

VETERINÁRNÍ UNIVERZITA BRNO

---

FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE  
Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie  
Oborová rada pro hygienu a technologii potravin

a

Koordinační místo pro vědeckou a technickou spolupráci s EFSA v ČR,  
Ministerstvo zemědělství

a

Časopis MASO – odborný časopis pro obor zpracování masa

## XXIV. KONFERENCE MLADÝCH VĚDECKÝCH PRACOVNÍKŮ S MEZINÁRODNÍ ÚČASTÍ

Sborník příspěvků

VFU Brno, 1. 6. 2022



---

Brno 2022

Elektronický sborník byl vydán 1. 6. 2022

Editace: prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D.  
doc. MVDr. Bohumíra Janštová, Ph.D.  
doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.  
Mgr. Alena Skočková, Ph.D.

ISBN 978-80-7305-869-2

Za věcnou a jazykovou správnost příspěvků odpovídají jejich autoři.

KNOWLEDGE  
JUNCTION

Bezpečnost  
potravin  
a krmiv

# OTEVŘENÁ DATA

## PRO TRANSPARENTNÍ HODNOCENÍ RIZIK

Najdete na [www.zenodo.org](http://www.zenodo.org)



VYHLEDÁVEJTE



STUJTE



OBJEVUJTE



PREZENTUJTE

DATA · OBRÁZKY · VIDEA · LABORATORNÍ VÝSTUPY · SOFTWARE · NÁSTROJE  
MODELY · PROTOKOLY A SYSTÉMY POSUZOVÁNÍ KVALITY



Koordináční místo pro vědeckou a technickou spolupráci s EFSA  
E-mail: [efsa.focalpoint@mze.cz](mailto:efsa.focalpoint@mze.cz) Web: [www.bezpecnostpotravin.cz](http://www.bezpecnostpotravin.cz)



## OBSAH

### SEKCE 1: HYGIENA A TECHNOLOGIE POTRAVIN

<b>Srovnání vybraných jednodruhových medů z pohledu obsahu bioaktivních látek</b> Ljasovská, S., Pospiech, M., Javůrková, Z., Hostovský, M. ....	5
<b>Zhodnocení vlivu přídatku oleje a nanoemulze z kávové sedliny na antioxidační vlastnosti, obsah flavonoidů a texturální vlastnosti 3D tištěných čokoládových objektů</b> Těšíková, K., Zemancová, J., Babincová, K., Dordevic, D., Tremlová, B. ....	8
<b>Edible/biodegradable packaging with the addition of Beluga lentils powder: antioxidant activity properties</b> Dordević, S., Dordević, D., Budina, A., Zemancová, J., Babincová, K., Tremlova, B. ....	11
<b>Glycemic index of breads made with edible insect</b> Pečová, M., Zielińska, E. ....	14
<b>Využití Ramanovy spektroskopie k porovnání jednodruhových květových medů</b> Pleva, B., Pečová, M., Čaloudová, J., Pospiech, M. ....	18
<b>Vliv použitého syřidla na senzorké parametry čerstvých sýrů</b> Vávrová, R., Jarošová, A., Saláková, A. ....	22
<b>Ready-to-eat foods as a possible source of <i>H. pylori</i> infection for human</b> Furmančíková, P., Šťásková, Z., Navrátilová, P., Bednářová, I., Steinhauserová, I. ....	25

### SEKCE 2: CHOV ZVÍŘAT, VÝŽIVA ZVÍŘAT A BIOCHEMIE

<b>The Effectiveness of a Husked White Lupine Seed Meal Based Diet on the Production Indicators of Ducks During the Fattening Period</b> Kutlvašr, M., Straková, E., Suchý, P. ....	29
<b>Aktivita glutathion peroxidázy v plné krvi klinicky zdravých psů - pilotní studie</b> Zentrichová, V., Pechová, A. ....	33

### SEKCE 3: OCHRANA ZVÍŘAT, WELFARE A ETOLOGIE

<b>Analýza výsledků kontrolní činnosti Státní veterinární správy na hospodářstvích v letech 2016 – 2020</b> Švestková, M. ....	37
<b>Poškození jater zjištěná na jatkách a welfare zvířat</b> Válková, L., Voslářová, E., Večerek, V. ....	41

<b>Infračervená termografia ako nástroj na hodnotenie akútneho stresu u prasiat (<i>Sus scrofa f. domestica</i>)</b>	
Kotianová, L., Lukešová, G., Voslářová, E., Večerek, V. ....	44
<b>Mortality rates in pre-weaned and post-weaned juvenile European hedgehogs (<i>Erinaceus europaeus</i>) admitted to rescue centres in the Czech Republic</b>	
Lukešová, G., Voslářová, E., Večerek, V. ....	47
<b>SEKCE 4: VEŘEJNÉ A SOUDNÍ VETERINÁŘSTVÍ A TOXIKOLOGIE</b>	
<b>Stanovení hypoglycinu A ve vzorcích rostlin rodu <i>Acer</i></b>	
Novotná, T., Kabešová, M., Pospíšilová, S., Maršálek, P. ....	51
<b>Microplastics and flame-retardants in oral ingestion: The emerging risk to freshwater organisms</b>	
Hollerová, A., Hodkovicová, N., Blahová, J., Mikula, P., Medková, D., Faldyna, M., Mareš, J., Svobodová, Z. ....	54
<b>Residues of drugs used to treat diseases of affluence and their effects on zebrafish embryos (<i>Danio rerio</i>)</b>	
Medkova, D., Lakdawala, P., Hollerova, A., Blahova, J., Postulkova, E., Svobodova, Z. ....	57
<b>SEKCE 5: VETERINÁRNÍ EKOLOGIE A CHOROBY VOLNĚ ŽIJÍCÍCH ZVÍŘAT</b>	
<b>Netopýři jako rezervoár zoonotických patogenů</b>	
Bednaříková, Š., Seidlová, V., Němcová, M., Balážová, A., Sedláčková, J., Zukal, J., Pikula, J. ....	61
<b>Detekce trypanosom v krvi zajíců polních (<i>Lepus europaeus</i>) z České republiky</b>	
Veitová, L., Kalocsányiová, V., Bandouchová, H., Heger, T., Lesiczka, P. M., Linhart, P., Piaček, V., Sedláčková, J., Pikula, J. ....	65
<b>Genetic diversity of Lake Sinai Virus in the Czech Republic</b>	
Čukanová, E., Moutelíková, R., Prodělalová, J. ....	68
<b>Insight in a behaviour of Central European Red Kites wintering in Italy</b>	
Dostál, M., Škrábal, J., Raab, R., Caldarella, M., Literák, I. ....	71
<b>History, dispersal and habitat selection in Central European Caspian gulls <i>Larus cachinnans</i></b>	
Krejčí, Š., Chytil, J., Rozsypalová, L., Literák, I. ....	74
<b>Detekce trypanosom v krevních vzorcích drobných hlodavců</b>	
Kalocsányiová, V., Veitová, L., Balážová, A., Baláž, V., Linhart, P., Bandouchová, H. ....	77
<b>Prevalencia endoparazitov tráviaceho traktu psovitéch šeliem na území Slovenskej a Českej republiky</b>	
Adam, Š., Piaček, V., Bednaříková, Š., Němcová, M., Zukalová, K., Pikula, J. ....	80

**Novel opportunity for adaptation of antibiotic resistant bacteria? Plasmids harbouring genes encoding the prebiotic utilization**

Nohejl, T., Palkovicova, J., Valček, A., Dolejská, M. .... 83

**Sperm variability in temperate bat species**

Zukalová, K., Piaček, V., Bednaříková, Š., Otčenášková, T., Stopka, P., Pikula, J., Seidlová, V., Zukal, J. .... 86

# **SEKCE 1**

## **Hygiena a technologie potravin**

## Comparison of selected monofloral honeys in terms of bioactive compounds

<sup>1</sup> Ljasovská, S., <sup>1</sup> Pospiech, M., <sup>1</sup> Javůrková, Z., <sup>1</sup> Hostovský, M.

<sup>1</sup> Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno

### Summary

Monofloral honeys are very popular with consumers because of their specificity. The bioactive content of these honeys may be influenced by the pollen grains of the dominant botanical species. In this work, selected monofloral honeys from the 2020 season collected directly from hobby beekeepers are evaluated for total polyphenols and antioxidant activity. The antioxidant activity was evaluated for honey of dominant species *Brassica sp.*, *Trifolium sp.*, *Robinia sp.* and *Tilia sp.* A statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) for ABTS method was found between the *Tilia sp.* and *Robinia sp.* groups, the *Trifolium sp.* and *Robinia sp.* groups, the *Brassica sp.* and *Robinia sp.* groups and also between the *Tilia sp.* and *Brassica sp.* groups. A statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) for DPPH method was found between the *Trifolium sp.* and *Robinia sp.* groups, the *Brassica sp.* and *Robinia sp.* groups, the *Trifolium sp.* and the *Tilia sp.* groups and also between the *Tilia sp.* and *Brassica sp.* groups. For the total polyphenol content, a statistically significant difference was found only in the group *Robinia sp.* and *Trifolium sp.*

**Key words:** pollen, total polyphenols, ABTS, DPPH

### Introduction

Honey is one of the most popular natural sweeteners. Every honey contains pollen grains. If there are sufficient pollen grains of a particular botanical taxon in the honey, it is called a monofloral honey. These honeys may be labelled with an attribute, just according to the pollen of the dominant botanical species. Monofloral honeys are popular due to their characteristic properties. Honey contains many specific components, known as antioxidants (Aljadi *et al.*, 2004). In the past, there has been an increasing interest in bioactive compounds of honey. Some previous studies have shown that the antioxidant activity of honey can be affected by the floral source (Beretta *et al.*, 2005, Chen *et al.*, 2000; Frankel *et al.*, 1998).

The aim of this work was to compare selected groups of monofloral honeys in terms of the content of bioactive compounds, especially antioxidant activity and total polyphenol content.

### Materials and methods

Honey was obtained directly from the beekeepers. Samples were stored at room temperature. For the measurements, the samples were diluted with water and each sample was measured four times.

The Folin-Ciocalteu spectrophotometric method was used for the determination of total polyphenol content, based on the study of Zhang *et al.* (2006). The antioxidant activity was determined by the ABTS method according to Re *et al.* (1999) spectrophotometrically and also by the DPPH method, according to Frankel *et al.* (1998). All methods were adapted to 96-well microplates and measurements were performed using a Varioskan™ Flash Multimode Reader spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

The results were evaluated using Unistat 6.0 (Unistat Ltd., GB).



## Results and discussion

The antioxidant activity shows the capacity of the sample to eliminate free radicals. In honey, the antioxidant activity and the polyphenol content are influenced by the botanical location from which the honey originates (Khalil *et al.*, 2010). Honeys from different floral origin show variability of bioactive compounds, color, flavour and aroma (Bertoncelj, *et al.*, 2007). In Fig. 1 it can be seen that the highest values of antioxidant activity in the ABTS method were achieved by the honeys of the *Tilia sp.* group (1,66 mmol Trolox/ kg honey), while in the DPPH method (Fig. 2) the highest values were achieved by the honeys of the *Trifolium sp.* group (0,11 mmol Trolox/ kg honey). In total polyphenols, the highest values were achieved by the *Robinia sp.* group (0,46 mg GA/ kg honey).

A statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) for ABTS method was found between the *Tilia sp.* and *Robinia sp.* groups, the *Trifolium sp.* and *Robinia sp.* groups, the *Brassica sp.* and *Robinia sp.* groups and also between the *Tilia sp.* and *Brassica sp.* groups. A statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) for DPPH method was found between the *Trifolium sp.* and *Robinia sp.* groups, the *Brassica sp.* and *Robinia sp.* groups, the *Trifolium sp.* and the *Tilia sp.* groups and also between the *Tilia sp.* and *Brassica sp.* groups. For the total polyphenol content, a statistically significant difference was found only in the group *Robinia sp.* and *Trifolium sp.* Lower antioxidant activity can be observed in the *Robinia sp.* group. This group is characterized by a lower amount of pollen grains in honey, Cianciosi (2018) associates the antioxidant activity with the amount of pollen. Higher values of antioxidant activity in *Trifolium sp.* honey are also confirmed in a study by Özcan (2014).

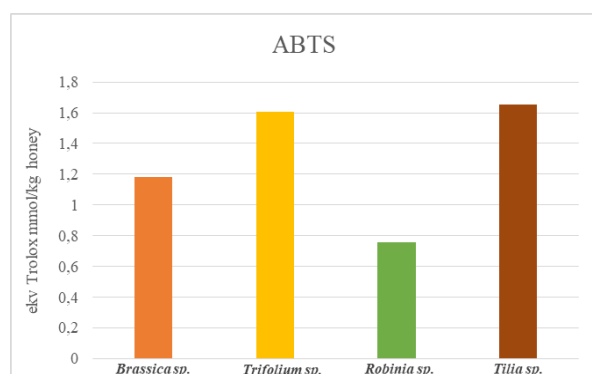


Fig. 1: groups by ABTS

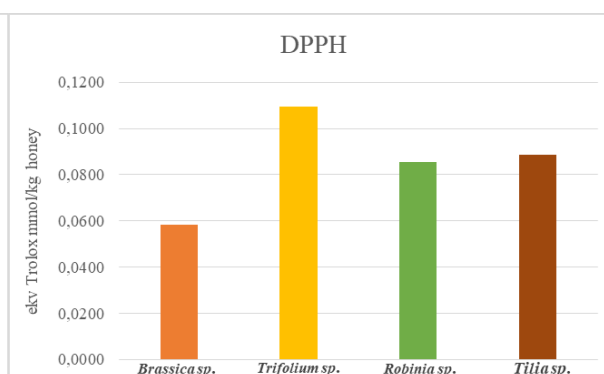


Fig. 2: groups by DPPH

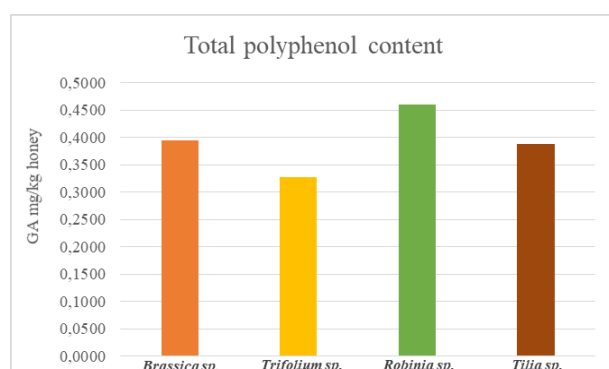


Fig. 3: groups by TPC

## Conclusion

In this work, groups of selected monofloral honeys were compared in terms of their antioxidant activity and total polyphenol content. The antioxidant activity and polyphenol content of dominant species *Brassica sp.*, *Trifolium sp.*, *Robinia sp.* and *Tilia sp.* were evaluated. A statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) for ABTS and DPPH method was found between almost all groups of monofloral honeys. In total polyphenol content, only the *Robinia sp.* and *Trifolium sp.* groups was statistically significant. It can be concluded that bioactive substances other than polyphenols, i.e. important enzymes such catalase or ascorbic acid, may cause higher antioxidant activity.

## Acknowledgements

This research was funded by Applied Research Programme of the Ministry of Agriculture for the 2017–2025 period, number QK1920344.

## References

- ALJADI, A. M.; KAMARUDDIN, M. Y. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food chemistry*, 2004, 85.4: 513-518.
- BERETTA, Giangiacomo, et al. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 533.2: 185-191.
- BERTONCELJ, Jasna, et al. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 2007, 105.2: 822-828.
- CIANCIOSI, Danila, et al. Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. *Molecules*, 2018, 23.9: 2322.
- FRANKEL, S.; ROBINSON, G. E.; BERENBAUM, M. R. Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apicultural Research*, 1998, 37.1: 27-31.
- CHEN, Lei, et al. Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48.10: 4997-5000.
- ÖZCAN, Mehmet Musa; ÖLMEZ, Çiler. Some qualitative properties of different monofloral honeys. *Food Chemistry*, 2014, 163: 212-218.
- RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 1999 26: 1231-1237.
- ZHANG, Qing, et al. A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *Journal of applied phycology*, 2006, 18.3: 445-450.

**Contact adress:** Mgr. Simona Ljasovská, Department of Plant Origin Food Science, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Palackeho tr. 1946/1, 612 42 Brno. Email: [ljasovskas@vfu.cz](mailto:ljasovskas@vfu.cz)

## Zhodnocení vlivu přidavku oleje a nanoemulze z kávové sedliny na antioxidační vlastnosti, obsah flavonoidů a texturální vlastnosti 3D tištěných čokoládových objektů

### Evaluation of the effect of the addition of oil and nanoemulsion from coffee grounds on the antioxidant properties, flavonoid content and textural properties of 3D printed chocolate objects

<sup>1</sup>Karolína Těšíková, <sup>1</sup>Johana Zemancová, <sup>1</sup>Kristina Babincová, <sup>1</sup>Dani Dordevic, <sup>1</sup>Bohuslava Tremlová

<sup>1</sup>Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu  
Fakulta veterinární hygieny a ekologie, VETUNI, Palackého tř.1946/1, 612 42 Brno

#### Summary

*The aim of this study was to evaluate the antioxidant activity, flavonoid content and textural properties of chocolate objects with the addition of oil and nanoemulsion (O / W) from coffee grounds prepared by 3D printing. The antioxidant activity of the samples was determined by the ABTS method. It was found that in most samples, after the addition of coffee grounds oil and nanoemulsion, there was a slight increase in antioxidant activities and at the same time a decrease in flavonoid content. There was also an increase in the hardness of most chocolate 3D objects after the addition of oil and especially after the addition of nanoemulsion. 3D printing is a dynamically expanding technology that finds application in many sectors. In the food sector, its popularity is growing, especially in the confectionery industry. The results of this work can contribute to the knowledge of the development of chocolate matrices for food 3D printing and the possibilities of using coffee grounds oil.*

**Keywords:** 3D food printing; coffee grounds, oil; nanoemulsion; antioxidant properties; textural properties

#### Úvod

Aplikace 3D tisku v potravinářství poskytuje možnosti výroby inovativních produktů. Tato technologie umožňuje přípravu 3D objektů a jedinečným tvarem a/nebo nutričním složením. V současnosti existuje řada potravinářských materiálů, které byly použity pro 3D tisk. Jedním z nejprostudovanějších materiálů je čokoláda, která nachází uplatnění zejména v cukrářství. Čokoláda je považována za ideální materiál, a to díky své schopnosti být vytlačena z extrudéru a následném tuhnutí, tak aby zachovala požadovaný tvar (Kim et al., 2022). Vedle tisknutelných vlastností je čokoláda výborným zdrojem fenolických a bioaktivních látek, které mohou mít vliv na zmírnění oxidativního stresu, prevenci kardiovaskulárních onemocnění apod. (Deus et al., 2021). Fyzikální i chemické vlastnosti čokolády mohou být ovlivněny přítomností dalších přísad (Kim et al., 2022). Jedním z vedlejších produktů, který nemá v současnosti velké komerční využití je kávová sedlina. Kávová sedlina je bohatá na lipidy, tokoferoly, fenolické látky, polysacharidy, proteiny atd. Díky těmto organickým látkám může najít uplatnění také v potravinářství (Masino et al., 2022). Nanoemulze jsou koloidní systémy, které tvoří dvě vzájemně nemísitelné kapaliny, z nichž jedna je rozptýlena ve druhé. Pro lepší stabilizaci nanoemulze s používají povrchově aktivní

látky, fosfolipidy, proteiny a polysacharidy. Nanoemulze umožňují balení bioaktivních sloučenin do své struktury a tím zlepšují funkčnost potravin (Pisoschi et al., 2018).

### Experimentální část

Na přípravu nanoemulze byly smíchány 2 díly oleje z kávové sedliny, 8 dílů vody a 0,5 dílů emulgátoru TWEEN 80. Vytvořená směs byla pomocí PULSE 150 ULTRASONIC HOMOGENIZER (Benchmark Scientific, USA) homogenizována po dobu 5 min s délkou cyklu 78,0 s. Pro 3D tisk čokolády byla použita čokoládová náplň Mycusini (Print2Taste, Německo). Bylo temperováno na 45 °C příslušné množství čokoládové matrice, následně bylo do matrice přimíchán olej z kávové sedliny (nanoemulze) odpovídající koncentraci 1,2; 2,3 a 3,4 %. Směs byla dále temperována na 45 °C po dobu 20 min a ponechána při laboratorní teplotě 2 h a následně uchovávána při +7 °C. Pro tisk byla použita 3D tiskárna Mycusiny® (Print2Taste, Německo), nerezová tryska o 0,80 mm (Print2Taste, Německo) a šablona Cylinder (10x26,6x0,81 mm) z nabídky předloh od výrobce. Před 3D tiskem byly matrice temperovány 30 min při laboratorní teplotě. 3D tisk probíhal při teplotě a rychlostí nastavenou výrobcem. Po vytisknutí byly matrice uchovávány při +7 °C.

Pro stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS bylo do tmavých lahvíček naváženo 0,1 g vzorku a přidáno 20 ml směsi ethanol:voda (1:1). Vzorky byly ultrazvukovány po dobu 30 minut a přefiltrovány. 12- 16 hodin před měřením bylo smícháno 10 ml 0,007M roztoku ABTS s 10 ml 0,00245M roztoku peroxodisíranu draselného. Před měřením byl roztok zředěn na absorbanci 0,7 při 735 nm. Poté bylo smícháno 1980 µl roztoku ABTS s 20 µl připraveného extraktu. Vzorky byly inkubovány po dobu 5 minut ve tmě a následně byla změřena absorbance při 735 nm. Výsledky byly vypočítány podle následujícího vzorce:

$$\text{ABTS (\%)} = [(\text{Abs}_{\text{ABTS}} - \text{Abs}_{\text{vzorku}}) / \text{Abs}_{\text{ABTS}}] \times 100$$

Pro stanovení flavonoidů bylo do tmavých lahvíček naváženo 0,1 g vzorku, a přidáno 20 ml směsi ethanol:voda (1:1) a vzorky byly ultrazvukovány po dobu 30 minut a přefiltrovány. Do zkumavky bylo pipetováno postupně 0,5 ml vzorku, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% roztoku NaNO<sub>2</sub> a směs byla inkubována 5 minut. Dále bylo přidáno 0,2 ml 10% roztoku AlCl<sub>3</sub> a směs byla inkubována 5 minut. Poté bylo přidáno 1,5 ml 1M roztoku NaOH a 1 ml destilované vody a směs byla inkubována 15 minut. Poté byla změřena absorbance při 510 nm oproti slepému vzorku. Výsledky byly vypočteny na základě kalibrační řady ze standardu epikatechinu.

