stejného jedince bez rizika jeho usmrcení. Podobně moderní přenosné sonogramy umožní přesné zobrazení plodu s vysokým rozlišením, bez nutnosti převozu netopýrů do laboratoře (6). Cílem našeho výzkumu bylo určit hladiny progesteronu v krevní plasmě, trusu a moči v průběhu březosti individuální samice, které by měly odrážet různé fáze vývoje plodu potvrzené snímky ze sonogramu a dále potvrdit hypotézu, že teplota úkrytu ovlivňuje délku březosti.

Materiál a metodika

Modelové druhy

Prvním modelovým druhem byl netopýr rezavý (*Nyctalus noctula*). Při zateplování budovy polikliniky ve Velkém Týnci bylo zachráněno 29 jedinců, přičemž 7 z nich bylo okamžitě vypuštěno. 22 samic netopýra rezavého bylo nutné přijmout do veterinární péče. Jedinci byli individuálně označeni a 14. 4. 2020 umístěni do dřevěného boxu a drženi při pokojové teplotě (22 °C). Pro zkoumání závislosti délky březosti na teplotě úkrytu byl vybrán netopýr velký (*Myotis myotis*), jehož letní kolonie se nacházejí stabilně na střechách velkých budov například kostelů.

Odběr plasmy, trusu a moče a UTZ vyšetření

Krev byla odebírána samicím netopýra rezavého ve 3 termínech reprezentujících – počáteční fázi březosti (duben), kdy dochází k ovulaci a uhníždění oplodněného vajíčka, pozdní fázi březosti (květen) a dobu po porodu (červen). Odběr krve byl proveden z cévy na křídelní bláně. Místo odběru bylo vydezinfikováno, následně byly na kůži aplikovány asi 2 µl heparinu a céva byla napíchnutá sterilní jehlou. Krev byla odebrána pomocí sterilní špičky automatickou pipetou do připravené zkumavky. Po odběru byly vpichy ošetřeny tkáňovým lepidlem značky Surgibond. Plasma byla uchovávána v mrazících boxech při teplotě -20 °C a následně byla zjišťována hladina progesteronu pomocí Progesteron ELISA kitu (Enzo Life Sciences Inc.).

Trus a moč byly sbírány v pravidelných, 6-ti denních intervalech od 17. 4. – 1. 6. 2020. Trus byl pinzetou odebrán do zkumavek a uchován při pokojové teplotě. Filtrační papíry s močí byly uloženy do mrazícího boxu při -20°C.

Vyšetření sonogramem (LOGIQ V2, GE Healthcare, USA) bylo prováděno ve veterinární ordinaci v týdenních intervalech od 18. 5. – 1. 6. 2020.

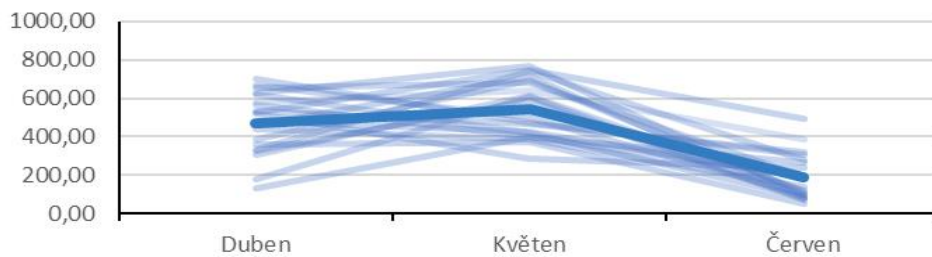
Sledování mikroklima úkrytu

Pro účely našeho výzkumu byly vybrány 2 lokality, které se liší teplotními podmínkami. Střecha kostela svatého Michala v obci Otaslavice je oplechována, dobře zaizolována a půda by měla poskytovat stabilní teplotní podmínky. Střecha kostela svatého Petra a Pavla v obci Lysice je pokryta šindelem, bez izolace a představuje tak teplotně dynamický úkryt. V období 24. 4. 2020 až 8. 6. 2020 byly na lokalitách ve 14-ti denních intervalech vizuálně kontrolovány počty jedinců a zaznamenány porody mláďat. V blízkosti každé kolonie byl také umístěn datalogger Hobo U23-001Temp/Rh, měřící teplotu a relativní vlhkost v úkrytu.