### Výsledky a diskuze

Z výsledků metody ABTS (Tabulka 1) je patrné, že u většiny vzorků došlo po přidavku oleje a nanoemulze z kávové sedliny k nárůstu antioxidačních aktivit. Tento výsledek značí, že antioxidační látky, zejména fenolické sloučeniny v oleji z kávové sedliny jsou schopny vychytávat volné radikály a tím podpořit antioxidační aktivitu samotné čokolády (Araujo et al., 2019). Nejvyšší antioxidační aktivita byla pozorována u vzorku Choco<sub>2,30</sub>. I když nanoemulze z oleje z kávové sedliny vykazuje vyšší antioxidační aktivitu, než samotný olej ( $p < 0,05$ ), po přidavku do čokoládové matrice dochází k mírnému poklesu antioxidačních aktivit oproti čokoládovým vzorkům se samotným olejem. Nanoemulze a olej z kávové sedliny vykazuje vyšší obsah flavonoidů oproti samotné kontrole ( $p < 0,05$ ) (Tabulka 1). Nicméně po přidavku oleje/nanoemulze do čokoládové hmoty dochází u většiny vzorků k poklesu obsahu flavonoidů, výjimku tvoří vzorek Choco<sub>2,30</sub> ( $p < 0,05$ ). Texturní vlastnosti (Tabulka 1) – tvrdost tištěných objektů se zvyšovala po přidavku oleje z kávové sedliny, vyjma vzorku s nejnižší koncentrací oleje. Po přidavku nanoemulze se tvrdost objektů mnohonásobně zvýšila, zejména u vzorku Choco<sub>3,4nE</sub>.

Tabulka 1: Výsledky metody ABTS, obsahu flavonoidů a texturálních vlastností - tvrdosti

Vzorek	ABTS (%)	Flavonoidy (mg/g)	Tvrdość (g)
Olej	0,421 ± 0,446 <sup>a</sup>	2,358 ± 0,036 <sup>a</sup>	—
Nanoemulze	1,216 ± 0,238 <sup>b</sup>	4,064 ± 0,069 <sup>b</sup>	—
Choco kontrola	7,640 ± 0,237 <sup>cd</sup>	1,835 ± 0,050 <sup>c</sup>	193,800 ± 82,453 <sup>a</sup>
Choc <sub>01,20</sub>	7,312 ± 0,412 <sup>d</sup>	1,708 ± 0,035 <sup>d</sup>	140,793 ± 238,524 <sup>a</sup>
Choc <sub>02,30</sub>	8,648 ± 0,746 <sup>ec</sup>	2,602 ± 0,032 <sup>e</sup>	582,093 ± 306,649 <sup>a</sup>
Choc <sub>03,40</sub>	8,213 ± 0,428 <sup>fc</sup>	1,832 ± 0,028 <sup>fc</sup>	1770,915 ± 341,602 <sup>b</sup>
Olej	0,421 ± 0,446 <sup>a</sup>	2,358 ± 0,036 <sup>a</sup>	—
Nanoemulze	1,216 ± 0,238 <sup>b</sup>	4,064 ± 0,069 <sup>b</sup>	—
Choco kontrola	7,640 ± 0,237 <sup>cd</sup>	1,835 ± 0,050 <sup>c</sup>	193,800 ± 82,453
Choc <sub>01,2nE</sub>	7,676 ± 0,445 <sup>def</sup>	1,675 ± 0,038 <sup>de</sup>	3190,047 ± 1202,571
Choc <sub>02,3nE</sub>	8,222 ± 0,297 <sup>ef</sup>	1,757 ± 0,036 <sup>ec</sup>	726,923 ± 399,142
Choc <sub>03,4nE</sub>	6,958 ± 1,118 <sup>fd</sup>	1,474 ± 0,063 <sup>f</sup>	3478,680 ± 1058,341

### Závěr

3D tisk potravin umožňuje výrobu objektů s definovaným tvarem a nutričním složením. Velmi vhodnou potravinářskou matricí pro 3D tisk je čokoláda, která je bohatá na řadu antioxidantních látek. Její antioxidantní a texturální vlastnosti mohou být podpořeny přidavkem oleje a nanoemulze z kávové sedliny. Z výsledků je patrné, že přidavek oleje a nanoemulze z kávové sedliny u většiny vzorků zvyšuje antioxidantní aktivitu čokoládových objektů, a naopak snižuje obsah flavonoidů. Nejvyšší hodnota antioxidantní aktivity a obsahu flavonoidů byla pozorována u vzorku s přidavkem oleje v koncentraci 2,3 %. Tvrdość objektů se zvyšovala s rostoucí koncentrací samotného oleje, výjimku tvořil vzorek s nejnižší koncentrací. Velmi vysoké tvrdosti byly poté pozorovány u přidavku nanoemulze, zejména u vzorku s jeho nejvyšším přidavkem. Výsledky z této studie mohou obohatit dosavadní vývoj čokoládových matic určených pro 3D tisk a zároveň mohou nabídnout možnosti využití kávové sedliny jako vedlejšího potravinářského produktu.

### Literatura

- KIM, S. M., WOO, J. H., KIM, H. W., PARK, H. J. Formulation and evaluation of cold-extruded chocolate ganache for three-dimensional food printing. *Journal of Food Engineering*. 2022, vol. 314, p.1-12.
- DEUS, V. L., RESENDE, L. M., BISPO, E. S., FRANCA, A. S., GLORIA, M. B. A. FTIR and PLS-regression in the evaluation of bioactive amines, total phenolic compounds and antioxidant potential of dark chocolates. *Food Chemistry*. 2021, vol. 357, p. 1-9.
- MASINO, F., MONTEVECCHI, G., CALVINI, R., FOCA, G., ANTONELLI, A. Sensory evaluation and mixture design assessment of coffee-flavored liquor obtained from spent coffee grounds. *Food Quality and Preference*. 2022, vol. 96, p. 1-8.
- PISOSCHI, A. M., POP, A., CIMPEANU, C., TURCUȘ, V., PREDOI, G., IORDACHE, F. Nanoencapsulation techniques for compounds and products with antioxidant and antimicrobial activity-A critical view. *European journal of medicinal chemistry*. 2018, vol. 157, p. 1326-1345.
- ARAUJO, M. N., AZEVEDO, A. Q. P. L., HAMERSKI, F., VOLL, F. A. P., CORAZZA, M. L. Enhanced extraction of spent coffee grounds oil using high-pressure CO<sub>2</sub> plus ethanol solvents. *Industrial Crops and Products*. 2019, vol. 141, p. 1-16.

**Kontaktní adresa:** Karolína Těšíková, Ing., Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu FVHE VETUNI, Palackého tř.1946/1, 612 42 Brno

## Edible/biodegradable packaging with the addition of Beluga lentils powder: antioxidant activity properties

Simona Dordević, Dani Dordević, Adam Budina, Johana Zemancová, Kristina Babincová, Bohuslava Tremlová

Department of Plant Origin Food Sciences, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno

### Summary

The main aim of the research was to apply black lentils (Beluga) in the form of powder to the carrageenan and chitosan packaging. For the preparation of packaging the following concentrations were used: 1, 1.5 and 2 % of Beluga lentils powder. The prepared packaging materials were analysed by FRAP method (ferric reducing antioxidant power) and DPPH method (2,2,-diphenyl-1-picrylhydrazyl) to monitor the antioxidant activity. The highest antioxidant activity detected by FRAP method was found in the samples with the highest concentrations of Beluga lentils powder: KP2% ( $4,877 \pm 0,257 \mu\text{mol Trolox/g}$ ) and CHP2% ( $4,093 \pm 0,126 \mu\text{mol Trolox/g}$ ) and the same samples had the highest antioxidant activity measured by DPPH method, but there was more significant difference: KP2% ( $60,87 \pm 3,96 \%$ ), CHP2% ( $81,12 \pm 4,30 \%$ ). There was found that not only the addition of Beluga lentils powder, but the basic matrices (chitosan or carrageenan) had the impact to antioxidant activity. The study can be very useful for further investigations since our experiment showed the possibility to use Beluga lentils powder in the production of edible or biodegradable packaging.

**Keywords:** carrageenan; chitosan; DPPH; FRAP

### Introduction

The production of edible or biodegradable packaging with the addition of natural extracts or essential oils has been very popular recently because these additives can improve the antioxidant activity same as antimicrobial activity of packaging (Kadzińska et al., 2019). It is important to find the new sources with these properties. In the previous studies the content of polyphenolic compounds in different cultivars of lentils were studied. It was found that black Beluga lentils (*Lens culinaris* Beluga) are also a really good source of polyphenols in comparison with another types of lentils (brown, green, red) (Bubelová et al., 2018). Beluga lentils can work as a source of polyphenols, which can increase the antioxidant activity of packaging (Rice-Evans et al., 1996) leads to the active properties of packaging, it means, that the packaging can work as a donor of antioxidants, which can improve the shelf life of packaged food (Perera et al., 2021). The aim of the study was to experimentally produce biodegradable packaging with chitosan/carrageenan and with the addition of Beluga lentils powder; consequently to measure antioxidant properties of the produced packaging.

### Materials and Methods

For the preparation of packaging 0.3 g of chitosan or  $\kappa$ -carrageenan was weighted. The distilled water was used as a solvent for carrageenan packaging and 1 % lactic acid for chitosan packaging. The prepared films were fortified by the addition of Beluga lentils powder (cooked, dried and melted lentils) in the concentrations 1; 1.5 and 2 % according to Table 1.

The FRAP method (ferric reducing antioxidant power) by Behbahani et al. (2017) was used. The extract of film samples was mixed with working solution (20 mM  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 300 mM acetic buffer; 10 mM TPTZ). After 8 minutes incubation in dark absorbance was measured at 593 nm on spectrophotometer and results expressed as  $\mu\text{mol Trolox/g}$ .

For the DPPH method (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) by Adilah et al. (2018) the same extract as for FRAP method was used. The 3 mL of extract was mixed with 1 mL of 0.1 mM

DPPH, after 30 minutes of incubation the absorbance was measured at 517 nm and the results were expressed according to following formula:

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

Statistically significant differences was determined by the one-way ANOVA, using, software IBM SPSS. The samples explanation is shown in Table 1.

Table 1: The composition of packaging with addition of Beluga lentils powder

Sample	Composition
KK	0.3 g $\kappa$ -carrageenan + glycerol
KP1%	0.3 g $\kappa$ -carrageenan + 1% Beluga lentils powder + glycerol
KP1.5%	0.3 g $\kappa$ -carrageenan + 1.5 % Beluga lentils powder + glycerol
KP2%	0.3 g $\kappa$ -carrageenan + 2 % Beluga lentils powder + glycerol
CHK	0.3 g chitosan + glycerol
CHP1%	0.3 g chitosan + 1% Beluga lentils powder + glycerol
CHP1.5%	0.3 g chitosan + 1.5 % Beluga lentils powder + glycerol
CHP2%	0.3 g chitosan + 2 % Beluga lentils powder + glycerol

### Results and discussion

The results of antioxidant activity measured by FRAP method are summarized in Table 2. The addition of Beluga lentils powder showed the increasing trend in antioxidant activity in all samples except KP1%. The increasing antioxidant activity was caused by the addition of Beluga lentils powder, because Beluga lentils are a good source of polyphenols, which can work as an antioxidant compounds. (FAOSTAT, 2019; Machado et al., 2019). Samples KP2% and CHP2% were statistically significant different ( $p < 0.05$ ), leading to finding that the carrageenan packaging had the higher antioxidant activity detected by FRAP method.

Table 2: Results of antioxidant activity of prepared packaging measured by FRAP method

Sample	FRAP [ $\mu\text{mol Trolox /g}$ ]
KK	$0.768 \pm 0.038^a$
KP1%	$0.472 \pm 0.044^f$
KP1.5%	$2.310 \pm 0.128^g$
KP2%	$4.877 \pm 0.257^c$
CHK	$0.480 \pm 0.347^{af}$
CHP1%	$1.261 \pm 0.223^b$
CHP1.5%	$2.005 \pm 0.180^g$
CHP2%	$4.093 \pm 0.126^{hl}$

\*Different letters in superscript indicate statistically significant ( $p < 0.05$ ) differences between rows

The another method – DPPH was used for the determination of antioxidant activity too. The reason was, that the DPPH method has different mechanism from the FRAP method, and for more clear results it is better to use more than one method for measuring antioxidant activity. (Thaipong et al., 2006) The results of DPPH showed a multiple increasing between control samples consisting of carrageenan ( $8.10 \pm 1.54$  %) and chitosan ( $1.84 \pm 1.56$ %), same as in samples with the highest addition of Beluga lentils powder - KP2% and CHP2%, where the antioxidant activity was  $60.87 \pm 3.96$  % and  $81.12 \pm 0.94$  %. It has to be stressed out, that between KP2% and CHP2% the statistical significant difference ( $p < 0.05$ ) was found.

Table 3: Results of antioxidant activity of prepared packaging measured by DPPH method

Sample	DPPH [%]
KK	8.10 ± 1.54 <sup>a</sup>
KP1%	7.79 ± 2.67 <sup>a</sup>
KP1.5%	35.66 ± 3.74 <sup>ci</sup>
KP2%	60.87 ± 3.96 <sup>de</sup>
CHK	1.84 ± 1.56 <sup>f</sup>
CHP1%	32.79 ± 2.14 <sup>i</sup>
CHP1.5%	55.21 ± 0.94 <sup>d</sup>
CHP2%	81.12 ± 4.30 <sup>bg</sup>

\*Different letters in superscript indicate statistically significant ( $p < 0.05$ ) differences between rows

## Conclusion

Experimentally produced edible/biodegradable packaging with the addition of Beluga letils powder showed a high antioxidant property measured by two antioxidant capacity methods (FRAP and DPPH). These findings are emphasizing the possibility to use these kinds of matrices as packaging, since the migration of antioxidant properties to the wrapped/packaged commodity could increase the stability of food. Though, additional model and simulation experiments are necessary for the confirmation of this hypothesis.

## Acknowledgement

The study was funded by ITA project n. 2022ITA23 from University of Veterinary Sciences Brno.

## References

- FAOSTAT. Food and Agricultural Organization of United Nations: Economic and Social Department: The Statistical Division. Available online: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- BUBELOVÁ, Z.; SUMCZYNSKI, D.; SALEK, R. N. Effect of cooking and germination on antioxidant activity, total polyphenols and flavonoids, fiber content, and digestibility of lentils (*Lens culinaris* L.). *Journal of Food Processing and Preservation*. 2018, vol. 42. ISSN 01458892.
- BEHBAHANI, B. A.; SHAHIDI, F.; YAZDI, F. T.; MORTAZAVI, S. A.; MOHEBBI, M. Use of *Plantago major* seed mucilage as a novel edible coating incorporated with *Anethum graveolens* essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017, vol. 94, pp. 515-526. ISSN 01418130.
- ADILAH, A. N.; JAMILAH, B.; NORNIZAN, M.A.; HANANI, Z.A.N. Utilization of mango peel extracts on the biodegradable films for active packaging. *Food Packaging and Shelf Life*. 2018, vol. 16, pp. 1-7. ISSN 22142894.
- MACHADO, A. P. D. F.; SUMERE, B. R.; MEKARU, C.; MARTINEZ, J.; BEZERRA, R. M. N.; ROSTAGNO, M. A. Extraction of polyphenols and antioxidants from pomegranate peel using ultrasound: influence of temperature, frequency and operation mode. *International Journal of Food Science & Technology*. 2019, vol. 54(9), 2792-2801.
- THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*. 2006, vol. 19(6-7), 669-675.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996, vol. 20, pp. 933-956. ISSN 08915849.
- KADZIŃSKA, J.; JANOWICZ, M.; KALISZ, S.; BRYŚ, J.; LENART, A. An overview of fruit and vegetable edible packaging materials. *Packaging Technology and Science*. 2019, vol. 32(10), 483-495.
- PERERA, K. Y.; SHARMA, S.; PRADHAN, D.; JAISWAL, A. K.; JAISWAL, S. Seaweed polysaccharide in food contact materials (active packaging, intelligent packaging, edible films, and coatings). *Foods*. 2021, vol. 10(9), 2088.

**Address:** Simona Dordević, Ing. Department of Plant Origin Food Sciences, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, dordevics@vfu.cz



## Glycemic index of breads made with edible insect

<sup>1</sup>Pečová Martina, <sup>2</sup>Zielińska Ewelina

<sup>1</sup>Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Analysis and Evaluation of Food Quality, University of Life Sciences in Lublin, Poland

### Summary

*This study deals with the use of crickets in bakery products and their effect on the glycemic index. For this purpose 3 samples containing crickets at a concentration of 2%, 5%, 10% and one control bread without insects were prepared. The results of the glycemic index were determined by the reaction of GOPOD reagent and glucose obtained by hydrolysis of starches from the sample. Has been found that the addition of cricket can reduce glycemic index.*

**Keywords:** edible insect; glucose; bakery; cricket; *Triticum spelta* L.

### Introduction

The glycemic index (GI) is a characteristic that expresses the time dependence and absorption of carbohydrates ingested in foods. That is, how long it takes for the sugars from the food to enter the bloodstream. To determine the GI, the increment of the area under the curve is subtracted from the reference value. Glucose carbohydrate has been identified as a reference, but white bread is often used for evaluation (Jenkins et al, 1981; Brouns et al, 2005). According to studies, many factors affect the value of GI. These are not only physiological processes in the body but also food particle size and food preparation, the presence of starch and fats, or acidity (Jenkins et al, 2002; Marangoni and Poli, 2008). Although fiber is also classified as a carbohydrate, it is not absorbed as glucose, but it also affects GI (Pfeifer et al., 2008). Edible insects, newly classified as novel foods, also contain a number of carbohydrates, including the important polysaccharide-chitin as a part of their exoskeleton. Although chitin is considered an allergen, it also has a beneficial effect on human health due to its antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant effects (Ojha et al., 2021). Research shows that edible insects in food are more accepted by society after incorporating them into common products (Mlček et.al., 2014). Therefore, their addition to the bakery and products of a similar characteristic is appropriate.

### Materials and Methods

#### *Bread Preparation*

Live crickets (*Gryllus assimilis*) were purchased from Bugstore (Krakow, Poland) and allowed 48 hours without feed to cleanse their digestive tract. Then the crickets were frozen for 48h at -20 °C and lyophilized for 72h (Labcono, USA) as a gentle method for preparing. Crickets were ground in a laboratory grinder and sieved before use.

Individual bread samples were prepared according to a simple recipe. The basic spelt flour type 1850 was replaced by cricket flour we prepared at a concentration of 2 %, 5 %, and 10 %. One bread was prepared as a reference and did not contain insects. The rest of the ingredients contained 30 g yeast, 400 ml lukewarm water, 1 tablespoon of sugar, 4 tablespoons of oil and 2 teaspoons of salt.

#### *Digestibility of the starch In Vitro*

Each of the prepared samples of bread was enzymatically hydrolyzed according to the methodology of Zielinska and Pankiewicz (2020). In the first step, 1g of sample was diluted in 30 ml distilled water with the addition of 0,8 ml of 1M HCl. Then 1 ml of 10 % pepsin (Sigma-Aldrich, USA) solution prepared in 0,05M HCl was added. The samples were maintained at 37 ° C for 30 min with stirring to simulate gastric digestion. The pH of the samples was changed after the addition of 2 ml of 1M sodium bicarbonate solution and 5 ml of 0.1M phosphate buffer. For continuing the digestion of starch 4,6 mg amyloglucosidase (Sigma-Aldrich, USA) and 5 ml of 2,5% pancreatin (Sigma-Aldrich, USA) solution have been added. Every tube with a sample was filled up to the volume of 55 ml.

From the end of the gastric phase in vitro digestion, from the point when amylolysis started, was 1 ml removed at 20, 30, 60, 90, 120, and 180 min. These aliquots were replaced to the tube and 4 ml of 100 % ethanol to deactivate the enzymes.

### *Glycemic Index In Vitro*

As written above 1 ml aliquots were added to ethanol at time intervals during hydrolysis. These samples were used for the determination of glucose content by using the GOPOD assay kit (Megazyme, Ireland). Simply the 10 ul ml of sample and 300 ul of GOPOD reagent were added to the 96-well plate. The absorbance was read at 510 nm after incubation at 40 °C for 20 min. Curves were compiled from the measured results and the areas under the curves (AUC) were calculated. The ratio between the AUC of the sample and the AUC of standard (reference bread) was calculated as hydrolysis index (HI). The glycemic index was then calculated according to the formula from Goñi et al. (1997).

$$GI (\%) = 39.71 + 0.549 \times HI$$

### **Results and Discussion**

Thanks to the sugars and white flour, bakery products are among the foods with a medium to high GI (Ferrer-Mairal et al., 2012). Our breads were made from spelt flour. Spelt is generally rich in minerals and micronutrients. In addition, it contains higher amounts of protein, fat and total fiber than conventional wheat (Wang et al., 2021). Despite nutritional parameters, GI 93 in spelt bread was similar to wheat bread. These results were determined in vivo according to a study by Marques et al (2007).

The amount of glucose is essential for measuring the glycemic index. Glucose is formed by the breakdown of starch, begins in the mouth and continues in the stomach. Therefore, it is important to monitor glucose levels during the first two hours after food consumption, over short time intervals as was described by Sun et al. (2022).

The GI value was calculated for experimentally produced breads from samples prepared according to the methodology seen above. The GI of the control sample was 73,7±0,6<sup>c</sup>.

Table 1: Glycemic Index of breads enriched by crickets

Bread	GI (%)
Control	73,7±0,6 <sup>c</sup>
2%	72,27±0,79 <sup>bc</sup>
5%	70,85±0,65 <sup>b</sup>
10%	68,45±0,51 <sup>a</sup>

\*Values followed by a different superscript in a column differ significantly (p < 0.05).

Replacing spelt flour with cricket flour at a total concentration of 2 %, 5 % and 10 % caused a gradual decrease in GI, with the highest concentration (10 %) reaching the lowest GI ( $68.45 \pm 0.51^a$ ). The glycemic index was lower for the breads with the addition of crickets than the control bread ( $p < 0.05$ ) in all cases.

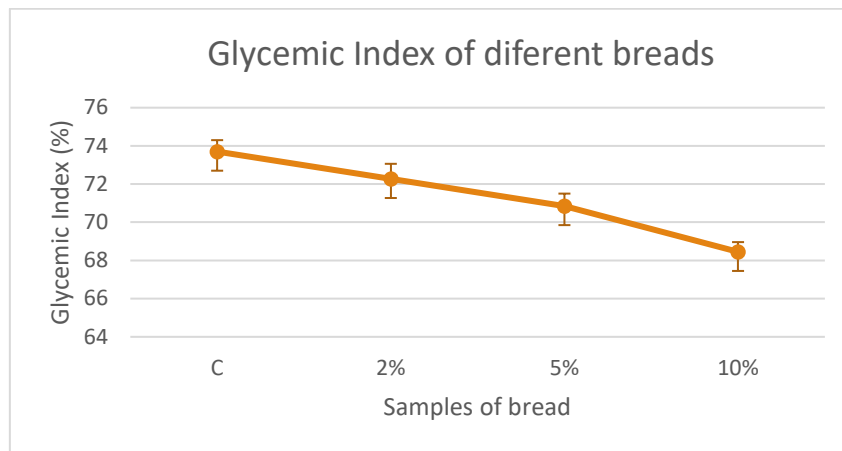


Figure 1: Glycemic Index of breads containing cricket.

A similar trend of concentration and GI dependence was demonstrated in other experimentally produced bakery products containing insects (Zielinska et al., 2021). In a study by Osimani et al (2018), they performed experiments with the production of cricket-containing breads. It turned out that the bread containing 10 % of cricket powder was sensory accepted by the evaluator, moreover, in terms of manufacturing technology, this concentration was suitable for the dough preparation.

In vitro results show that the addition of cricket to the breads affects reducing GI. This and other information about the effects of insects on human nutrition could be useful for the easier integration of insects as a novel food.

### Conclusion

Considering the results of our experiment is obvious that crickets as a substitute spelt in bakery products, affect reducing Glycemic Index.

### Acknowledgments

This study was supported by a project IMA VETUNI 10\_2022\_FVHE\_08.

### References

BROUNS, F., BJORCK I.; FRAYN K. N.; GIBBS A. L.; LANG V.; SLAMA G.; WOLEVER T. M.S. Glycaemic index methodology. *Nutrition Research Reviews*. 2005, 18(1). ISSN 0954-4224.

FERRER-MAIRAL, A.; PEÑALVA-LAPUENTE C.; IGLESIA I. et al. In vitro and in vivo assessment of the glycemic index of bakery products: influence of the reformulation of ingredients. *European Journal of Nutrition*. 2012, 51(8), 947-954. ISSN 1436-6207.

GOÑI, I.; GARCIA-ALONSO A.; SAURA-CALIXTO F. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutrition Research*. 1997, 17(3), 427-437. ISSN 02715317.

JENKINS, D. J.; KENDALL C. W.; AUGUSTIN L. S.; FRANCESCHI S.; HAMIDI M.; MARCHIE A.; JENKINS A. L.; AXELSEN M. Glycemic index: overview of implications in health and disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2002, 76(1), 266S-273S. ISSN 0002-9165.

JENKINS, D. J.; WOLEVER T. M.; TAYLOR R. H. et al. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1981, 34(3), 362-366. ISSN 0002-9165.

MARANGONI, F.; POLI, A. The glycemic index of bread and biscuits is markedly reduced by the addition of a proprietary fiber mixture to the ingredients. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2008, 18(9), 602-605. ISSN 09394753.

MARQUES, C.; D'AURIA L.; CANI P. D. et al. Comparison of glycemic index of spelt and wheat bread in human volunteers. *Food Chemistry*. 2007, 100(3), 1265-1271. ISSN 03088146.

MLCEK, J.; ROP O.; BORKOVCOVA M.; BEDNAROVA M. A Comprehensive Look at the Possibilities of Edible Insects as Food in Europe – A Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2014, 64(3). ISSN 1230-0322.

OJHA, S.; BEKHIT A. E.; GRUNE T.; SCHLÜTER O. K. Bioavailability of nutrients from edible insects. *Current Opinion in Food Science*. 2021, 41, 240-248. ISSN 22147993.

PFEIFER, H. H.; LYCZKOWSKI D. A.; THIELE E. A. Low glycemic index treatment: Implementation and new insights into efficacy. *Epilepsia*. 2008, 49, 42-45. ISSN 00139580.

SUN, Y.; ZHONG CH.; ZHOU Z.; LEI Z.; LANGRISH T. A. G. A Review of In Vitro Methods for Measuring the Glycemic Index of Single Foods: Understanding the Interaction of Mass Transfer and Reaction Engineering by Dimensional Analysis. *Processes*. 2022, 10(4). ISSN 2227-9717.

WANG, J; BARAŃSKI M.; HASANALIYEVA G. et al. Effect of irrigation, fertiliser type and variety on grain yield and nutritional quality of spelt wheat (*Triticum spelta*) grown under semi-arid conditions. *Food Chemistry*. 2021, 358. ISSN 03088146.

ZIELIŃSKA, E.; PANKIEWICZ U. Nutritional, Physiochemical, and Antioxidative Characteristics of Shortcake Biscuits Enriched with *Tenebrio molitor* Flour. *Molecules*. 2020, 25(23). ISSN 1420-3049.

ZIELIŃSKA, E.; PANKIEWICZ U.; SUJKA M. Nutritional, Physiochemical, and Biological Value of Muffins Enriched with Edible Insects Flour. *Antioxidants*. 2021, 10(7). ISSN 2076-3921.

**Contact adress:** Martina Pečová, Mgr., Department of Plant Origin Food Sciences, FVHE, University of Veterinary Sciences Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, pecovam@vfu.cz

## Využití Ramanovy spektroskopie k porovnání jednodruhových květových medů

### Raman spectroscopy as a method of comparison monofloral honeys

<sup>1</sup>Boris Pleva, <sup>1</sup>Martina Pečová, <sup>1</sup>Jana Čaloudová, <sup>1</sup>Matej Pospiech

<sup>1</sup>Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno

#### Summary

*In this work were evaluated samples of monofloral, rape and linde tree honey. Five monofloral honeys were evaluated and each of these samples was 32 times measured. Raman spectroscopy with subsequent statistical evaluation was used for measurement and subsequent evaluation. Raman spectroscopy was chosen as an alternative method of physicochemical analysis and melissoapalynological analysis.*

**Keywords:** monofloral; honey; rape; linde tree

#### Úvod

Jednodruhové květové medy vznikají zahušťováním nektaru z rostlin a jsou pro spotřebitele ve velké oblibě (Pita-Calvo, 2017). Jejich druhová identifikace však není jednoduchá, v nynější době se využívají také metody pro hodnocení autenticity na základě DNA, nebo ty založené na mikroskopii pylových zrn a jejich následné porovnání s pylovou databází (Sónia, 2015). Pro průkaz lze použít například Ramanovu spektroskopii. Tato metoda také slouží k detekci falšování medů a ověření jejich autenticity (Meo, 2017, Anklam, 1998). Hlavní složkou medů jsou sacharidy, jež tvoří až 95 % sušiny. Převážná většina sacharidů jsou monosacharidy, a to zejména glukóza a fruktóza (Pita-Calvo, 2017). V medu se vyskytují kyseliny, aminokyseliny, proteiny, a jiné látky, které jsou zde zastoupeny nejen z důvodu obsahu pylů, ale také ze slinných žláz včel (Escuredo, 2013, Da Silva, 2016). Ramanova spektroskopie představuje rychlou nedestruktivní metodu pro jinak používané fyzikálně chemické analýzy a melisso a palynologickou analýzu. Tato metoda je založena na principu výměny energie jednobarevného světla při interakci s elektronovým paprskem molekul (Yang, 2011). Ramanův děj probíhá tehdy, kdy dojde k neúměrnému rozptýlení dopadajícího světla, které způsobuje vibrační posun vlnového čísla (Meo, 2017).

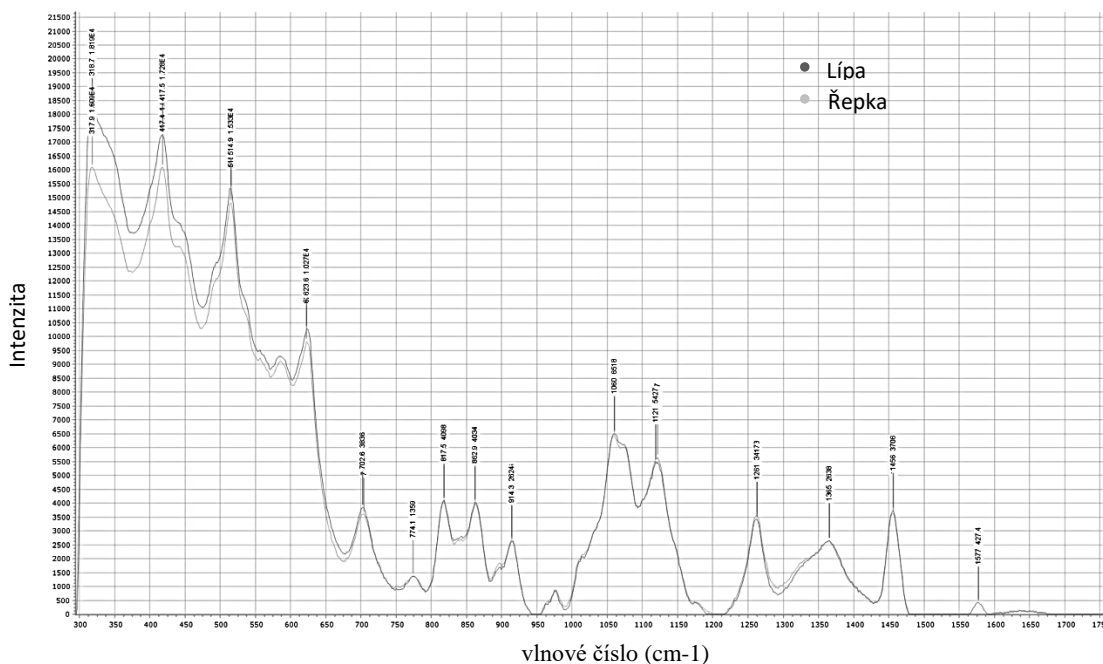
#### Materiál a metodika

Pro analýzu byly použity medy stočené od hobby včelařů z celé České republiky. Ze všech skupin vzorků byly vybrány k analýze dvě skupiny květových medů a to 5 řepkových a 5 lipových medů. Každý ze vzorků byl změřen 32krát. U všech vzorků byla stanoven refraktometrická sušina a jednotlivě byla standardizována na požadovanou hodnotu. Standardizace probíhala na základě množství vody ve vzorku, změřené digitálním refraktometrem PAL (Antago, JPN). U všech vzorků bylo potřeba dosáhnout refrakce  $65^\circ \pm 0,5^\circ$  brixů. Úprava vzorků probíhala rozmícháním stanoveného množství destilované vody při navážce 10 g. Vzorky medu byly rozpouštěny v ultrazvukové lázni (Bandelin, GER), následně vytemperovány na pokojovou teplotu a opětovně změřeny pro kontrolu požadované refrakce. Všechny vzorky byly zpracovány v duplikátu, aby byla potvrzena správnost přípravy a následného měření. Standardizované vzorky byly změřeny Ramanovým spektroskopem HR-TEC-X2-785 (StellarNet, USA) v rozsahu 300–2000 vlnového čísla  $\text{cm}^{-1}$ .

Použit byl laser (Ondax, DE) o vlnové délce 785 nm s výkonem 91 mW. Každý z jednotlivých vzorků byl změřen 8krát. Data byly vyhodnoceny pomocí parametrického párového Studentova T-testu.

## Výsledky a diskuse

Mezi hodnocenými jednodruhovými květovými medy byly potvrzeny rozdíly v záznamu Ramanova spektra (Graf 1). Graf potvrzuje rozdíl intenzity pro vlnové čísla (vlnčet), které jsou odpovědné za specifické vibrace (Li, 2017).



Graf 1: Porovnání Ramanova záznamu lipových a řepkových medů

Významná vibrační spektra jsou uvedena v tabulce 1. Statisticky významné rozdíly byly potvrzeny v oblasti vlnových čísel 417, 515, 623 a 1577  $\text{cm}^{-1}$ .

Tabulka 1: Srovnání vibračních spekter řepkových a lipových medů

Vlnové číslo ( $\text{cm}^{-1}$ )	Vibrace	Intenzita	
		Řepka	Lípa
1540 (1577)	N-H <sup>b</sup> a C-N <sup>a</sup> amidů II	6 ± 12*	554 ± 537*
1370-1420	C-H <sup>b</sup> lipidů a celulózy	3652 ± 688	3724 ± 321
1200-1350	N-H <sup>b</sup> a C-N <sup>a</sup> amidů III	2569 ± 793	2375 ± 676
1200-1350	N-H <sup>b</sup> a C-N <sup>a</sup> amidů III	3373 ± 647	3419 ± 502
1000-1200	C-O a C-C <sup>a</sup>	5347 ± 913	5462 ± 381
1000-1200	C-O a C-C <sup>a</sup>	6273 ± 1068	6621 ± 513
920	C-H & C-O-H <sup>b</sup>	2672 ± 495	2749 ± 331
900	C-H <sup>b</sup>	3871 ± 690	4118 ± 455
820	C-H <sup>a</sup>	3974 ± 745	4251 ± 470
770	C-H <sup>b</sup>	1468 ± 553	1451 ± 502
710	C-O, C-C-O, O-C-O <sup>a</sup>	3746 ± 1366	3990 ± 915
630 (623)	cyklická <sup>a</sup>	9309 ± 2619*	10150 ± 1557*
520 (515)	N-H <sup>a</sup> proteinů	13897 ± 4140*	14915 ± 2613*
420 (417)	C-H <sup>a</sup> lipidů a celulózy	15291 ± 5221*	16423 ± 3354*
350	vibrace karbohydrátů a proteinů	17352 ± 7757	19158 ± 5191

Legenda: <sup>a</sup> změna délky vazby, <sup>b</sup> změna valenčního úhlu, <sup>o</sup> naměřené hodnoty. \* statisticky významný rozdíl mezi srovnávanými skupinami ( $p < 0,05$ )

Specifické píky představují obsah jednotlivých sacharidů (glukózy: 417, 437, 776, 790, 838, 856, 1028  $\text{cm}^{-1}$ , fruktózy: 417, 515, 623, 911, 933, 1028, 1461  $\text{cm}^{-1}$ , maltózy – 460, 920, 1028, 1130, 1370  $\text{cm}^{-1}$ , sacharózy – 460, 1028, 1130, 1370  $\text{cm}^{-1}$  a dalších sacharidů v medech (Dell Anna, 2009, Zimmermann, 2015). K identifikaci rozdílného píku v oblasti 1577  $\text{cm}^{-1}$  je potřeba další výzkum, který potvrdí jeho specifické složení. Dle parametrického párového Studentova T-testu jsou květové medy řepkové od medů lipových velmi dobře rozpoznatelné, a to na hladině významnosti 95%. U grafu 1 můžeme vidět specifické píky pro jednotlivé jednodruhové medy, které vznikají v určitém vlnočtu s určitou intenzitou. Metoda Ramanovy spektroskopie je vhodnou metodou k ověření autenticity, a to na základě obsahu specifických sacharidů (Meo, 2017, Anklam 1998). Tato metoda může být spojena i s chemometrickou metodou jako vhodný doplněk k detekci falšování medů (Li, 2012). Pokud by se Ramanova spektroskopie skombinovala s PCR metodou, můžeme tak získat specifické složení sacharidů v jednotlivých vzorcích a také potvrzení specifických pylových zrn řepky a lípy (Aliakbarzadeh, 2016, Paradkar, 2001).

### Závěr

Výsledky této práce ukazují, že metoda Ramanovy spektroskopie je vhodná k odlišení původu medů řepkových od medů lipových. Tento rozdíl je dán specifickým složením sacharidů u jednotlivých druhů medů. Specifické píky vznikají při určité intenzitě v konkrétních vlnových číslech, a to při vlnočtu 417, 515, 623 a 1577  $\text{cm}^{-1}$ .

### Poděkování

Tato práce byla podpořena programem aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství na období 2017–2025, ZEMĚ, číslo QK 1920344.

### Literatura

- PITA-CALVO, C.; GUERRA-RODRIGUEZ, M.E.; VAZQUEZ, M. Analytical methods used in the quality control of honey. *J. Agric. Food Chem.* 2017, 65, 690–703, DOI: [10.1021/acs.jafc.6b04776](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04776)
- MEO, S.A.; AL-ASIRI, S.A.; MAHESAR, A.L.; ANSARI, M.J. Role of honey in modern medicine. *Saudi J. Biol. Sci.* 2017, 24 (5), 975–978, DOI: [10.1016/j.sjbs.2016.12.010](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.010)
- ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.* 1998, 63, 549–562, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00057-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00057-0)
- PITA-CALVO, C.; VAZQUEZ, M. Differences between honeydew and blossom honeys: a review. *Trends Food Sci. Technol.*, 2017, 59, 79–87, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.015>
- ESCUREDO, O.; MIGUEZ, M.; FERNANDEZ-GONZALES, M.; SEIJO, M.C. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chem.* 2013, 138, 851–856, DOI: [10.1016/j.foodchem.2012.11.015](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.015)
- DA SILVA, P.M.; GAUCHE, C.; GONZAGA, L.V.; COSTA, A.C.O.; FETT, R. Honey: chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem.* 2016, 196, 309–323, DOI: [10.1016/j.foodchem.2015.09.051](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051)

YANG, D.; YING, Y. Applications of Raman spectroscopy in agricultural products and food analysis: a review. *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2011, 46, 539–560, DOI: <https://doi.org/10.1080/05704928.2011.593216>

LI, S.; ZHANG, X.; SHAN, Y.; SU, D.; MA, Q.; WEN, R.; LI, J. Qualitative and quantitative detection of honey adulterated with high-fructose corn syrup and maltose syrup by using near-infrared spectroscopy. *Food Chem.*, 2017, 218:231–236, [10.1016/j.foodchem.2016.08.105](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.105)

DELL'ANNA, R.; LAZZERI, P.; FRISANCO, M.; MONTI, F.; MALVEZZI C. F.; GOTTARDINI, E., et al., Pollen discrimination and classification by Fourier transform infrared (FT-IR) microspectroscopy and machine learning. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 394, 1443-1452, DOI: [10.1007/s00216-009-2794-9](https://doi.org/10.1007/s00216-009-2794-9)

ZIMMERMANN, B.; Tkal\_cec, Z., Me\_sic, A., & Kohler, A., Characterizing aeroallergens by infrared spectroscopy of fungal spores and pollen. *PLoS One*, 2015, 10(4), 124-240, DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124240>

LI, S.; SHAN, Y.; ZHU, X.; ZHANG, X.; LING, G. Detection of honey adulteration by high fructose corn syrup and maltose syrup using Raman spectroscopy. *J. Food Compos. Anal.* 2012, 28, 69–74, DOI: [10.1016/j.jfca.2012.07.006](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.07.006)

ALIAKBARZADEH, G.; PARASTAR, H.; SERESHIT, H. Fourier based partial least squares algorithm: new insight into fluorescence of specil shift in “frequency doamin“ Crossmark. *Chemom Intell Lab Syst.*, 2016, 158:165–173, DOI: <https://doi.org/10.1364/OE.27.002926>

PARADKAR, M. M.; IRUDAYARAJ, J. Discrimination and classification of beet and cane inverts in honey by FT-Raman spectroscopy. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section*. 2001, 76, 231-239, ISSN: 0308-8146

SÓNIA, S.; JOANA, S. A.; MARIA, B.; OLIVEIRA P. P.; ISABEL M. Improving DNA isolation from honey for the botanical origin identification. *Food Control*. 2015, 48, 130-136, ISSN: 0956-7135

**Kontakní adresa:** Boris Pleva, Mgr., Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, [H20342@vfu.cz](mailto:H20342@vfu.cz)



## Vliv použitého syřidla na senzorycké parametry čerstvých sýrů

### Influence of used rennet on the sensory parameters of fresh cheeses

Vávrová Růžena, Jarošová Alžběta, Saláková Alena

Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita

#### Summary

*Cheese is an important group of dairy products, especially its source of protein, which makes it an important component of human nutrition. Fresh cheese is made by precipitating milk protein by rennet or other coagulants. It has a delicate milky taste and is characterized by a short shelf life. The aim of this paper was to produce fresh cheeses from cow's milk with the help of four different rennets and to monitor their influence on sensory quality. Chymax, Fromasse, Mikroren and Laktochym were used for production of cheeses. Milk was collected from the farm for five consecutive months. Physico-chemical parameters were determined for each milk and cheese sample, followed by sensory analysis focusing on consistency and taste. The largest differences were recorded in titratable activity, no significant differences in consistency and taste.*

**Keywords:** cow milk; renneting; fresh cheese; milk coagulation; technological properties of milk

#### Úvod

Syřidla jsou významnou složkou při výrobě sýrů. Jsou to proteolytické enzymy, které působí v kyselé oblasti (Janštová et al., 2012). Mezi hlavní živočišné enzymy řadíme chymozin a pepsin. Kromě živočišných existují i mikrobiální či rostlinné enzymy, které se také využívají pro srážení mléka (Moschopoulou, 2011). V současné době se používají nejčastěji mikrobiální náhražky syřidel, které jsou metabolizovány geneticky modifikovanými organismy (Jacob et al., 2011). Jsou to například kyselinové proteázy z plísní (*Rhizomucormiehei*, *Rhizomucorpusillus*), kvasinek (*Kluyveromyceslactis*) či bakterií (*Escherichia coli*) (Fox et al., 2017).