Výsledky

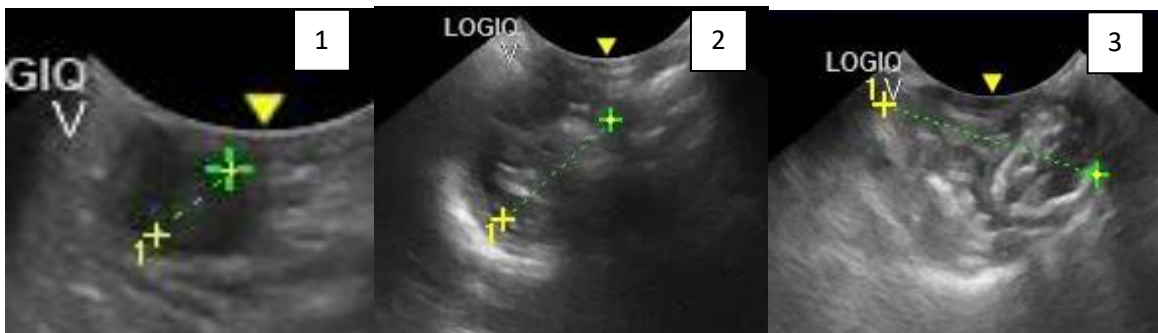
Progesteron v krevní plasmě Nyctalus noctula a vývoj plodu

Hladiny progesteronu (Graf 1) dosahují u většiny samic středních hodnot v počáteční fázi březosti, kdy dochází k ovulaci a uhníždění oplodněného vajíčka.



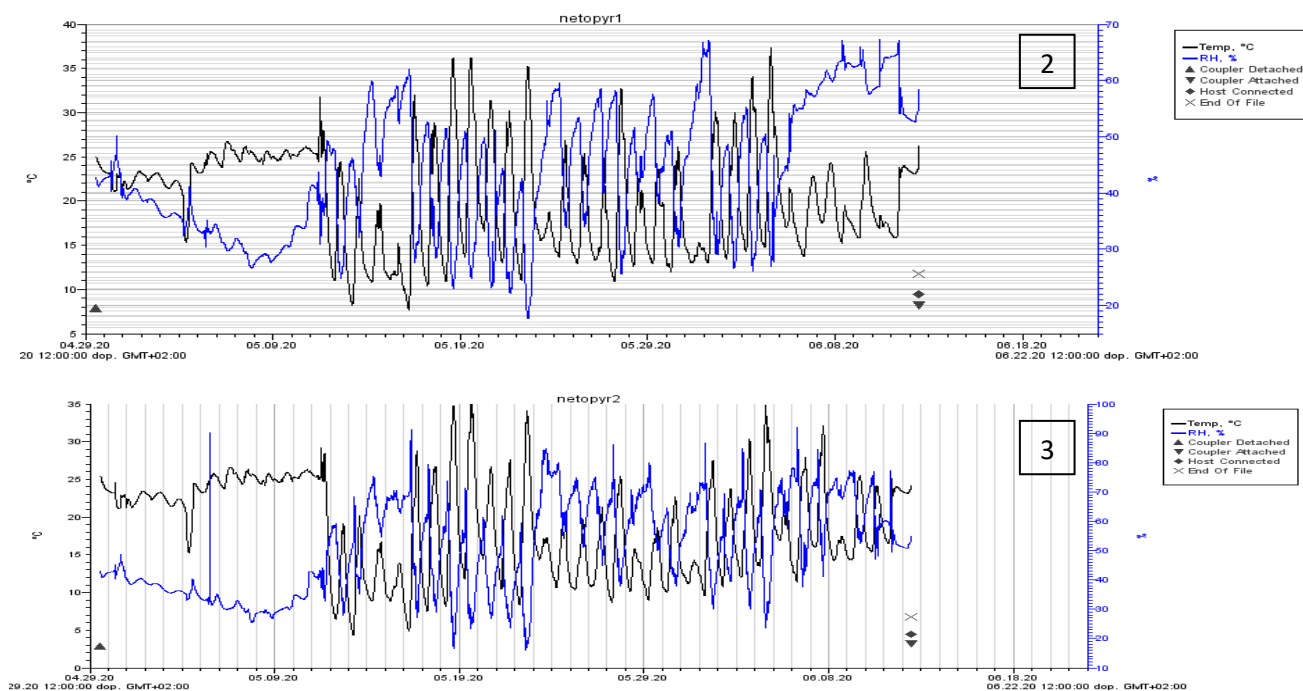
Graf 1. Koncentrace progesteronu v plasmě pg/ml