Syřitelnost je schopnost mléka srážet se syřidlem a tvořit sýřeninu požadovaných vlastností. Je to časový úsek od přidání syřidla do mléka až do prvního vyvločkování mléka (Čejna, 2008). Sladké srážení mléka probíhá pomocí syřidla ve třech fázích: Enzymatická fáze, ve které enzymy hydrolyzují vazbu mezi 105 a 106 aminokyselinou ve frakci  $\kappa$ -kaseinu. Část řetězce je oddělena jako glykomakropeptid a druhá část jako para  $\kappa$ -kasein. V koagulační fázi dochází ke vzniku vápenatých mŕstvků a následně vzniku stabilní hydrofobní sraženiny. Následně dochází k synerezi, uvolňování syrovátky, krájení sýřeniny, případně její dohřívání (Law and Tamime, 2010). V terciální fázi pokračuje proteolýza kaseinu působením zbytkové aktivity syřidla (Janštová et al., 2012). Čerstvé sýry mají velmi vysoký obsah vody a jsou určeny pro rychlou konzumaci bez dalšího zrání. Jako příklad lze uvést čerstvý sýr, tvaroh, cream cheese a další (Callec, 2002).

Cílem práce bylo hodnocení vlivu použitého syřidla na senzorycké parametry čerstvých sýrů a výtěžnost v závislosti na vstupní surovině.

#### Materiál a metody

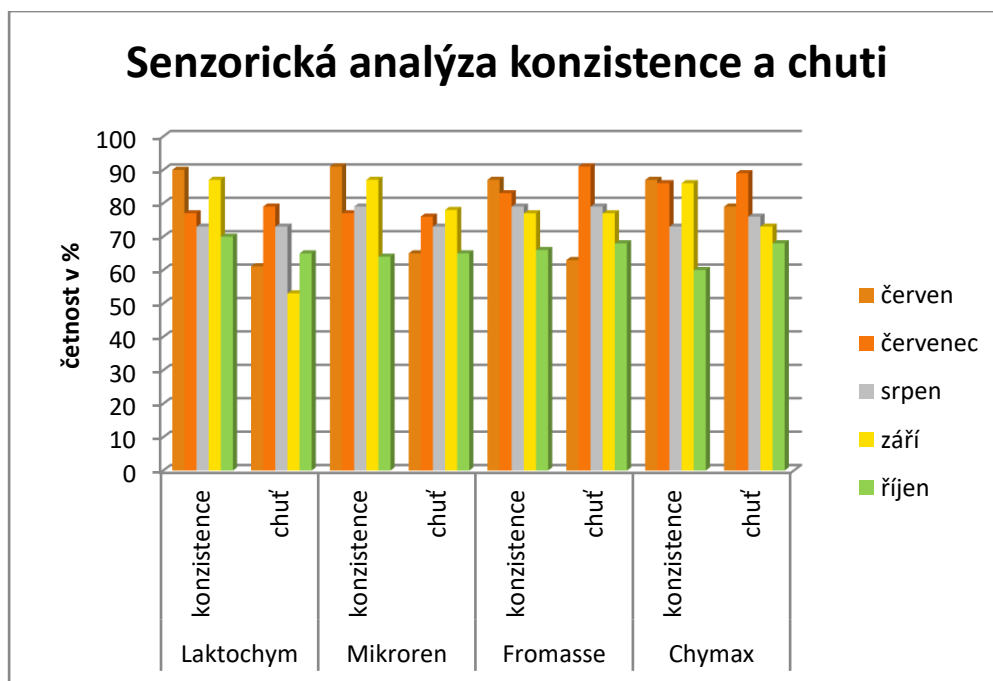
Během pěti měsíců bylo odebíráno mléko z farmy, ze kterého byly vyráběny čerstvé sýry. Výroba čerstvých sýrů probíhala v mlékařském poloprovoze Ústavu technologie potravin

Mendelovy univerzity v Brně. Mléko bylo pasterováno na teplotu 72°C a zchlazeno na teplotu 32 °C. Do mléka (2 l) byla přidána kultura (Chr. Hansen, Dánsko). Po 40 minutách předezení mléka byl přidán chlorid vápenatý a po půl minutě naměřené množství syřidla. Mléko se nechalo 50 minut v klidu. Hotová syřenina byla pokrájena na kostky o velikosti 3x3 cm a byla vložena do připravených syrařských formiček. Hotový sýr 20 minut okapával a poté byl přetočen, z důvodu rovnoměrného odkapu syrovátky. Tento postup byl opakován ještě 2x po 20 minutách.

Pro výrobu byly použity 4 různá syřidla a to Laktochym (Milcom, a.s., Česká republika), Mikroren (Milcom, a.s., Česká republika), Fromasse (VML, Francie) a Chymax (Chr. Hansen, Dánsko). Sensorické parametry byly hodnoceny za pomoci 100 mm úsečky a fyzikálně-chemické parametry byly stanoveny dle standardizovaných metod.

### Výsledky a diskuze

Nejlépe hodnocený z hlediska chuti byl sýr se syřidlem Chymax, následoval se syřidlem Fromasse, nejhůře byl hodnocen se syřidlem Laktochym, zřejmě z hlediska vyšší kyselosti sýra a případné hořkosti, která mohla být způsobena větším objemem použitého syřidla. V grafu č.1 lze vidět, že z hlediska konzistence byly nejlépe hodnoceny vzorky sýra vyrobené v červnu, naopak méně kompaktní a měkčí konzistenci měly sýry vyrobené v říjnu. Tyto změny mohou být způsobeny fyzikálně-chemickými změnami ve složení mléka. Největší výtěžnosti dosáhly sýry vyrobené pomocí syřidla Chymax. Průměrná výtěžnost zde dosahovala 92,20 g. Nejmenší výtěžnosti dosahovaly sýry vyrobené pomocí syřidla Laktochym, výtěžnost zde dosahovala 84,35 g. Syřenina byla méně pevná a pružná, což může být způsobeno kvalitou použitého syřidla, které mělo vůči ostatním typům syřidel velmi nízkou sílu syřidla. Summer et al. (2002) ve své práci uvádí, že koagulační vlastnosti mohou být ovlivněny různými faktory, mezi které řadí i koncentraci syřidla.



Graf 1: Sensorická analýza konzistence a chuti v průběhu pěti měsíců

Tabulka 1: Fyzikálně-chemické složení mléka

měsíc	pH	°SH	tuk	bílkoviny	laktóza	sušina
červen	6,69±0,01	7,73±0,01	4,17±0,5	3,20±0,01	5,35±0,06	13,12± 0,01
červenec	6,62±0,02	6,55±0,10	3,69± 0,01	3,15± 0,01	5,44± 0,01	13,49±0,01
srpen	6,67± 0,01	7,34± 0,09	4,39± 0,07	3,18± 0,02	5,42± 0,03	13,91±0,03
září	6,49± 0,02	8,15± 0,03	4,17± 0,01	2,79± 0,03	5,23± 0,17	12,91±0,01
říjen	6,43± 0,02	8,65± 0,39	4,30± 0,01	3,56± 0,01	5,11± 0,01	14,89±0,06

Největší rozdíly byly zaznamenány u °SH (Tabulka 1), kdy v měsíci červnu mělo mléko 7,73 °SH, zatímco v červenci se hodnota snížila na 6,55 °SH. V srpnu byla hodnota °SH opět vyšší, a to 7,34 a v měsících září až říjen byla průměrná hodnota °SH 8,4. Změny obsahu tuku mají také vliv na výslednou syřitelnost. S rostoucí tučností se syřitelnost zhoršuje, dochází k horšímu smršťování, což mohou způsobovat tukové globule, které zpomalují srážení a tvorbu gelu (Walstra, 1993).

### Závěr

V této práci byl hodnocen vliv použitého syřidla na senzorní parametry čerstvých sýrů. Lze konstatovat, že výběr syřidla může mít vliv na výslednou výtěžnost sýra, chuť a konzistenci. Důležitým faktorem je i množství syřidla, které může ovlivňovat chuť, zejména hořkost sýra. Velkou roli hraje i složení vstupní suroviny, ze které jsou sýry vyráběny.

### Literatura

- CALLEC, CH. Encyklopedie sýrů. 1. vyd. Čestlice: Rebo Productions. 2002. 256 s. ISBN 80-7234-225-8
- ČEJNA, V. Zkušenosti z mlékárny se syřitelností mléka ve vazbě na dodavatele mléka. 2008, Přibyslav.
- FOX, F. P.; MCSWEENEY, H. L. P.; COGAN, M. T.; GUINEE, P. T.; COTTER, D. P.; EVERETT, W. D. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, vydání 4. San Diego: Elsevier Science & Technology. Pro Quest Ebook Central. 2017. 1264 s. ISBN 978012417017.
- JACOB, M.; JAROS, D.; ROHM, H. Recent advances in milk clotting enzymes, International Journal of Dairy Technology, 2011, 63, 14–33 s.
- JANŠTOVÁ, B.; VORLOVÁ, L.; NAVRÁTILOVÁ, P.; KRÁLOVÁ, M.; NECIDOVÁ, L.; MAŘICOVÁ, E. Technologie mléka a mléčných výrobků. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012, 141 s. ISBN 978-80-7305-635-3.
- LAW, B. A.; TAMINE, A. Y. Technology of cheese making. 2010. Vol. 2nd ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 482 s. ISBN 978-1-4051-8298-0.
- MOSCHOPOULOU, E. Characteristics of rennet and other enzymes from small ruminant used in cheese production. Small Ruminant Research, 2011, 101 (1–3), 188–195.
- SUMMER, A.; MALACARNE, M.; MARTUZZI, F.; MARIANI, P. Structural and functional characteristics of Modenese cow milk in Parmigiano-Reggiano cheese production. Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma, 2002, 22: 163–174.
- WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS T. J. Dairy science and technology. Boca Raton. 2006, 808 s. ISBN 9781420028010.

**Kontaktní adresa:** Ing. Růžena Vávrová, Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 61300 Brno, Česká republika, email: xvavrov6@mendelu.cz

## Ready-to-eat foods as a possible source of *H. pylori* infection for human

Furmančíková Petra, Štástková Zora, Navrátilová Pavlína, Bednářová Ivana,  
Steinhauserová Iva

Department of Animal Origin Food and Gastronomic Sciences, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,  
University of Veterinary Sciences Brno

### Summary

*H. pylori* is currently found in more than half of the human population and it causes serious diseases of the gastrointestinal tract such as gastritis, gastric ulcers, mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma, or adenocarcinoma. Due to its zoonotic potential, *H. pylori* infection may be transmitted to humans through contaminated raw materials and food of animal origin, among other means. The aim of this study was to evaluate the microbial quality of ready-to-eat foods. Attention was paid primarily to the pathogenic bacterium *H. pylori*. The presence of *H. pylori* in ready-to-eat foods was demonstrated by the presence of the *glmM* gene using nested-PCR. *H. pylori* was detected in 25 (50%) samples of the total number 50 samples. The most positive samples (59%) were found in the group ready-to-eat foods containing pastries ( $n = 29$ ).

**Keywords:** food safety; contamination; hygiene; nested-PCR

### Introduction

The consumption of ready-to-eat foods (RTE foods) is constantly increasing worldwide. Factors influencing the consumption of RTE foods include the changing lifestyle and preferences of consumers who are looking for a combination of nutritionally rich foods with their easy and quick preparation. Equally important factors increasing the consumption of these foods are the current economic influences and the COVID-19 pandemic (Castrica et al., 2021).

The Codex Alimentarius defines RTE foods as foods (including beverages) that can be raw, cooked, processed or otherwise prepared and are in the form in which they are consumed directly by consumers (Codex Alimentarius, 2004). There is a wide range of these foods, from simple salads to complex dishes. However, unless RTE foods are made under hygienic conditions and safety, these foods can serve as a good medium for the growth of various pathogenic microorganisms. Due to the lack of heat treatment of RTE foods before their consumption, it is necessary to take into account the possible microbiological risks related to the safety of these foods. Therefore, the issue of microbial safety and quality of RTE foods has become an important topic in the protection of public health (Mengistu et al., 2020).

RTE foods can be an important source of the pathogenic bacterium *H. pylori* (Quaglia et al., 2018). It is estimated that more than 50% of the world's population is currently infected with this bacterium (Kao et al., 2016). The routes of transmission of *H. pylori* are not yet precisely known, but it has been shown that food can play an important role in the spread of this bacterium in the human population (Vale and Vitor, 2010).

### Material and methods

In this study, 50 samples of RTE food were purchased and analyzed. The selection of samples included different types of these foods (for example sandwich  $n = 5$ ; baguette  $n = 11$ ; salad  $n = 13$ ; wrap  $n = 4$ ; smoked salmon  $n = 3$ ; smoked mackerel  $n = 2$ ; carpaccio  $n = 1$ ; tortilla  $n = 2$ ). The emphasis was put on the presence of an animal component in the sample when selecting samples. The samples were purchased within 5 sampling in 6 different retail food

stores in the Czech Republic. Samples were transported and stored at 2-4 ° C. Analyzes were performed no later than two hours after the purchase of samples.

Bacterial DNA was isolated from RTE food samples using two different kits, the DNeasy mericon Food kit (QIAGEN®) and NucleoSpin Microbial DNA (Macherey-Nagel). Detection of *H. pylori* was performed by nested-PCR. This molecular biological method uses two pairs of primers to increase the specificity of the reaction: one pair of external primers and one pair of internal primers. The internal primers are seeded onto a sequence that is bordered by the external primers. First, the reaction with the external primers is performed and the resulting product is used as a template for the reaction with the internal primers. This combination of primers increases the probability of amplifying only that specific stretch. Oligonucleotide primers were used for the amplification according to the publication by Quaglia et al. (2009). The reaction mixture was prepared from PPP Master mix (Top-Bio s.r.o., Vestec, Czech Republic), PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio s.r.o., Vestec, Czech Republic), Hp 1 and Hp 2 (0.5 μM). Then 2 μl of extracted DNA was added to 23 μl of this mixture. The nested-PCR method was performed using a thermocycler under the following conditions: 95 °C for 2 min, followed by 33 cycles (94 °C for 1 min, 61 °C for 2 min, 72 °C for 1.5 min), the final synthesis at 72 °C for 5 min and cooling to 6 °C. At the end of the amplification, 2 μl of the final product from the first reaction were added to the second reaction mixture of the same composition as in the first reaction, only with the difference of the primers added (Hp 3 and Hp 4). The amplification conditions of the second reaction were as follows: 95 °C for 2 minutes, followed by 30 cycles (94 °C 1 min, 62 °C 2 min, 72 °C 1.5 min), final synthesis 72 °C for 5 minutes. The samples were cooled to 6 °C. Electrophoretic separation in 1.5% agarose gel followed by visualization under UV light was used to detect PCR products. The electrophoresis was performed at 120 V, 90 mA for 60 min. DNA Ladder of 100-4000 bp (Lonza Rockland, Inc., Rockland, USA) was used as a marker. *H. pylori* DNA from a strain obtained from a human gastric mucosal sample was used as a positive control.

## Results and Discussion

Samples of RTE foods were divided into the following three groups: RTE foods containing pastries ( $n = 29$ ), salads ( $n = 13$ ) and others ( $n = 8$ ). In this study, a total of 50 RTE food samples were analyzed using the nested-PCR molecular biological method. Of the total number of samples, 50% were tested positive for *H. pylori*. The highest number of positive samples (59%) was found in the group of RTE foods containing pastries (sandwich  $n = 2$ ; baguette  $n = 7$ ; wrap  $n = 3$ ; croissant  $n = 1$ ). In the second group (salads) the presence of the *glmM* gene was confirmed in 31% of the samples. In the group marked other, the presence of *H. pylori* was confirmed in 50% of the samples (carpaccio  $n = 1$ ; shrimps from surimi  $n = 1$ ; smoked salmon  $n = 1$ ; smoked mackerel  $n = 1$ ). Meng et al. (2007) found the presence of *H. pylori* in 44% of analyzed RTE foods. Sushi samples containing raw tuna slices using multiplex PCR were analyzed in this study. Samples of sushi were purchased directly at the restaurant. Because it is highly unlikely that *H. pylori* resides in living tuna fish, Meng et al. (2007) suggest that the original source of *H. pylori* in the samples may be chefs and workers who prepare the sushi. The sushi might be contaminated through workers' hands, water, tools and equipment that they used. In an Iranian study analyzing a total of 550 ready-to-eat food samples, 74 samples were tested positive for *H. pylori* (13%). The most commonly contaminated were different type of salads such as fruit salads, olive salads and salads from restaurants (Hemmatinezhad et al., 2016). Poms et al. (2001) tested the survival of *H. pylori* in ready-to-eat foods at 4 °C. In this study various ready-to-eat foods were inoculated *H. pylori* and observed the survival of it at 4 °C under aerobic conditions. *H. pylori* was

recovered from inoculated pasteurized milk and tofu samples up to 5 days later. It was also recovered in inoculated leaf lettuce and raw chicken up to 2 days later. Based on the results obtained by Poms et al. (2001), in this study we assume that *H. pylori* may survive in food and subsequently infect consumers.

### Conclusion

The routes of transmission of *H. pylori* to humans are not exactly known, but foods are among the most frequently mentioned vehicles. The results of this study show that ready-to-eat foods appear to be a possible source of *H. pylori* infection for humans. However, more comprehensive study, including more samples from several markets and also restaurants, may provide more valuable information about the prevalence of *H. pylori* in RTE foods and may provide more insight into the mechanism of transmission of *H. pylori*.

### Acknowledgements

This study was supported by a project IGA University of Veterinary Sciences Brno 214/2021/FVHE.

### References

- CODES ALIMENTARIUS COMMISSION. Risk Assessment of *Listeria monocytogenes*. In ready to eat foods: interpretative summary. *FAO/WHO*. 2004.
- HEMMATINEZHAD, B., MOMTAZ, H., RAHIMI, E. *VacA*, *cagA*, *iceA* and *oipA* genotypes status and antimicrobial resistance properties of *Helicobacter pylori* isolated from various types of ready to eat foods. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2016, vol. 15, no. 2, p. 1-9.
- KAO, CH. Y., SHEU, B. S., WU, J. J. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomedical Journal*. 2016, vol. 39, no. 1, p. 14-23.
- MENG, X., ZHANG, H., LAW, J., TSANG, T. Detection of *Helicobacter pylori* from food sources by a novel multiplex PCR assay. *Journal of Food Safety*. 2008, vol. 28, p. 609-619.
- MENGISTU, D. A., TOLERA, S. T., CASTILLO, A. Prevalence of microorganisms of public health significance in ready-to-eat foods sold in developing countries: Systematic review and meta-analysis. *International Journal of Food Science*. 2020, vol. 2020, p. 1-9.
- POMS, R.E., TATINI, S.R. Survival of *Helicobacter pylori* in ready-to-eat foods at 4 degrees C. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 63, no. 3, p. 281-286.
- QUAGLIA, N. C., DAMBROSIO, A. *Helicobacter pylori*: A foodborne pathogen? *World Journal of Gastroenterology*. 2018, vol. 24, no. 31, p. 3472-3487.
- QUAGLIA, N. C., DAMBROSIO, A., NORMANNO, G., CELANO, G. V.: Evaluation of a Nested-PCR assay based on the phosphoglucosamine mutase gene (*glmM*) for the detection of *Helicobacter pylori* from raw milk. *Food Control*. 2009, vol. 20, no. 2, p. 119-123.
- VALE, F. F., VÍTOR, J. M. B. Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: Does food play a role in rural and urban areas? *International Journal of Food Microbiology*. 2010, vol. 138, no. 1-2, p. 1-12.

**Contact address:** Petra Furmančíková, Mgr., Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE VETUNI BRNO, Palackého třída 1946/1, 612 42, H19009@vfu.cz

# **SEKCE 2**

## **Chov zvířat, výživa zvířat a biochemie**

## The Effectiveness of a Husked White Lupine Seed Meal Based Diet on the Production Indicators of Ducks During the Fattening Period

<sup>1</sup>Kutlvašr Martin, <sup>1</sup>Straková Eva, Suchý Pavel

<sup>1</sup>Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno

### Summary

The results of the work were based on experimental biological monitoring, where diets with different sources and protein-content components were tested in the fattening of Cherry Valley ducks. The aim of this work was to verify the possibility of replacing soybean extract meal with meal from the Zulika variety of husked white lupine seeds. The control group of ducks was fed a complete soybean protein-based feed mixture and the experimental group was fed a complete lupine protein-based feed mixture with 50% and 100% replacement of soybean extract meal. The experiment's results prove that a lupine-based diet has a positive effect ( $P \leq 0.05$ ) on the live weight, mortality, feed mixture conversion and overall fattening efficiency of ducks, as expressed by the fattening efficiency index.

**Keywords:** Feed mixture; white lupine; Zulika, duck, fattening

### Introduction

Regarding animal nutrition, the European Union is asking individual member states to be self-sufficient when it comes to producing protein feed. In the Czech Republic, legumes appear to be an appropriate protein crop given that lupines are considered particularly effective from the viewpoint of raw protein production or, in other words, from the viewpoint of producing essential amino acids. Lupine protein is characterised by a high proportion of arginine, essential amino acids in poultry nutrition. As many authors have documented, lupine seeds and green matter is seen as a very good source of protein in livestock nutrition (Uhlířová et al., 2018; Hejdysz et al., 2018; Kubiś et al., 2018). Yang et al. (2017) points out that it is also important to assess the impact of white lupine on the health of animals when it comes to the optimal use of white lupine seeds in diets intended for fattening ducks.