Záznamy ze sonogramu ukazují postupně se vyvíjející plod samice č. 14. Plod starý 21 dní měří 0,5 cm. Struktura je patrná jen jako tmavší váček kulovitého tvaru (Obr. 1). Plod starý 27 dní již měří 1,64 cm a začíná vykazovat klasický tvar fetu (Obr. 2). Plod starý 41 dní dosahuje délky 2,32 cm, jsou u něj již rozeznatelné základní struktury jako kraniální část s pohyblivými čelistmi, pumpující srdce, *chorda dorsalis* a osifikované antebrachium (Obr. 3). Samice porodila 7. 6. 2020 dvě mláďata. Délka březosti byla stanovena na 47 dní.



Vliv teploty úkrytu na délku březosti Myotis myotis

Na lokalitě Otaslavice 24. 4. 2020 bylo zaznamenáno cca 230 jedinců netopýra velkého, zatímco v Lysicích byli poprvé přítomni až 11. 5. 2020 v počtu cca 150 jedinců. Při jednotlivých návštěvách úkrytů, počty jedinců mírně fluktovaly. První porody, respektive první mláďata byla pozorována na kolonii Otaslavice 4. 6. 2020, zatímco v Lysicích v tuto dobu byly samice v pozdní fázi březosti bez mláďat. Mláďata v Lysicích byla poprvé pozorována 11. 6. 2020. Průměrná teplota úkrytu v Otaslavicích ve sledovaném období je 20,13 °C (min 7,72 °C, max 37,37 °C) a průměrná vlhkost 43,69 % (min 17,69 %, max 67,30 %) (Graf 2). Průměrná teplota úkrytu v Lysicích je 18,84 °C (min 4,35 °C, max 34,99 °C) a průměrná vlhkost je 50 % (min 15,98 %, max 92,08 %) (Graf 3). Průměrná teplota úkrytů se lišila o 1,29 °C a průměrná relativní vlhkost opačně o 6,31 %.



Graf 2 a 3. Záznam teploty na lokalitách Otaslavice (2) a Lysice (3)

Závěr

Progesteron je hormon udržující březost, jeho hladina s postupující březostí roste, zatímco po porodu prudce klesá. Změřené hladiny progesteronu dosahují u většiny samic středních hodnot v počáteční fázi březosti, kdy dochází k ovulaci a uhníždění oplodněného vajíčka. Kombinace nižší teploty a vyšší relativní vlhkosti znamená energeticky náročnější prostředí v úkrytu na kostele v Lysicích, což vedlo k tomu, že samice zde rodily o 7 dní později. Výsledky výzkumu tedy potvrzují, že mikroklimatické podmínky úkrytu významně ovlivňují délku březosti u evropských hmyzožravých netopýřů.

Seznam literatury:

- 1) RACEY P.A. Diagnosis of pregnancy and experimental extension of gestation in the pipistrelle bat, *Pipistrellus pipistrellus*. Journal of Reproductive and Fertility 1969, 19, 465-474.
- 2) LUČAN R.K. et al. Contrasting effects of climate change on the timing of reproduction and reproductive success of a temperate insectivorous bat. Journal of Zoology. 2013 290, 151-159.
- 3) WIMSATT W.A. Some Comparative Aspects of Implantation. Biology of Reproduction 1975, 12, 1-40.
- 4) BANDŮCHOVÁ H. et al. Alterations in the health of hibernating bats under pathogen pressure. Scientific Reports. 2018, 8, 6067.
- 5) VOIGHT CH. C. and F. Schwarzenberger. Reproductive endocrinology of a small tropical bat (female *Saccopteryx bilineata*; *Emballonuridae*) monitored by fecal hormone metabolites. Journal of Mammalogy. 2008, 89(1):50-57.
- 6) SILVA E.G. et al. Diagnóstico de gestação em fêmea de *Desmodus rotundus* (Geoffroy, 1810) (Mammalia: Chiroptera) através da ultrassonografia – Relato de caso. Medicina Veterinária. 2011, 5(4): 288-291.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 209/2020/FVHE

Editovali:	doc. MVDr. Petr Chloupek, Ph.D. prof. MVDr. Alois Čížek, CSc. doc. MVDr. Miša Škorič, Ph.D. prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D., Dipl. ECZM prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D.
Název:	Konference Interní grantové agentury VFU Brno
Počet stran:	120
Vydání:	První
Vydavatel:	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno 2020

ISBN 978-80-7305-848-7