### Material and Methods

The submitted work presents the partial results of the doctoral work. The aim of the doctoral work is to verify the possibility of replacing soybean extract meal with the Zulika variety of husked white lupine seed meal in complete feed mixtures intended for fattening broiler chickens and ducks. The presented work focuses on selected production indicators obtained from the biological monitoring of feeding ducks with a fattening period of 42 days. The results expand on the issue that was presented at the “XXIII Conference of Young Scientists with International Participation” in 2021. The design of the biological monitoring was based on experiments on Cherry Valley broiler ducks that were fed complete VKCH feed mixture



pursuant to Utility Sample No. 31532. For experimental biological monitoring, the feed mixture was optimised and balanced so as to biologically verify both the 50% and the 100% replacement of soybean extract meal with husked white lupine seed meal. Three groups of broiler ducks were created: the K0% control group – feed mixture based on soybean extract meal with meal (F 34 + M 34 pieces), the experimental group P50% – 50% replacing soybean extract meal with lupine meal (F 34 + M 34 pieces) and the experimental group P100% – 100% replacing soybean extract meal with lupine meal (F 34 + M 34 pieces). The groups were monitored separately based on sex. The utility indicators were expressed both in terms of sex and without sex differentiation on the grounds of practical application of achieved results in agriculture, where, in the Czech Republic, poultry fattening is usually done without regard for sex differentiation. From the obtained efficiency results, the presented work only illustrates partial results, particularly in the development of live weight in the monitored phases of the fattening period, the mortality, the feed mixture conversion and the fattening efficiency index, labelled as the European factor of production effectiveness, where given an excellent gene pool and environmental conditions, this index exceeds 300. A fattening value of 300 or more is considered cost effective. Biological monitoring is conducted in an accredited lab at the Veterinary University in Brno with controlled temperature, light and feeding technology regime in a deep litter. The results were processed using mathematical-statistics methods (Unistat 5.6), using Tukey-HSD tests. The files are characterised by a mean value ( $\bar{x}$ ) and standard deviation ( $\pm$  SD). The difference between the average values was tested on the significant level of  $P \leq 0.05$  (ab, cd).

## Results and Discussion

The results of the work were processed and evaluated both in terms of sex and without regard for sex differentiation. The results will be presented at the conference comprehensively. The results without regard for sex differentiation are presented below. Table 1 illustrates the average live weight of Cherry Valley ducks without sex differentiation in partial phases of the fattening period. Statistically significant differences ( $P \leq 0.05$ ) between the monitored groups were monitored from the 10<sup>th</sup> day of fattening in favour of the P100% group, which recorded the highest average live weight in the monitored phases of fattening. No ducks died during the whole fattening period (42 days). Four male ducks died in the K0% control group, and one duck died in the P50% and P100% experimental group respectively. Table 2 illustrates the feed mixture conversion at individual stages from the beginning of the fattening. The feed mixture conversion is one of the most significant factors of economic prosperity in poultry fattening. During monitoring of the feed mixture conversion at individual stages from the beginning of the fattening, the P50% group (Table 2) recorded the best conversion at the end of the fattening.

Table 1: Average live weight of ducks without regard for sex differentiation (FM) in kg

FM	1 <sup>st</sup> day	10 <sup>th</sup> day	21 <sup>st</sup> day	35 <sup>th</sup> day	42 <sup>nd</sup> day
<b>K0%</b>	<b>0.05</b> $\pm$ 0.005	<b>0.24bd</b> $\pm$ 0.057	<b>1.02bd</b> $\pm$ 0.138	<b>2.51b</b> $\pm$ 0.254	<b>3.22b</b> $\pm$ 0.279
<b>P50%</b>	<b>0.05</b> $\pm$ 0.005	<b>0.32bc</b> $\pm$ 0.030	<b>1.28bc</b> $\pm$ 0.101	<b>2.53b</b> $\pm$ 0.230	<b>3.39a</b> $\pm$ 0.268
<b>P100%</b>	<b>0.05</b> $\pm$ 0.004	<b>0.35a</b> $\pm$ 0.040	<b>1.37a</b> $\pm$ 0.135	<b>2.85a</b> $\pm$ 0.246	<b>3.47a</b> $\pm$ 0.279

Table 2: Feed mixture conversion in ducks without regard for sex differentiation (FM) in g/kg of live weight at individual stages from the beginning of the fattening

FM	1 <sup>st</sup> - 10 <sup>th</sup> day	1 <sup>st</sup> - 21 <sup>st</sup> day	1 <sup>st</sup> - 35 <sup>th</sup> day	1 <sup>st</sup> - 42 <sup>nd</sup> day
K0%	1.13	1.46	1.82	2.33
P50%	1.17	1.45	2.11	2.27
P100%	1.11	1.46	2.06	2.71

According to the fattening efficiency index for the whole fattening period (Table 3), the P50% experimental group proved to have the best fattening efficiency.

Table 3: Fattening efficiency index (FEI) of Cherry Valley ducks without regard for sex differentiation (FM)

FEI	FEI	%
K	317	100.0
P50%	344	108.6
P100%	299	94.4

Our results are in line with the work of Olver (1997), who ascertained no negative effects ( $P < 0.05$ ) when studying white lupine (*Lupinus albus*, Buttercup variety) in Cherry Valley ducks on the live weight, carcass weight and weight content of carcass. Similarly, a study conducted by Jeřábek et al. (2017) also confirmed that using white lupine in nutrition intended for poultry fattening categories is safe.

## Conclusion

Based on the results obtained during the fattening period of Cherry Valley ducks factoring in sex and without sex differentiation and based on the experience acquired in the QJ1510136 project conducted by the National Agency for Agricultural Research, supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, with the support of the achieved feeding efficiency index value, we believe that 50% replacement of soybean extract meal with the Zulika variety of husked white lupine seed meal seems optimal.

## Acknowledgement

The results of the work were financially supported by the “Optimisation of Protein Nutrition of Monogastric Animals based on White Lupine (*Lupinus albus*) Seed Varieties” QJ1510136 project conducted by the National Agency for Agricultural Research.

## References

HEJDYSZ, M.; KACZMAREK, S.A.; ROGIEWICZ, A.; RUTKOWSKI, A. Influence of graded dietary levels of meals from three lupin species on the excreta dry matter, intestinal viscosity, excretion of total and free sialic acids, and intestinal morphology of broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 2018, 241, p. 223-232.

JEŘÁBEK, M.; SUCHÝ, P.; STRAKOVÁ, E.; KUDĚLKOVÁ, L.; ŠIMEK, V.; JAKEŠOVÁ, P.; MACHÁČEK, M.; ZAPLETAL, D. Selected blood biochemical indicators of Cherry Valley ducks undergoing fattening in relation to their diet and sex. *Veterinarni Medicina*, 2018, vol. 63, p. 420-432.

KUBÍŠ, M.; KACZMAREK, S.A.; NOWACZEWSKI, S.; ADAMSKI, M.; HEJDYSZ, M.; RUTKOWSKI, A. Influence of graded inclusion of white lupin (*Lupinus albus*) meal on performance, nutrient digestibility and ileal viscosity of laying hens. *British Poultry Science*, 2018, vol. 59, no. 4, p. 477-484.

OLVER, MD. Effect of sweet lupins on duckling growth. *British Poultry Science*, 1997, vol. 38, no. 1, p. 115-117.

UHLÍŘOVÁ, L.; VOLEK, Z.; MAROUNEK, M. White Lupin bran and its effects on the growth performance, carcass characteristics and digestibility of nutrients in fattening rabbits. *World Rabbit Science*, 2018, vol. 26, no. 1, p. 1-6.

YANG, JJ.; JEONG, DH.; UM, SM.; LEE, AN.; SONG, DJ.; KIM, SB.; YANG, J.; YUN, Y.; LIM, YK. Blood chemistry reference intervals of captive Asiatic black bears (*Ursus thibetanus*). *Veterinarni Medicina*, 2017, vol. 62, p. 533-540.

**Contact address:** Martin Kutlvašr, MVDr., Department of Animal Breeding, Animal Nutrition and Biochemistry, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H20354@vfu.cz

## Aktivita glutathion peroxidázy v plné krvi klinicky zdravých psů - pilotní studie

### Activity of glutathion peroxidase in full blood of clinically healthy dogs – a pilot study

<sup>1</sup>Zentriciová Viola, <sup>1</sup>Pechová Alena

<sup>1</sup>Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita, Brno

#### Summary

Glutathion peroxidase (GPx) is an important antioxidant. It is responsible for transformation of hydrogen peroxide into water. There is a need for more studies, looking into glutathion peroxidase levels in dogs. So far, there is no generally accepted reference range. The aim of this pilot study was to measure glutathion peroxidase level in full blood of clinically healthy dogs. The secondary goal was to identify factors affecting the activity of GPx. The assay was performed using an automatized biochemical analyzer and commercially available kits (Randox). A total of 42 samples were analyzed. The average GPx activity was 1170  $\mu\text{kat/l}$  and the median was 1155  $\mu\text{kat/l}$ . The minimum value was 725  $\mu\text{kat/l}$  and the maximum 1708  $\mu\text{kat/l}$ . Furthermore, the dogs were divided into groups according to size, age and sex, but none of these factors had a statistically significant effect. However, a numerical difference was observed for sex - males had higher GPx activity than females and castrated individuals had higher activity than intact animals. These factors should therefore be considered when selecting a group of animals for further research.

**Keywords:** antioxidant; selenium; sex; age; size; canis

#### Úvod

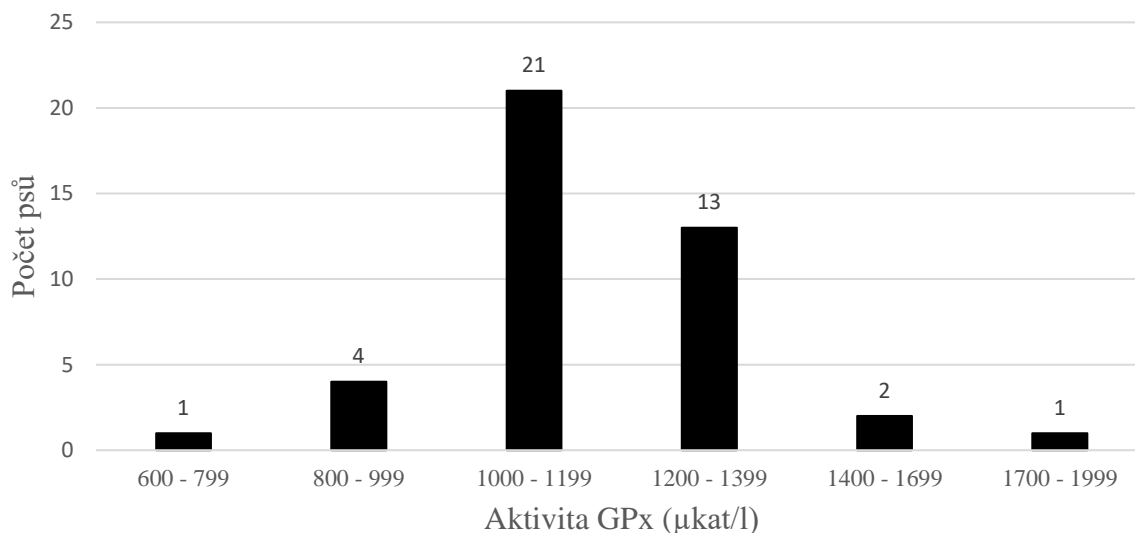
Glutathion peroxidáza je důležitý antioxidační enzym. Chrání organismus před hydroperoxydy vodíku katalýzou jejich přeměny na vodu. Je důležitým ukazatelem antioxidační kapacity a u některých druhů zvířat může být použita jako nepřímý ukazatel zásobení organismu selenem (Harapin et al., 2000; Wichtel et al., 1996). Její použití k tomuto účelu u psů zatím nebylo spolehlivě prokázáno (Stowe et al., 2006; van Zelst et al., 2016). Také do dnešní doby nebyly vytvořeny žádné obecně uznávané referenční hodnoty pro aktivitu glutathion peroxidázy u psů, ať už v plné krvi, séru, nebo jiných biologických materiálech. Cílem této pilotní studie bylo změřit aktivitu GPx v plné krvi psů. Dalším cílem bylo identifikovat faktory, které aktivitu tohoto enzymu ovlivňují. Hodnoceny byly věk, váha a pohlaví psů.

#### Materiál a metody

Vzorky byly získány ve spolupráci s veterinárními lékaři v rámci jejich preventivní a diagnostické činnosti. Majitelé psů uvedli informace o věku a pohlaví a psi byli před odběrem zváženi. Odběr probíhal z v. *cephalica antebrachii*. Přibližně 1 ml krve byl odebrán do zkumavek s heparinátem sodným. Vzorky byly následně zamrazeny na  $-80^{\circ}\text{C}$  a rozmrazeny až bezprostředně před analýzou. Celkem se podařilo získat 42 vzorků. Samotná analýza probíhala pomocí komerčně dostupného setu (Randox) na automatickém biochemickém analyzátoru dle metody popsané Paglia a Valentine (1967). Pro statistické zpracování dat byl použit program UNISTAT 6.0 (Unistat Ltd, Londýn, Velká Británie). Normální rozložení dat bylo testováno pomocí Kolmogorov-Simonova testu a dle výsledků byla použita jednofaktorová ANOVA nebo Mann-Whitney U test. Hladina statistické signifikance byla určena na  $p \leq 0,05$ .

## Výsledky

Průměrná aktivita glutathion peroxidázy v plné krvi psů byla 1170  $\mu\text{kat/l}$ , medián byl 1155  $\mu\text{kat/l}$ . Minimální hodnota byla 725  $\mu\text{kat/l}$  a maximální 1708  $\mu\text{kat/l}$ . Graf 1 znázorňuje rozložení hodnot v souboru vzorků.



Graf 1: Rozložení hodnot v souboru vzorků

Výsledky pro jednotlivé skupiny psů (rozdělené dle věku a velikosti zvířat) jsou uvedeny v Tabulce 1. Tabulka 2 prezentuje výsledky dle pohlaví a kastrace. Pro žádný ze sledovaných faktorů nebyla pozorována statistická významnost. Číselný rozdíl byl ale pozorován u pohlaví, kdy samci měli vyšší aktivitu GPx než samice a kastrování jedinci vyšší aktivitu než intaktní zvířata.

Tabulka 1: Průměrná aktivita glutathion peroxidázy dle věku a velikosti

	Věk (roky)						Váha (kg)		
	$\leq 2$	3	4	5 - 6	7 - 9	$\geq 10$	< 10	10 - 30	> 30
Počet psů	7	7	7	6	8	7	11	18	13
Aktivita GPx ( $\mu\text{kat/l}$ )	1114	1278	1172	1094	1169	1181	1217	1106	1158

Tabulka 2: Průměrná aktivita glutathion peroxidázy dle pohlaví a kastrace

	Pohlaví		Kastrace		Samice		Samci	
	Samec	Samice	Ano	Ne	Kastrované	Nekastrované	Kastrovaní	Nekastrovaní
Počet psů	19	23	22	20	14	9	8	11
Aktivita GPx ( $\mu\text{kat/l}$ )	1200	1144	1124	1220	1122	1180	1129	1252

## Diskuze

Naše výsledky aktivity glutathion peroxidázy v krvi se shodují s předchozími studiemi. Plavec et al. (2008) naměřili medián 910  $\mu\text{kat/l}$  u 31 zdravých psů. Další dvě studie vyjadřovaly aktivitu GPx na gram hemoglobinu, místo na objemovou jednotku. Za předpokladu, že referenční rozmezí hemoglobinu je 120–180 g/l (KLMZ, 2022), Kapun et al.

(2012) uvádí aktivitu 790–1185  $\mu\text{kat/l}$  pro 17 zdravých psů. Tomsič et al. (2016) potom 960–1140  $\mu\text{kat/l}$  u 30 zdravých zvířat. Jediný statisticky významný faktor ovlivňující aktivitu GPx v krvi uváděný dřívějšími studiemi je věk psů. V plné krvi (Stowe et al., 2006) i v plazmě (Vajdovich et al., 1997) glutathion peroxidáza stoupala s věkem. To se nám ovšem nepodařilo potvrdit.

### Závěr

Naše výsledky a závěry odpovídají dříve publikovaným studiím, s výjimkou stoupaní aktivity glutathion peroxidázy s věkem, které jsme nepotvrdili. I když naše studie vyšetřovala větší skupinu psů než dřívější práce, stále tento počet psů není dostatečný. Při výběrů jedinců pro další výzkum by měl být brán zřetel na věk, pohlaví a kastroční status psů. Dále je vhodné stanovovat obsah hemoglobinu, aby byla studie porovnatelná s více zdroji.

### Poděkování

Studia byla finančně podpořena projektem IGA VETUNI 201/2021/FVHE.

### Literatura

- HARAPIN, I.; BAUER, M.; BEDRICA, L.; POTOČNĚJAK, D. Correlation between glutathione peroxidase activity and the quantity of selenium in the whole blood of beef calves. *Acta Veterinaria Brno*. 2000, vol. 69, s. 87-92.
- KAPUN, A. P.; SALOBIR, J.; LEVART, A.; KOTNIK, T. et al. Oxidative stress markers in canine atopic dermatitis. *Research in veterinary science*. 2012, vol. 92, no. 3, s. 469-470.
- PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The journal of laboratory and clinical medicine*. 1967, vol. 70, no. 1, s. 158-169.
- PLAVEC, T.; NEMEC SVETE, A.; BUTINAR, J.; TOZON, N. et al. Antioxidant status in canine cancer patients. *Acta Veterinaria (Beograd)*. 2008, vol. 58, no. 2-3, s. 275-286.
- STOWE, H. D.; LAWLER, D. F.; KEALY, R. D. Antioxidant status of pair-fed labrador retrievers is affected by diet restriction and aging. *The journal of nutrition*. 2006, vol. 136, no. 7, s. 1844-1848.
- TOMSIČ, K.; SELIŠKAR, A.; LUKANC, B.; NEMEC SVETE, A. Plasma total antioxidant capacity and activities of blood glutathione peroxidase and superoxide dismutase determined in healthy dogs by using commercially available kits. *Acta Veterinaria (Beograd)*. 2016, vol. 66, no. 4, s. 534-548.
- VAJDOVICH, P.; GAÁL, T.; SZILÁGYI, A.; HARNOS, A. Changes in some red blood cell and clinical laboratory parameters in young and old beagle dogs. *Veterinary research communications*. 1997, vol. 21, s. 463-470.
- VAN ZELST, M.; HESTA, M.; GRAY, K.; STAUNTON, R. et al. Biomarkers of selenium status in dogs. *BMC Veterinary research*. 2016, vol. 12, s. 15.
- Klinická laboratoř pro malá zvířata, 2020. [online]. KLMZ. [cit. 10.5.2022]. Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/ckl/pokyny.html>. 2022.
- WICHTEL, J. J.; THOMPSON, K. G.; WILLIAMSON, N. B. Serum glutathione peroxidase activity reflects short-term increases in selenium intake in goats. *New Zealand veterinary journal*. 1996, vol. 44, no. 4, s. 148-150.

**Kontaktní adresa:** Viola Zentrichová, MVDr., Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, [zentrichovav@vfu.cz](mailto:zentrichovav@vfu.cz)

# **SEKCE 3**

## **Ochrana zvířat, welfare a etologie**

## **Analýza výsledků kontrolní činnosti Státní veterinární správy na hospodářstvích v letech 2016 – 2020**

### **Analysis of the results of control activities of the State Veterinary Administration on farms in the years 2016-2020**

**Švestková Michaela**

*Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno*

#### **Summary**

*The State Veterinary Administration, as part of its inspection activities, carries out several thousand inspections every year at establishments such as the breeder's holding. This paper is devoted to the analysis of the results of non-administrative inspections, so-called from the field, which were carried out in the years 2016-2020. For these, the PI's are the following: cross compliance (cc), epizootiological (edo) and animal welfare (wel). It is the evaluation of inspection points that is crucial for breeders during the inspection. They are designed so that the final result bears the maximum telling value. The aim is at entities such as natural persons, individual entrepreneurs and legal entities. For animal species, this applies to cattle, sheep, goats, horses, pigs, poultry and waterfowl, runners, farmed game and freshwater fish. Data from the Central Veterinary Administration of the State Veterinary Administration were used for the analysis. The general evaluation of the data was carried out using Microsoft Excel. The aim of this paper is, based on the results from the inspection activities of the State Veterinary Administration, to analyze the most common violations at establishments such as the breeder's farm in the years 2016-2020, to evaluate the degree of severity and, if necessary, to suggest options that could help breeders to prevent given offenses.*

**Key words:** *inspection; control; livestock; animal protection; welfare; epizootiology; cross compliance*

#### **Úvod**

Státní veterinární správa (2022), dále SVS, uvádí, že v rámci dozoru péče o pohodu zvířat se vychází především ze zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů (veterinární zákon) a dále ze zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů. Tyto právní předpisy stanovují požadavky, jak zvířata správně chovat a starat se o ně a také uvádějí zakázané postupy chovu a manipulace se zvířaty. Definované standardy jsou však považovány za minimální požadavky na zajištění základních biologických, fyziologických a etologických potřeb zvířat.

Kontroly dodržování podmínek legislativy v oblasti ochrany zvířat a dobrých životních podmínek zvířat provádí v rámci celé České republiky SVS (2021). Krajské veterinární správy (KVS) vykonávají dozor nad dodržováním povinností uložených chovatelům a ostatním fyzickým a právnickým osobám na úseku ochrany zvířat a péči o jejich pohodu podle jejich územní příslušnosti. Vyšetřování trestné činnosti na daném úseku provádí Policie ČR v součinnosti se státním zastupitelstvím.

Samotné kontroly jsou plánovány na základě centrálně provedené analýzy rizika nebo podaného podnětu. V případě, že jsou během kontroly zjištěny nedostatky, které není možné na místě odstranit, je chovateli uložen závazný pokyn se stanoveným termínem k nápravě těchto nedostatků. Splnění závazného pokynu je přezkoumáváno během následné kontroly (SVS, 2021).



## Materiál a metody

Pro analýzu výsledků kontrolní činnosti SVS na hospodářstvích byla použita data získaná od Ústřední veterinární správy Státní veterinární správy. Databáze obsahuje údaje z neadministrativních kontrol provedených v letech 2016-2020. Celkem se jedná o 25 905 záznamů provedených kontrol na počtu 25 606 provozoven typu hospodářství chovatele.

Cílem bylo vyhodnotit následující:

- kontrolovaná hospodářství dle typu subjektu (FO, FO-P, PO),
- provedené kontroly celkem a kontroly dílčí (dále DK) (epizootologické = „epi“, cross compliance/kontrola podmíněnosti = „cc“, welfare = „wel“) → vyhodnocení množství kontrol nevyhovujících,
- míra pochybení dle typu subjektu vs. dílčí kontroly,
- analýza míry porušení kontrolních bodů v rámci jednotlivých druhů zvířat (skot, ovce, kozy, koně, prasata, drůbež hrabavá, drůbež vodní, běžci, farmová zvěř, ryby sladkovodní).

Data byla následně zpracována a graficky vyhodnocena v programu Microsoft Excel 2019.

## Výsledky a diskuze

Tabulka 1: Počet kontrolovaných hospodářství dle typu subjektu v letech 2016-2020.

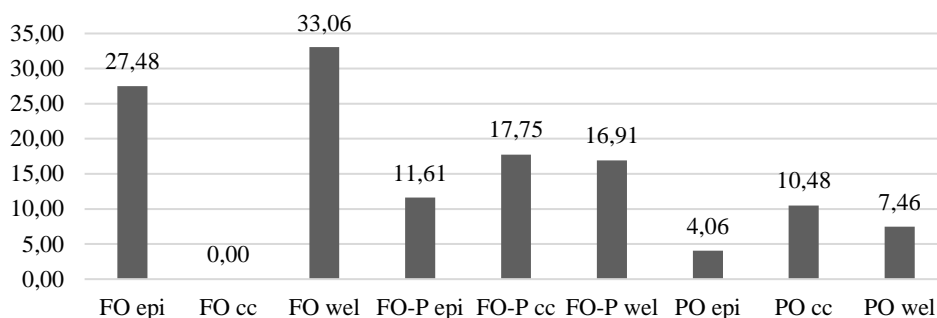
	fyzická osoba	fyzická osoba - podnikatel	právnícká osoba	celkem
2016	276	2640	2199	5115
2017	225	3066	2398	5689
2018	304	2797	2274	5375
2019	325	2383	2067	4775
2020	271	2244	2137	4652
celkem	1401	13130	11075	25606

Nejvyšší počet hospodářství, kde byla uskutečněna inspekce byl zjištěn u fyzických osob – podnikatelů. Tento výsledek je dán základní podmínkou SZIF (2022) pro získání zemědělské dotace, tj., že žadatel musí být zemědělským podnikatelem a aktivním zemědělcem. U právnických osob je počet kontrolovaných hospodářství podobného rázu jako u podnikatelů, a to opět ze stejného důvodu. Při hodnocení počtu kontrolovaných hospodářství celkem mezi jednotlivými roky nebylo zjištěno výraznějších odlišností.

Tabulka 2: Vyhodnocení provedených a z toho nevyhovujících kontrol dle typu DK v letech 2016-2020.

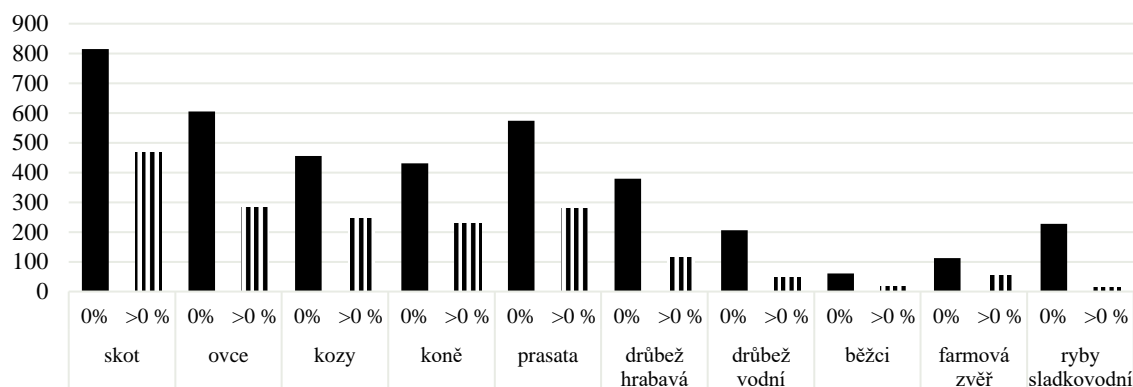
	počet kontrol (DK celkem)	kontroly „epi“	kontroly „epi“ nevyhovující	kontroly „cc“	kontroly „cc“ nevyhovující	kontroly „wel“	kontroly „wel“ nevyhovující	počet nevyhovujících kontrol celkem	nevyhovující kontroly v %
2016	5267	3329	303	575	83	1938	231	617	11,71
2017	5601	3601	256	547	64	2000	235	555	9,91
2018	5314	3441	253	545	80	1873	281	614	11,55
2019	4881	3111	326	534	70	1770	334	730	14,96
2020	4842	3276	281	435	55	1566	294	630	13,01
celkem	25905	16758	1419	2636	352	9147	1375	3146	12,14

Dílčí kontroly epizootologické („epi“) a cross compliance („cc“) byly v některých případech provedeny 1-3krát v daném roce v rámci jednoho hospodářství/subjektu. Proto jsou zde počty vyšší, než jak je uvedeno v tabulce 1. Nevyhovující kontroly u DK „epi“ tvoří 8,46 %, u „cc“ 13,35 % a u kontrol „wel“ je to 15,03 %. Tento výsledek poukazuje na vyšší četnost porušení v oblasti welfare. Při hodnocení v letech se nevyhovující kontroly pohybují zhruba od 10 do 15 %. Nejméně vykazuje rok 2017, naopak nejvíce zjištěných pochybení bylo v roce 2019.



Graf 1: Míra pochybení dle typu subjektu vs. typu DK (v %).

Jelikož u fyzických osob nejsou prováděny kontroly cross compliance, nebyla zde zjištěna žádná hodnota. DK „cc“, jak už je zmíněno u tabulky 1, jsou prováděny u fyzických osob – podnikatelů a osob právnických. V rámci hodnocení těchto dvou typů subjektů (FO-P a PO) vykazuje DK „cc“ nejvyšší míru pochybení. Následuje welfare a nejméně dělá chovatelům problém naplňovat požadavky u kontrol epizootologických. Znepokojujícím výsledkem je vysoká míra pochybení u fyzických osob u obou DK. V oblasti welfare je to 33,06 % a u epizootologie 27,48 %. Důvodem k tomu může být např. nulová finanční motivace (FO nežadají o dotace) a mnohdy také nevědomost, špatná informovanost a nízká úroveň vzdělání v oblasti chovatelství a veterinární péče.



Graf 2: Porušení kontrolních bodů v rámci jednotlivých druhů zvířat.

Kontrolní body jsou zjišťované oblasti či dokonce konkrétní otázky na chovatele, kterými je řízen celý průběh kontroly. Nejvyšší množství porušených kontrolních bodů bylo zaznamenáno u skotu, ovcí, prasat, koz a koní, právě v tomto pořadí.

### Závěr

Analýza kontrolní činnosti Státní veterinární správy na hospodářstvích v letech 2016-2020 vychází z počtu 25 606 provozoven typu hospodářství chovatele a 25 905 provedených kontrol. Jednotlivé kontroly jsou děleny na tzv. dílčí kontroly z oblasti epizootogické, cross compliance (kontrola podmíněnosti) a welfare.

Z hlediska typu subjektu bylo nejvíce kontrol provedeno u fyzické osoby – podnikatele a právnické osoby. Důvodem k tomu je základní podmínka ze SZIF, která udává žadateli o dotaci povinnost být zemědělským podnikatelem a s tím jsou zde spojené i povinně prováděné kontroly podmíněnosti. Co se týče prokázání míry pochybení v rámci typu subjektu a typu dílčí kontroly, tak nejvyšších čísel jednoznačně dosahovala fyzická osoba, jak v oblasti epizootogické, tak i welfare. Tento fakt je velmi znepokojující a bylo by vhodné se v tomto směru více zaměřit na odstranění příčiny. Zde mimo jiné také hraje roli nulová finanční motivace, kdy fyzické osoby nemohou žádat o dotace, tzn., nejsou nijak finančně ohodnoceni a motivováni. Hlavním důvodem je však nedostatečná informovanost o

veterinární péči a nízká úroveň vzdělání v oboru chovatelství. V tomto směru by bylo vhodné ze strany SVS provádět pravidelné workshopy a školení z oblasti jak veterinární péče, tak právě i chovatelství, a především tomu zajistit vhodnou propagandu. Je nutné, aby se potřebné informace dostaly k co možná nejvyššímu počtu chovatelů.

### Poděkování

Tímto děkuji panu Mgr. et Ing. Truhlářovi, Dr. h. c. z Ústřední veterinární správy Státní veterinární správy za souhlas k poskytnutí výsledků kontrolní činnosti SVS ČR a rovněž paní Ing. Richtrové za perfektní spolupráci při generování databáze. Současně bych ráda poděkovala také svému Ústavu ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství za podporu při snaze o získání těchto dat.

### Literatura

STÁTNÍ VETERINÁRNÍ SPRÁVA, *Ochrana zdraví zvířat a péče o jejich pohodu* [online]. Praha: Ústřední veterinární správa Státní veterinární správy, 2022 [cit. 2022-05-14]. Dostupný z WWW: <<https://www.svscr.cz/zdravi-zvirat/>>.

*Informace o programu ochrany zvířat* [online]. Praha. Státní veterinární správa. Březen 2021 [cit. 2022-05-14]. Informační bulletin. Dostupné z WWW: <<https://www.svscr.cz/wp-content/files/dokumenty-a-publikace/ib2103.pdf>>.

STÁTNÍ ZEMĚDĚLSKÝ INTERVENČNÍ FOND, *Přímé platby* [online]. Praha: Státní zemědělský intervenční fond, 2022 [cit. 2022-05-14]. Dostupný z WWW: <<https://www.szif.cz/cs/prime-platby?setCookie=true>>.

**Kontaktní adresa:** Michaela Švestková, Ing., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H20341@vfu.cz

## Poškození jater zjištěná na jatkách a welfare zvířat

### Liver damage detected in slaughterhouses and animal welfare

Válková Lenka, Voslářová Eva, Večerek Vladimír

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno

#### Summary

*We monitored liver damage in cattle, pigs, sheep, goats, rabbits and poultry slaughtered in slaughterhouses in the Czech Republic in the period from 2010 to 2019. In all species, the incidence of liver damage was higher in adult animals compared to fattened and young animals. In cattle and pigs, it was also higher in young culled from farms in comparison to fattened and young animals. When comparing adult animals of different species, the highest incidence of liver damage was found in dairy cattle (46.13%), followed by sows (17.43%), sheep (13.07%) and goats (4.04%). When comparing fattened and young animals, the highest incidence of liver damage was found in young cattle, i.e. heifers (14.79%) and bulls (8.12%), followed by finisher pigs (11.26%), lambs (5.04%) and kids (0.75%). When comparing young culled from farms, a higher incidence of liver damage was found in piglets (29.40%) than in calves (17.12%). When comparing poultry and rabbits, the highest incidence of liver damage was found in laying hens (23.44%), followed by turkeys (3.35%), ducks (1.89%), geese (1.15%), broiler chickens (0.08%) and rabbits (0.05%). The results provide an overview of the prevalence of liver damage in slaughtered animals that can be used for defining measures needed to improve liver health in farm animals.*

**Keywords:** farm animals; meat inspection; health

#### Úvod

Játra představují hlavní orgán metabolismu u zvířat. Jejich dobrá kondice významně přispívá k celkovému zdraví zvířat, jejich narušení naopak zhoršuje zdraví zvířat a tím také pohodu zvířat. Vzhledem k tomu, že jsou játra ústředím mnoha trávících, metabolických i produkčních procesů, je důležité dobře porozumět všem faktorům, které mají vliv na jejich funkci. K narušení jater dochází zpravidla při narušeném metabolismu, a to nejčastěji z důvodu nedostatků ve výživě zvířat. Nebo jsou játra narušena v důsledku parazitární invaze jako cílového orgánu nebo jako orgánu migrace parazitů v rámci standardní anebo náhodné migrační cesty v organismu zvířat. Játra mohou být poškozena rovněž v důsledku infekčního procesu či intoxikace organismu (např. těžkými kovy či toxiny plísní). Negativní vliv na funkci jater může mít i nevhodný způsob chovu (Keutgen, 1999). O zatížení jater hospodářských zvířat svědčí i výsledky rozsáhlé polské studie (Januskeviciene et al., 2010), z kterých vyplývá, že léze na játrech jsou druhým nejčastěji detekovaným patologickým nálezem při postmortální veterinární prohlídce na polských jatkách, byly zaznamenány u 34,19 % ze všech porážených zvířat.

Cílem práce bylo porovnat výskyt narušení jater u různých druhů a kategorií zvířat porážených na jatkách v ČR.

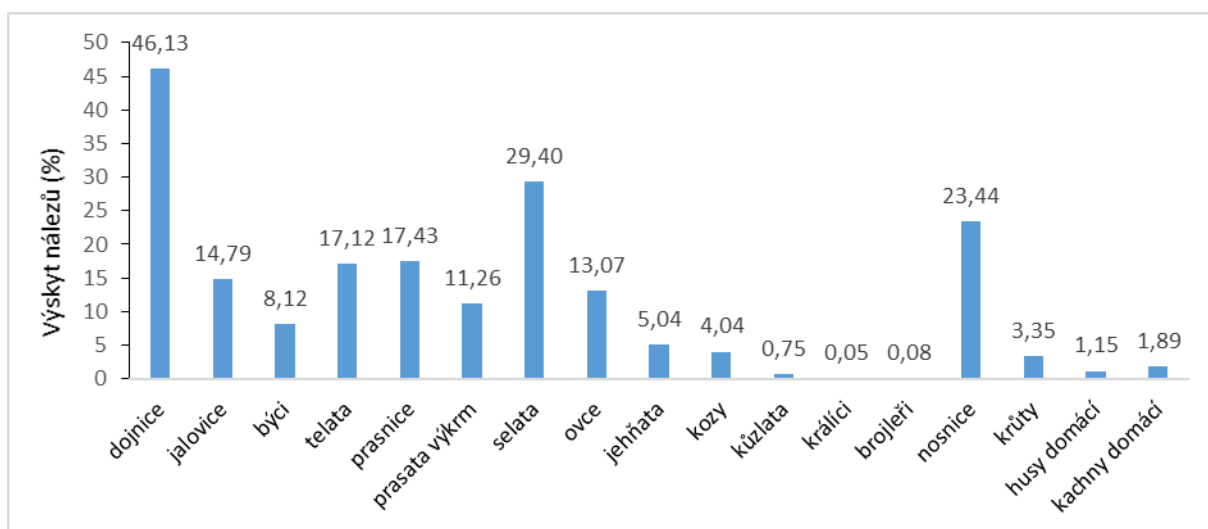
#### Materiál a metodika

Poškození jater bylo sledováno u zvířat pocházejících z českých chovů a porážených na jatkách v České republice v období let 2010 až 2019. Pro účely hodnocení byly získány údaje z databáze SVS ČR, do které jsou zaznamenávány výsledky veterinární prohlídky, kterou prováděli úřední veterinární lékaři SVS ČR v rámci veterinárního dozoru nad zdravotní nezávadností orgánů zvířat porážených na jatkách.

K statistickému porovnání zjištěných počtů nálezů byl využit Chí kvadrát test. Byl porovnáván výskyt poškození jater mezi jednotlivými kategoriemi porážených zvířat, tj. u skotu pro kategorie dojnice, jalovice, býci ve výrmmu a telata vyřazovaná z chovu, dále u prasat pro kategorie prasnice, prasata ve výrmmu, a selata vyřazovaná z chovu, dále u ovcí pro kategorie bahnice a jehňata, dále u koz pro kategorie kozy a kůzlata, dále u králíků, a dále u drůbeže pro druhy a kategorie nosnice, brojleři, krůty, kachny domácí, husy domácí. Výskyt poškození jater byl srovnán také mezi kategorií zvířat vykrmovaných a mladých (jalovice, býci ve výrmmu, prasata ve výrmmu, jehňata, kůzlata), dospělých zvířat vyřazených z chovu (dojnice, bahnice, kozy) a mláďat vyřazených z chovu (telata, selata).

### Výsledky a diskuze

Výskyt poškození jater u jednotlivých kategorií porážených zvířat je uveden v grafu č. 1. Mezi jednotlivými druhy a kategoriemi byly zjištěny statisticky vysoce významné rozdíly ( $P < 0,01$ ), s výjimkou porovnání koz a jehňat ( $P = 0,10$ ) a koz a krůt ( $P = 0,16$ ).



**Graf 1:** Výskyt nálezů poškození jater celkem u jednotlivých kategorií porážených zvířat

Výskyt nálezů na játrech byl statisticky významně vyšší ve svém počtu u zvířat dospělých ve srovnání se zvířaty vykrmovanými a mladými, a to u všech sledovaných druhů. Toto zjištění dokládá skutečnost, že vykrmovaná a mladá zvířata jsou organismy s lepší jaterní kondicí než zvířata dospělá, u mladých zvířat je zatížení jater s ohledem na jejich věk kratší a je zde také lepší regenerační schopnost, což se projevuje nižším počtem nálezů na játrech, z pohledu jater jsou tak v lepší kondici zvířata mladá než zvířata dospělá, jejichž játra jsou zatížena dlouhodobě intenzivním metabolismem v důsledku dlouhodobé intenzivní produkce. Výrazně déle zůstávají v chovech ve srovnání s ostatními kategoriemi hospodářských zvířat především dojnice, ale i krávy bez tržní produkce mléka. Zvláště u dojnic má dlouhá doba chovu ve spojení s intenzivní produkcí mléka vliv na zdravotní kondici a také na možný výskyt produkčních onemocnění, které jsou spojeny s charakteristickými nálezy na orgánech včetně jater. Vliv věku na míru konfiskací na jatkách zmiňují i Dupuy et al. (2013) s tím, že nejvyšší míra konfiskací byla zaznamenána u zvířat porážených ve stáří 5-10 let (37,37 %).

Pokud jde o hospodářsky využívané druhy ptáků, je relativně dlouhá doba života (ve srovnání např. s brojlerovými kuřaty či vykrmovanými krůtami) spojená s intenzivní produkcí vajec typická zejména pro nosnice kura domácího. Doba chovu, způsob chovu (v ČR dosud převažuje klecový chov) a využití nosnic se výrazně liší od ostatní porážené drůbeže. Zatímco brojlerová kuřata, husy, kachny a krůty jsou poráženy po několika týdnech až měsících

výkrmu (jde tedy obvykle o mladé ptáky v dobré kondici), nosnice jsou odesílány na porážku po přibližně roční intenzivní produkci vajec. Navíc bylo prokázáno, že klecový způsob chovu (ve srovnání s chovem na podestýlce či ve volném výběhu) je u nosnic jedním z environmentálních faktorů, které přispívají k rozvoji syndromu ztučnělých jater (Keutgen et al., 1999). Naše studie potvrdila tyto předpoklady, když v kategorii nosnic (kur domácí) byly zaznamenány léze na játrech u 23,44 % ze všech poražených jedinců, což představuje zdaleka nejvyšší podíl mezi drůbeží a třetí nejvyšší (po dojnicích a selatech) hodnotu vůbec. Pravděpodobnou příčinou neuspokojivého stavu jater je v případě nosnic výživa, která neodpovídá intenzitě jejich produkce. Pokud nosnice nepřijímají dostatek živin vzhledem k úrovni produkce vajec, může u nich docházet k proteolýze jater a svaloviny, lipolýze tukové tkáně a resorpci kostí (Gregory and Robins, 1998).

Vyšší výskyt nálezů na játrech byl zjištěn také u mláďat vyřazovaných z chovu ve srovnání se zvířaty vykrmovanými, a to u skotu (telata 17,12 % vs. býci ve výkrmu 8,12 % i jalovice 14,79 %) a prasat (selata 29,40 % vs. prasata ve výkrmu 11,26 %). Toto zjištění dokládá skutečnost, že mláďata vyřazovaná z chovu pro špatnou kondici nebo zdraví mají také nižší úroveň zdraví jater než zvířata ponechaná v chovu, tj. zvířata ve výkrmu nebo zvířata mladá (a to i když jsou starší než vyřazovaná mláďata).

### **Závěr**

Výsledky dokládají zjištění, že vykrmovaná a mladá zvířata mají lepší jaterní kondici než zvířata dospělá, že vyřazovaná mláďata z chovu mají horší jaterní kondici než věkem starší vykrmovaná zvířata a že nejvyšší rozdíl mezi skutečnou výživou a potřebou metabolismu způsobující porušení jater je u skotu, poté u prasat, poté u ovcí a poté u koz, a to jak u dospělých, tak také u vykrmovaných a mladých zvířat. Zjištěné výsledky vytváří znalostní podklad pro opatření vedoucí k zlepšení zdraví a kondice jater u potravinových zvířat.

### **Poděkování**

Tato práce byla finančně podpořena ITA VETUNI (projekt č. 2021ITA22).

### **Literatura**

DUPUY, C.; MORIGNAT, E.; MAUGEY, X.; VINARD, J.L.; HENDRIKX, P.; DUCROT, C.; CALAVAS, D.; GAY, E. Defining syndromes using cattle meat inspection data for syndromic surveillance purposes: a statistical approach with the 2005-2010 data from ten French slaughterhouses. *BMC Veterinary Research*. 2013, vol. 9, article nr. 88.

GREGORY, N.G.; ROBINS, J.K. A body condition scoring system for layer hens. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 1998, vol. 41, no. 4, s. 555–559.

JANUSKEVICIENE, G.; PAULAUSKAS, V.; DAILIDAVICIENE, J.; JUOZAITIENE, V. Analysis of pathologic lesions in the livestock and poultry slaughtered in the meat establishments of Lithuania. *Veterinarija ir Zootechnika*. 2010, vol. 52, no. 74, s. 33–42.

KEUTGEN, H.; WURM, S.; UEBERSCHAR, S. Pathologic changes in end-of-lay hens with regards to different housing systems. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*. 1999, vol. 106, no. 4, s. 127–133.

**Kontaktní adresa:** Lenka Válková, MVDr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H20334@vfu.cz

## **Infračervená termografia ako nástroj na hodnotenie akútneho stresu u prasiat (*Sus scrofa f. domestica*)**

### **Infrared thermography as a tool for assessing acute stress in pigs (*Sus scrofa f. domestica*)**

**Kotianová Lucia, Lukešová Gabriela, Voslářová Eva, Večerek Vladimír**

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

#### **Summary**

*In recent years, there was an increasing emphasis on animal welfare including pigs (*Sus scrofa f. domestica*), which indicates an interest in innovating welfare methods. The assessment of stress is currently primarily carried out using invasive or non-invasive methods, which usually include blood or saliva sampling, but in both cases, there is a possible undesired effect on the results from handling or fixation shortly before sample collection. This review focuses on the use of infrared thermography as a non-invasive method of assessing acute stress in pigs, given the fact that in response to acute stress also the individual's surface body temperature changes. Infrared thermography thus has a potential to become a valuable non-invasive contactless method of acute stress assessment in pigs.*

**Keywords:** *infrared thermography; stress; animal welfare; pigs*

#### **Úvod**

Dôraz kladený na welfare u hospodárskych zvierat má v posledných rokoch stúpajúcu tendenciu, čo značí záujem na poli inovácií metód hodnotenia dobrých životných podmienok nielen u prasiat (*Sus scrofa f. domestica*). Hodnotenie sa v súčasnosti vykonáva vo veľkej miere za využitia invazívnych alebo neinvazívnych metód, ktoré zvyčajne zahŕňajú napríklad odber krvi alebo slín, pričom v oboch prípadoch je možný výskyt nežiadúcich vplyvov akými sú manipulácia či fixácia krátko pred samotným odberom. Tento prehľad sa zameriava na využitie infračervenej termografie ako neinvazívnej, bezkontaktnej metódy hodnotenia akútneho stresu u prasiat s ohľadom na fakt, že behom akútnej stresovej reakcie dochádza mimo iné i k zmene povrchovej telesnej teploty jedinca.

#### **Využitie termografie v chovoch hospodárskych zvierat**

V súvislosti so zabezpečením dobrých životných podmienok v chovoch hospodárskych zvierat vzrastá v súčasnosti tlak na vývoj inovatívnych metód pre hodnotenie akútneho stresu, s ohľadom na minimalizovanie fixačného a manipulačného stresu, ktorý môže značne ovplyvňovať samotné meranie a výsledky (Cannas et al., 2018). Momentálne disponujeme celou škálou metód hodnotenia stresovej záťaže v organizme, avšak niektoré z nich, ako napríklad odber krvi či odber slín za účelom stanovenia hladiny glukokortikoidov, sú ovplyvnené kontaktom či manipuláciou s hodnoteným zvierat'om (Breineková et al., 2007). Infračervená termografia (IRT) alebo taktiež termovízia je metóda zobrazovania infračerveného žiarenia (teplotnej mapy) objektov, za využitia špecializovanej kamery (Knížková and Kunc, 2020). Výsledkom merania je termogram, ktorý umožňuje vizualizáciu a kvantifikáciu distribúcie infračerveného žiarenia meraného objektu. V praxi sa termografia uplatňuje naprieč vednými odbormi už značné obdobie, zatiaľ čo vo veterinárnej medicíne a na poli hodnotenia stresu a dobrých životných podmienok zvierat ide o pomerne inovatívnu technológiu (Boileau et al., 2019). Uplatnenie vo veterinárnej medicíne nachádza infračervená termografia napríklad v rámci hodnotenia zmien telesnej teploty v súvislosti s diagnostikou širokej škály chorôb a zranení u hospodárskych zvierat, dojivost'ou u mliečného dobytká

alebo včasnou diagnostikou zápalových ochorení u prasiat (Piskovská and Knotek, 2018). V súvislosti s dobrými životnými podmienkami zvierat sa začína uplatňovať pri výskumoch v rámci neinvazívneho hodnotenia akútnych stresových faktorov v súvislosti s hodnotením prepravného, manipulačného alebo napríklad teplotného stresu (Stewart et al., 2005).

### **Využitie termografie pri hodnotení welfare prasiat**

Chov prasat'a domáceho (*Sus scrofa f. domestica*) bol k 1. aprílu 2022 v Českej republike druhým najrozšírenejším sektorom v rámci chovu zvierat za účelom hospodárskej produkcie, v prepočte na počet chovaných kusov zvierat (ČSÚ, 2022). Prasatá sú v priebehu života vystavované mnohým stresovým situáciám, ako je skorý odstav (Campbell et al., 2013) a sú citlivé k stresovým faktorom akými sú hluk alebo manipulácia (Marchant-Forde, 2009). Možnosti hodnotenia miery stresu neinvazívnymi metódami, ako je využitie termokamery bez nutného kontaktu so zvierat'om sú teda v ich prípade obzvlášť prínosné, pretože výsledky nie sú nijak ovplyvnené nutnou fixáciou zvierat'a. Termogram zobrazuje zmeny teploty na povrchu tela zvierat, ktoré nastávajú ako dôsledok rady metabolických a fyziologických procesov spustených stresom (McManus et al., 2016). Čo sa týka samotného merania, je dôležitým faktorom výber meraného miesta na tele zvierat'a. U cicavcov je všeobecne vhodný pre detekciu teploty napríklad kútik oka, nosná huba a oblasť uší, pričom musíme brať ohľad na osrstenie jednotlivých druhov a následne i meraného jedinca (McManus et al., 2016; Soerensen and Pedersen, 2015). Pri prasati domácom je možnosť väčšej variability výberu meraných oblastí a to z dôvodu slabej pokrývky tela srst'ou. Táto skutočnosť nám umožňuje nielen vybrať rôzne oblasti na tele, ale taktiež ich vzájomne porovnať a zhodnotiť relevanciu výsledkov v rámci merania (Kammersgaard et al., 2013). Na druhú stranu však jedinci môžu vykazovať nejednotnosť čo sa týka hustoty osrstenia (Soerensen and Pedersen, 2015). S ohľadom na uvedené informácie by mohlo pri nevhodnom rozložení skupín dochádzať k nepresnostiam v meraní následkom rozdielov v priepustnosti žiarenia pri meraní na osrstených oblastiach. Ďalším faktorom pri meraní pomocou termokamery je stanovenie emisivity. Pred samotným hodnotením je podstatné taktiež stanoviť vzdialenosť od meraného objektu a neopomínať fázu prípravy skupiny, ktorá obnáša upokojenie zvierat pred samotným meraním, keďže príchod človeka do chovu môže u niektorých druhov, vrátane prasiat, spôsobiť zvýšenú pohyblivosť následkom úľaku, ktorá by sa mohla premietnuť do výsledného merania (Ricci et al., 2019). Autori sa v najväčšej miere venujú oblastiam hodnotenia stresovej záťaže v súvislosti s kastráciou mladých prasiatok (Ricci et al., 2019), vplyvu enrichmentu v skupine prasiat po odstavě, pôsobeniu enviromentálnych stresorov a následne enviromentálneho enrichmentu na mláďatá pred odstavom (Kammersgaard et al., 2013) a v neposlednom rade vybraným typom chovania v rámci etologických štúdií (Ricci et al., 2019). Čo sa týka doposiaľ uvedených teplotných údajov meraných oblastí u laktujúcich prasnic s mláďatami, z publikovaných výsledkov vyplýva, že medzi najteplejšie oblasti na tele prasnice patrí mliečna žľaza (34,9°C – 35,9°C), zatiaľ čo u mláďat v období laktácie je to vrchná oblasť hlavy, konkrétne medzi ušnými boltcami (36,7°C). Údaje sa mierne menia v závislosti od ročného obdobia (Ricci et al., 2019). Súbežne so samotným hodnotením pomocou termokamery autori často využívajú stanovenie hladiny kortizolu v slinách, čo sa javí ako vhodný prostriedok v súvislosti so stanoveným referenčných hodnôt pre individuálne meranie v rámci druhov hospodárskych zvierat (Kammersgaard et al., 2013). Uvedený spôsob využili i Boileau et al., 2019, pri hodnotení stresu v súvislosti s výskytom agonistického chovania v modelových skupinách prasiat po odstavě. Autori sa zhodujú, že v rámci praktického využitia termografie je možné vyzdvihnúť hodnotenie teplotného stresu v prvej hodine života u novorodených prasiatok, kde metóda vykazuje štatisticky významné výsledky v presnosti merania a kontrolného hodnotenia metódou stanovenia hladiny glukokortikoidov v slinách (Soerensen and Pedersen, 2015).



## Záver

Hodnotenie teploty povrchu tela u prasiat pomocou infračervenej termografie je možné využiť ako vo veterinárnych oblastiach pri včasnej diagnostike horúčkovitých ochorení alebo detekcii plodnosti a rovnako v rámci hodnotenia dobrých životných podmienok ako neinvazívnu metódu hodnotenia stresovej záťaže organizmu. Využitie termografie v chovoch ošipáných sa javí ako inovatívna, nízko nákladová, rýchla a efektívna metóda, ktorá v rámci výskumu dokáže poskytnúť cenné dáta bez nutnosti fyzického kontaktu so zvieratami, čo je dozaista pozitívne, nakoľko kontakt ako taký u mnohých druhov navodzuje zvýšený stres.

## Literatúra

BOILEAU, A., FARISH, M., TURNER, P.S., CAMERLINK, I. Infrared thermography of agonistic behaviour in pigs. *Physiology & Behaviour*, 2019, 210: 112637.

BREINEKOVÁ, K., SVOBODA, M., SMUTNÁ, M., VORLOVÁ, L. Markers of acute stress in pigs. *Physiological Research*, 2007, 56: 323-329.

CAMPBELL, J.M., CRENSHAW, J.D., POLO, J. The biological stress of early weaned piglets. *J Animal Sci Biotechnol*, 2013, 4: 19.

CANNAS, S., PALESTRINI, C., CANALI, E., COZZI, B., FERRI, N., HEINZL, E., MINERO, M., CHINCARINI, M., VIGNOLA, G., DALLA COSTA, E. Thermography as a non-invasive measure of stress and fear of humans in sheep. *Animals*, 2018, 8: 146.

ČESKÝ STATISTICKÝ ÚŘAD. Soupis hospodářských zvířat 2022 [tabulka]. In: *Český statistický úřad* [online]. [Praha]: Český statistický úřad. Vygenerováno 09.05.2022 17:30:00 [vid. 2022-05-09]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/soupis-hospodarskych-zvirat-2022>

GIERGEL, M., OLEJNIK, M., [JABLONSKI](#), A., POSYNIK, A. The markers of stress in swine oral fluid. *Journal of Veterinary Research*, 2021, 65: 487-495.

KAMMERSGAARD, S.T., MALMKVIST, J., PEDERSEN, J.L. Infrared thermography - a non-invasive tool to evaluate thermal status of neonatal pigs based on surface temperature. *Animal*, 2013, 7:12 2026-2034.

KNÍŽKOVÁ, I., KUNC, P. *Infračervená termografie a její využití pro zjišťování pohody a zdraví hospodářských zvířat*. [Praha]: Výzkumný ústav živočišné výroby, 2020. ISBN 978-80-7403-243-1.

MARCHANT-FORDE, Jeremy N., ed. *The Welfare of Pigs*. Springer. 2009, 349 s. ISBN 978-1-4020-8908-4.

MC MANUS, C., TANURE, B.C., PERIPOLLI, V., SEIXAS, L., FISHER, V., GABBI, M.A., MENEGASSI, O.R.S., STUMPF, T.M., KOLLING, J.G., DIAS, E., BATISTA, J., COSTA JR, G. Infrared thermography in animal production: an overview. *Computers and Electronics in Agriculture*, 2016, 123: 10-16.

PISKOVSÁ, A., KNOTEK, Z. Klinická termografie exotických zvířat. *IVA VFU Brno*, 2018, 2-6.

RICCI, D.G., DA SILVA MIRANDA, O., TITTO, G.C. Infrared thermography as a non-invasive method for the evaluation of heat stress in pigs kept in pens free of cages in the maternity. *Computers and Electronics in Agriculture*, 2019, 157: 403-409.

SOERENSEN, D.D., PEDERSEN, J.L. Infrared skin temperature measurements for monitoring health in pigs: a review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2015, 57: 5.

STEWART, M., WEBSTER, J. R. SCHAEFER, A. L., COOK, N. J., SCOTT, S. L. Infrared thermography as a non-invasive tool to study animal welfare. *Animal Welfare*, 2005, 14: 319-325.

**Kontaktná adresa:** Kotianová Lucia, Mgr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H21279@vfu.cz

## Mortality rates in pre-weaned and post-weaned juvenile European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) admitted to rescue centres in the Czech Republic

Lukešová Gabriela, Voslářová Eva, Večerek Vladimír

*Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Czech Republic*

### Summary

*Rescue centres care for orphaned animals including European hedgehogs. Considering the breeding strategy of European hedgehogs in the Czech Republic and the timing of their admission to rescue centres, these are young born during the normal breeding season, but also young from late litters. Between 2011 and 2015, a total of 1,365 young European hedgehogs were admitted to 18 rescue centres in the Czech Republic, with a significantly ( $p < 0.01$ ) lower number of post-weaned hedgehogs from normally-timed litters. The highest mortality rate was determined in pre-weaned hedgehogs from both late litters and normally-timed litters (12.94% and 19.19% of the number of admitted young in the category, respectively). In view of the large numbers of these young in rescue centres and the high mortality rate, further research should be focused on the development of a procedure leading to successful rearing, especially of pre-weaned young.*

**Keywords:** *rehabilitation; weight; young; breeding*

### Introduction

The European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) is a species found in a large area of Europe, including the Czech Republic, but some studies have already pointed to a declining trend in the number of these animals (Mathew et al., 2018). Its breeding season begins very soon after awakening from hibernation under suitable climatic conditions (Fowler, 1988). However, the breeding strategy can vary depending on the area where hedgehogs live. In warmer south areas, hibernation lasts for a shorter period of time (Haigh et al., 2012) and hedgehogs have two litters per year (Parkes, 1975) in contrast to colder areas in the north. The Czech Republic is located on the border of these two climatic zones and the number of litters can vary depending on the climatic conditions of a particular year - especially on the temperatures in spring. The question is whether the young born later in the year are from the late litter, or whether they are young of the mother who lost the previous litter and mated again later (Bunnell, 2009). Rescue centres care for orphaned young with the aim of releasing them back to the wild. A lot of animals are admitted to rescue centres every year and a large proportion of them do not survive (Crespo Martínez et al., 2014; Molina-López et al., 2017).

The aim of this study was to evaluate a number of pre-weaned and post-weaned juvenile hedgehogs from normally-timed and late litters admitted to rescue centres in the Czech Republic and their mortality rate.

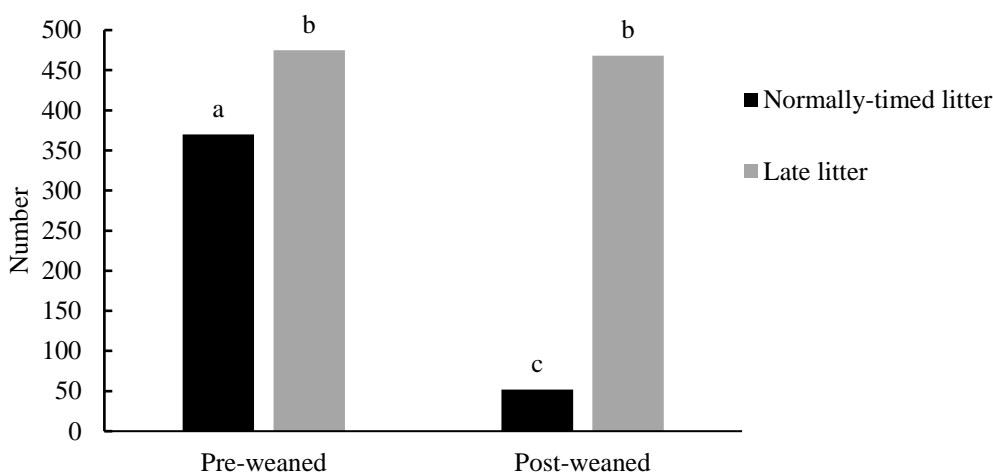
### Material and methods

The records including information on the admission of young European hedgehogs to 18 rescue centres in the Czech Republic were obtained from the database of the Ministry of the Environment. The data included the number of admitted individuals, date of admission and outcome, reasons for admission and weight. Only the young admitted as orphans (without injuries) with recorded weight were included in the analysis. The hedgehogs were divided into

the following groups according to the month of admission: normally-timed litters (admitted to rescue centres from April to September) and late litters (admitted from October to March) and according to the weight: pre-weaned (1-250 g) and post-weaned (251-400 g). A chi-square test with Yates correction was used for statistical processing using a 2x2 contingency table methodology in the statistic program UNISTAT 6.5 for Excel (Unistat Ltd., London, UK). A p-value < 0.01 was determined to be statistically significant.

**Results and discussion**

In the period from 2011 to 2015, a total of 1,365 young European hedgehogs were admitted to 18 rescue centres in the Czech Republic, with a significantly ( $p < 0.01$ ) lower number of admissions of post-weaned young from normally-timed litters than those from late litters or pre-weaned hedgehogs (Figure 1). Hedgehogs weighing 251-400 g are already in adolescence (Deanesley, 1934) and are not considered as vulnerable in summer as juveniles in autumn when there is a risk they will not survive hibernation. In contrast, hedgehogs from normally-timed litters have considerably more time to reach a satisfactory weight to survive hibernation. However, Bunnell (2009) contradicted with a statement that young from late litters grow faster. The sufficient weight for hedgehog survival of hibernation varies among authors, for example, Jensen (2004) considers 513 g to be the minimum weight.



*a-c*The values with different superscript letters are significantly ( $p < 0.01$ ) different.

Figure 1. Number of young European hedgehogs admitted to rescue centres in the Czech Republic in 2011-2015 according to litter timing and weight.

Table 1. The mortality rate in pre-weaned and post-weaned juvenile European hedgehogs in normally-timed litters and late litters

Litter timing	Admitted young (number)	Category	Mortality rate	
			number	%
Normally-timed litter	422	pre-weaned	81	19.19 <sup>a</sup>
		post-weaned	1	0.24 <sup>b</sup>
Late litter	943	pre-weaned	122	12.94 <sup>c</sup>
		post-weaned	57	6.04 <sup>d</sup>

*a-d*The percentages with different superscript letters in a column are significantly ( $p < 0.01$ ) different

The lowest mortality rate was found in post-weaned hedgehogs from normally-timed litters (0.24% of animals admitted in this category). This may be related to the fact that they were likely growing under optimal conditions (considering period of the year) and more likely were in a reasonably good condition on admission. Thus, they required less care and had a better chance of survival in rescue centres. Conversely, the high mortality rate of pre-weaned individuals from both normally-timed and late litters (19.19% and 12.94%, respectively) suggests that rearing young still dependent on milk is more difficult and less successful which is consistent with the difficulty of rearing young of other wild species (Paci et al., 2012).

### Conclusion

The highest mortality rates among young hedgehogs admitted to rescue centres in the Czech Republic were found in pre-weaned hedgehogs, i.e. those dependent on the care of their mother, whom they have lost. Therefore, further research is needed to develop rearing and feeding practices to increase the chances of their survival and ability to release them back into the wild.

### Acknowledgements

This study was supported by ITA VFU Brno (Project No. FVHE/Vecerek/ITA2020).

### References

- BUNNELL, T. Growth rate in early and late litters of the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). final dispositions of hedgehogs admitted to three Wildlife Rehabilitation Centers in eastern Spain. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*. 2014, vol. 25, no. 2, p. 107–110.
- DEANESLEY, R. The reproductive processes of certain mammals. Part VI. - The reproductive cycle of the female hedgehog. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 1934, vol. 223, p. 239–276.
- FOWLER, P.A. Seasonal endocrine cycles in the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1988, vol. 84, no. 1, p. 259–272.
- HAIGH, A.; O'RIORDAN, R.M.; BUTLER, F. Nesting behaviour and seasonal body mass changes in a rural Irish population of the Western hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Acta Theriologica*. 2012, vol. 57, no. 4, p. 321–331.
- JENSEN, A.B. Overwintering of European hedgehogs *Erinaceus europaeus* in a Danish rural area. *Acta Theriologica*. 2004, vol. 49, no. 4, p. 145–155.
- MATHEWS, F.; KUBASIEWICZ, L.M.; GURNELL, J.; HARROWER, C.A.; MCDONALD, R.A.; SHORE, R.F. A Review of the Population and Conservation Status of British Mammals: Technical Summary. *Natural England Joint Publication*. DOI: 10.13140/RG.2.2.28059.31521.
- MOLINA-LÓPEZ, R.A.; MAÑOSA, S.; TORRES-RIERA, A.; Pomatoł, M.; DARWICH, L. Morbidity, outcomes and cost-benefit analysis of wildlife rehabilitation in Catalonia (Spain). *PLoS ONE*. 2017, vol. 12, no. 7, e0181331.
- PACI, G.; FERRETTI, M.; BAGLIACCA, M. Reducing visual stimulations in European hares (*Lepus europaeus* Pallas) captured for translocation. *Italian Journal of Animal Science*. 2012, vol. 11, no. 3, e51.
- PARKES, J. Some aspects of the biology of the hedgehog (*Erinaceus europaeus* L.) in the Manawatu, New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology*. 1975, vol. 2, no. 4, p. 463–472.

**Contact address:** Gabriela Lukešová, MVDr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H19356@vfu.cz

# **SEKCE 4**

## **Veřejné a soudní veterinářství a toxikologie**

## Stanovení hypoglycinu A ve vzorcích rostlin rodu *Acer*

### Determination of hypoglycin A in samples of *Acer* genus plants

Novotná Tereza, Kabešová Michaela, Pospíšilová Sabina, Maršálek Petr

*Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno*

#### Summary

Hypoglycin A (HGA) is a non-proteinogenic amino acid with unknown biological function. Recently it has been found in plants of Sapindaceae family. *Acer pseudoplatanus* (sycamore maple) and *Acer negundo* (box elder tree) species are the most important in relation to equine health because of their connection with atypical myopathy (AM). The cause of AM is acyl-CoA deficiency triggered by methylcyclopropylacetic acid (MCPA), a metabolite of HGA. HGA occurs in seeds, seedlings and leaves of these two species. HGA has been also determined in some other *Acer* genus plants such as *Acer saccharinum* (silver maple). The goal of this work was to determine and evaluate HGA concentrations in different parts of certain *Acer* genus plants growing in the Czech Republic and Slovakia.

**Keywords:** *Acer*; Horses; Hypoglycin A; Myopathy; Toxicity

#### Úvod

Atypická myopatie (AM) je akutní otrava koňovitých vyvolaná pozřením hypoglycinu A (HGA), jejíž podstatou je narušení energetického metabolismu (Votion, 2016), (Medina, 2020). HGA se přirozeně vyskytuje v určitých stromech rodu *Acer*. S případy AM na evropském kontinentě je spojován javor klen (*Acer pseudoplatanus*), v Severní Americe je považován za příčinu otrav HGA javor jasanolistý (*Acer negundo*) (Valberg, 2013); (Votion, 2014). HGA byl prokázán v nažkách, semenáčcích a listech těchto druhů javorů a také v květenstvích javoru klen a dešťové vodě (Votion, 2019).

#### Materiál a metodika

Vzorky rostlin byly sbírány z různých lokalit České republiky, jeden vzorek byl odebrán na Slovensku. Na jaře byly odebírány semenáčky, v létě a na podzim pak nažky. Sběr listů probíhal v průběhu celého vegetačního období javorů. Od každého vzorku bylo odebráno přibližně 100 g rostlinného materiálu. Vzorky byly označeny, dendrologicky určeny a zamrazeny při teplotě -20°C. Celkem bylo analyzováno 36 vzorků javoru klen (21 vzorků nažek a 15 vzorků semenáčků), 33 vzorků javoru jasanolistého (19 vzorků nažek a 14 vzorků listů), 12 vzorků javoru mléče (5 vzorků nažek, 1 vzorek semenáčků a 6 vzorků listů) a 14 vzorků javoru babyka (6 vzorků nažek, 2 vzorky semenáčků a 6 vzorků listů). Dále byl HGA analyzován v okrasných druzích javoru, konkrétně v javoru stříbrném (2 vzorky listů), v javoru dlanitolistém (2 vzorky listů), javoru tatarském (3 vzorky listů a 3 vzorky nažek) a v javoru červeném (1 vzorek listů a 1 nažek).

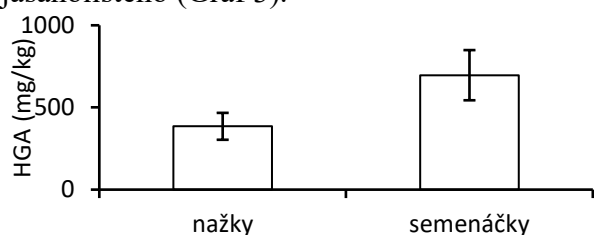
Po rozmražení byl rostlinný materiál extrahován do methanolu, filtrován pomocí nylonového stříkačkového filtru do vialek a takto připravené vzorky byly použity k LC/MS analýze. LC/MS analýza byla provedena s využitím hmotnostního spektrometru s trojitým kvadrupólem a ionizací elektrosprejem. K chromatografické separaci byla využita kolona Thermo Scientific Hypersil C18 (2,1 mm × 100 mm, 1,9 μm) a gradient mobilní fáze složený z methanolu a vody. Mez detekce byla pro vzorky javoru klen 2,21 mg/kg a pro vzorky javoru jasanolistého 0,208 mg/kg.

Statistická analýza byla provedena s využitím software Unistat. Data byla testována na normalitu pomocí testu Kolmogorov-Smirnov. Vzhledem k tomu, že data neměla normální

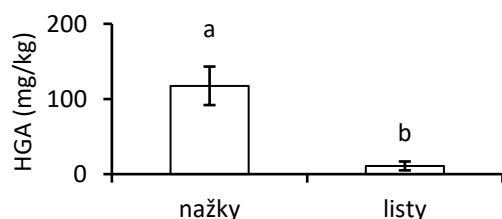
rozdělení, byl dále využit k porovnání jednotlivých souborů neparametrický Mann-Whitney test. V případě, že obsah HGA ve vzorku byl pod mezí detekce, byla pro statistické hodnocení použita polovina hodnoty meze detekce. Vzhledem k malému počtu vzorků byly statisticky hodnoceny pouze javory klen a jasanolistý.

### Výsledky

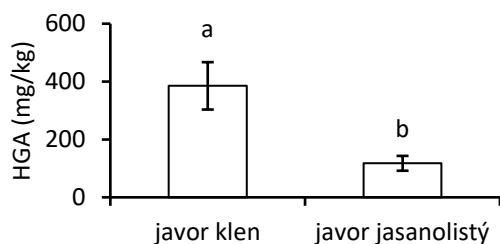
HGA byl detekován ve všech vzorcích nažek a semenáčků javoru klenu a jasanolistého, v 8 vzorcích listů javoru jasanolistého byl jeho obsah pod mezí detekce. HGA se podařilo také stanovit ve všech vzorcích javoru stříbrného a dlanitolistého. V ostatních analyzovaných druzích nebyl detekován. Pomocí Mann-Whitneyho testu nebyl nalezen statisticky významný ( $p > 0,05$ ) rozdíl mezi obsahem HGA v nažkách a semenáčcích javoru klenu (Graf 1). V případě javoru jasanolistého byl nalezen statisticky významně vyšší ( $p < 0,01$ ) obsah HGA v nažkách ve srovnání s listy (Graf 2). Dále byl nalezen statisticky významně vyšší ( $p < 0,01$ ) obsah HGA v nažkách pocházejících z javoru klen ve srovnání s nažkami z javoru jasanolistého (Graf 3).



**Graf 1:** Obsah hypoglycinu A v nažkách (n=21) a semenáčcích (n=15) javoru klen (*Acer pseudoplatanus*). Sloupce představují průměr a chybové úsečky střední chybu průměru



**Graf 2:** Obsah hypoglycinu A v nažkách (n=19) a listech (n=14) javoru jasanolistého (*Acer negundo*). Sloupce představují průměr a chybové úsečky střední chybu průměru. Rozdílná písmena indikují statistickou významnost ( $p < 0,01$ )



**Graf 3:** Obsah hypoglycinu A v nažkách javoru klen (*Acer pseudoplatanus*), (n=21) a javoru jasanolistého (*Acer negundo*), (n=19). Sloupce představují průměr a chybové úsečky střední chybu průměru. Rozdílná písmena indikují statistickou významnost ( $p < 0,01$ )

### Diskuse

V rámci naší práce jsme prokázali HGA ve všech vzorcích javoru klenu, což odpovídá výsledkům většiny předchozích studií (Fowden, 1973), (Westermann, 2016), (Votion, 2019). Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v obsahu HGA mezi nažkami a semenáčky javoru klenu. Na základě studie obsahu HGA v javoru klenu v Nizozemí (Westermann, 2016) jsme předpokládali vyšší obsah této látky v semenáčcích oproti nažkám. Je možné, že rozdíl

byl způsoben menším počtem vzorků nažek ( $n = 21$ ) oproti nažkám v předchozí studii ( $n = 64$ ). Byl prokázán statisticky vysoce významný rozdíl v koncentraci HGA mezi nažkami javoru kleny a javoru jasanolistého, kdy jeho koncentrace v nažkách javoru kleny byla několikanásobně vyšší, podobně jako u studie z Nového Zélandu (McKenzie, 2016). Obsah HGA v nažkách javoru jasanolistého byl významně vyšší oproti listům. Zjištění odpovídá výsledkům analýzy prováděné u javoru kleny (Westermann, 2016). HGA byl také detekován ve všech vzorcích javoru stříbrného a javoru dlanitolistého. V ostatních analyzovaných druzích nebyl HGA prokázán. Výsledky odpovídají studii z roku 1973 (Fowden, 1973). Podle posledních informací nebyl případ otravy těmito okrasnými druhy javorů popsán, nicméně vzhledem ke zvyšujícímu se počtu koní chovaných v městských oblastech představují i tyto stromy potenciální riziko.

### Závěr

HGA byl detekován v javoru kleny a javoru jasanolistém. V javoru kleny byl prokázán ve vysokých koncentracích ve všech jeho analyzovaných částech - v semenáčcích a nažkách. Významný rozdíl v toxicitě mezi nimi nebyl zjištěn.

U javoru jasanolistého byl HGA prokázán ve všech vzorcích nažek a semenáčků, jeho obsah byl pod mezí detekce v několika vzorcích listů. Byla zjištěna významně nižší koncentrace HGA v listech oproti nažkám.

V rámci mezidruhového srovnání byly zjištěny významně vyšší koncentrace HGA v nažkách javoru kleny oproti javoru jasanolistému.

HGA se podařilo prokázat také v javoru stříbrném a javoru dlanitolistém.

### Poděkování

Tato studie byla finančně podpořena projektem IGA VETUNI 2021, 204/2021/FVHE.

### Literatura

- FOWDEN, L.; PRATT, H. M. Cyclopropylamino acids of the genus *Acer*: distribution and biosynthesis. *Phytochemistry*. 1973, vol. 12, no. 7, s. 1677-1681.
- GONZÁLEZ-MEDINA, S.; HYDE, C.; LOVERA, I.; PIERCY, R.J. Detection of hypoglycin A and MCPA-carnitine in equine serum and muscle tissue: optimisation and validation of a LC-MS-based method without derivatisation. *Equine Veterinary Journal*. 2021, vol. 53, s. 558-568.
- McKENZIE, R. K.; HILL, F.; HABYARIMANA, J. A.; BOEMER, F.; VOTION, D. M. Detection of hypoglycin A in the seeds of sycamore (*Acer pseudoplatanus*) and box elder (*Acer negundo*) in New Zealand; the toxin associated with cases of equine atypical myopathy. *New Zealand Veterinary Journal*. 2016, vol. 64, s. 182-187.
- VALBERG, S. J.; SPONDELLER, B. T.; HEGEMAN, A.D. et. al. Seasonal pasture myopathy/atypical myopathy in North America associated with ingestion of hypoglycin A within seeds of the box elder tree. *Equine Veterinary Journal*. 2013, vol. 45, s. 419 - 426.
- VOTION, D. M.; HABYARIMANA, J. A.; SCIPPO, M. L. Potential new sources of hypoglycin A poisoning for equids kept at pasture in spring: a field pilot study. *Veterinary Record*. 2019, vol. 24, no. 184, s. 740
- VOTION, D.M. Atypical myopathy: an update. *In Practice*. 2016, vol. 38, s. 241-246.
- VOTION, D.M.; VAN GALEN, G.; SWEETMAN, L. et. al. Identification of methylencyclopropyl acetic acid in serum of European horses with atypical myopathy. *Equine Veterinary Journal*. 2014, vol. 46, s. 146-149.
- WESTERMANN, C.M.; VAN LEEUWEN, R.; VAN RAAMSDONK, L. W. D.; MOL, H.G.J. Hypoglycin A concentrations in maple tree species in the Netherlands and the occurrence of atypical myopathy in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2016, vol. 30, s. 880-884.

**Kontaktní adresa:** Tereza Novotná, MVDr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H20332@vfu.cz



## Microplastics and flame-retardants in oral ingestion: The emerging risk to freshwater organisms

<sup>1,2</sup>Hollerová Aneta, <sup>2</sup>Hodkovicová Nikola, <sup>1</sup>Blahová Jana, <sup>1</sup>Mikula Přemysl, <sup>1,3</sup>Medková Denisa, <sup>2</sup>Faldyna Martin, <sup>3</sup>Mareš Jan, <sup>1</sup>Svobodová Zdeňka

<sup>1</sup> Department of Animal Protection and Welfare & Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno

<sup>2</sup> Department of Infectious Diseases and Preventive Medicine, Veterinary Research Institute, Brno

<sup>3</sup> Department of Zoology, Fisheries, Hydrobiology and Apiculture, Faculty of AgriSciences, Mendel University in Brno

### Summary:

The main task was to evaluate the effects of pure polystyrene microplastic particles (PS-MPs) and PS-MPs containing flame-retardant hexabromocyclododecane (HBCD) on liver, intestine and skin tissue in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles via gene expression. Chosen genes are markers of oxidative stress, inflammation, xenobiotic metabolism and apoptosis. Tested fish were divided into control and four experimental groups, which were exposed to 2% PS-MPs, 1% HBCD, and mixtures with HBCD: 2%PS-MPs+0.1%HBCD, 2%PS-MPs+1%HBCD. Results showed significant differences in expression of interleukin 8, catalase, caspase 3, and cytochrome P450 1A3 related to control.

**Keywords:** polystyrene; HBCD; fish; toxicology; gene expression

### Introduction

Plastic pollution is a global problem caused by an excessive use of this material, high resistance in environment and poor waste management. In the aquatic environment, the external conditions promote the release of smaller particles from plastics objects of large size – microplastics (< 5 mm; MPs), which are found in many organisms across trophic levels (Eerkes-Merano et al., 2015). One of the most common type of plastic polluting the environment is polystyrene (PS), which commonly contains flame-retardant, hexabromocyclododecane (HBCD), in high percentage (Cheng et al., 2020). In general, oral ingestion of MPs can cause mechanical damage and obstruction of digestive tract and particles < 600 µm are able to cross intestinal barriers, enter the blood stream and can be transported to tissues (Hodkovicova et al., 2021). While in vertebrates, the toxicity of HBCD has been extensively studied with discovered reproductive and developmental toxicity, neurotoxicity, mutagenicity, as well as endocrine disrupting effects (Cheng et al., 2020), the mechanism of toxicity is not fully clarified in fish to date. This study was focused on the analysis of genes via gene expression, which will be the basis for further analyses.

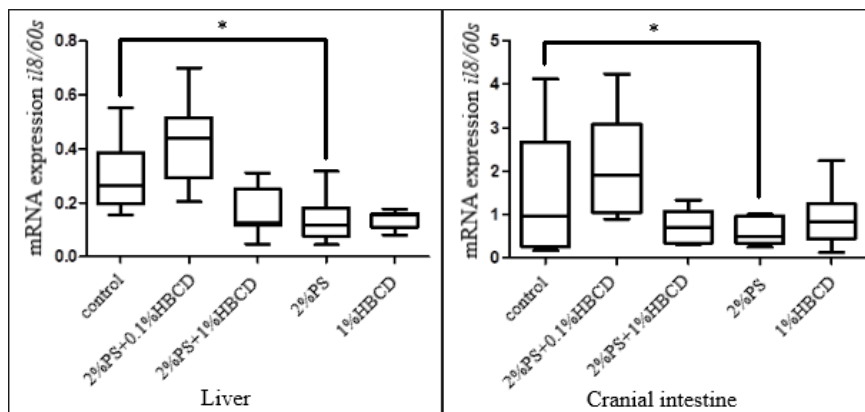
### Materials and methods

The experimental part of the study was carried out in accordance with Fish Juvenile Growth Test (OECD 215) in duplicate. A total of 144 *Oncorhynchus mykiss* juveniles were randomly divided to control and groups exposed to 2%PS (in size 200-300 µm), 1%HBCD and mixtures of 2%PS+ 0.1%HBCD and 2%PS + 1%HBCD of their daily feed intake. The experiment was terminated after six weeks. For gene expression analysis made by quantitative real-time polymerase chain reaction method, the samples of liver, skin and cranial intestine (n=10 per group) were processed according to Hodkovicova et al. (2021). The primer sequences of interleukin 8 (*il8*) and reference gene 60s ribosomal protein (*60s*) were adapted from the same study; catalase (*cat*) primer sequences were adapted from Bertucci et al. (2020); caspase 3 (*casp3*) from Overturf et al. (2009) and cytochrome P450 1a3 (*cyp1a3*) from Hook et al. (2006). Statistical analysis was performed using the statistical software Prism 8 (GraphPad). The difference was considered as a statistically significant if  $p < 0.05$ .

## Results and discussion

During the experiment lasting, the expression of *il8* decreased in the group exposed to 2%PS-MPs in the liver and cranial intestine (Figure 1).

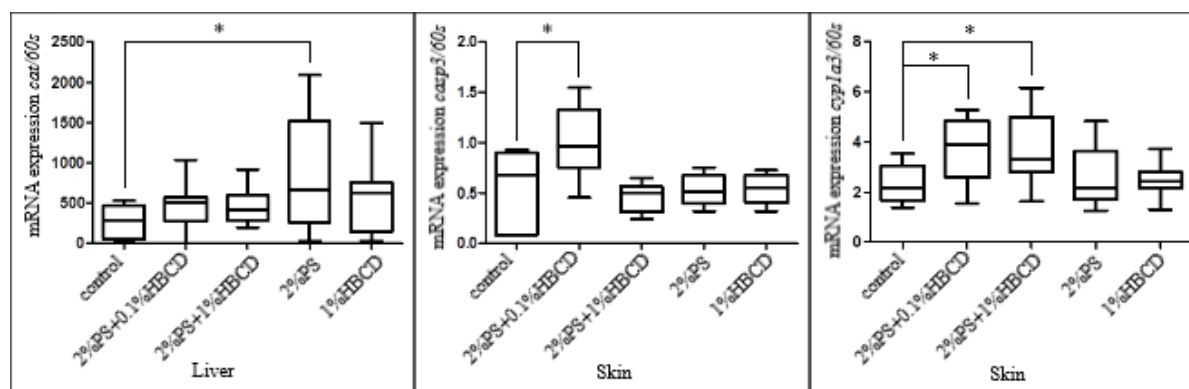
Figure 1: Significant decrease in the *il8* in liver and cranial intestine. Results with significance are marked with \* ( $p < 0.05$ ).



Cytokine *il8* is produced mainly by monocytes to recruit neutrophils as well as trigger cytotoxic effect in site of infection. Hodkovicova et al. (2021) observed *il8* up-regulation in the liver and cranial kidney of rainbow trout exposed to polyethylene MPs. In this case, uncontrolled proliferation with potential to participate in chronic diseases can occur. Our study showed the opposite results, i.e. - *il8* down-regulation by 2%PS, which can affect the immune system by limitation of neutrophil function (Wang et al., 2017). This demonstrate the various effect of different types of MPs and need for further investigations.

In addition, in liver tissue the expression of *cat* increased at 2%PS. In the skin, the expression of *casp3* increased in 2%PS + 0.1%HBCD, *cyp1a3* increased in 2%PS + 0.1%HB CD, also in 2%PS + 1%HBCD in compared to control. The results are expressed in figure 2.

Figure 2: Significant differences in the expression of *cat* in liver, *casp3* and *cyp1a3* in skin. Results with significance are marked with \* ( $p < 0.05$ ).



Catalase is antioxidant enzyme and marker of oxidative stress that breaks down hydrogen peroxide into oxygen and water. Increased *cat* expression is likely a response to toxic stress triggered by PS-MPs and serve to neutralize the increased reactive oxygen species production (Kumari et al., 2014). During experiment, the *casp3* expression increased in 2%PS + 0.1% HBCD. The PS and HBCD combination up-regulated gene initiate apoptosis by DNA fragmentation. Apoptotic signals converge at the mitochondrial level, causing the release of certain apoptosis-inducing proteins (e.q. cytochrome 1a) (Deng et al., 2009). Cytochrome 1a3 belongs to P450 superfamily of enzymes which catalyse oxidative, peroxidative, and

reductive xenobiotic metabolism. In addition, combination of PS and HBCD caused up-regulation of *cyp1a3* in skin by which we hypothesize that molecular detoxifying mechanisms was activated (Bertucci et al., 2020). In summary, prolonged weakening of liver, intestine and skin can cause severe health disruption and increase fish mortality. Histopathological examination and analysis of oxidative stress will be made to verify our hypothesis for mechanism of toxicity provoked by PS and its common additive, HBCD.

### Conclusion

Experiment confirmed that oral exposure to PS-MPs can affect the function of immune system in rainbow trout. Moreover, combined exposure to PS-MPs and HBCD caused oxidative stress, affected xenobiotic metabolism and resulted in increased apoptosis.

### Acknowledgement

This research was supported by ERDF/ESF "Profish" [no. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000869].

### References

- BERTUCCI, J.I., BANDARALAGE, S.M.I., HECKER, M. Assessing the cytotoxic effect of hexabromocyclododecane (HBCD) on liver tissue cultures from fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*. 2020, vol. 225, 105523.
- CHENG, H., LUO, H., HU, Y., TAO, S. Release kinetics as a key linkage between the occurrence of flame retardants in Microplastics and their risk to the environment and ecosystem: A critical review. *Water Research*. 2020, vol. 185, 116253.
- DENG, J., YU, L., LIU, C., YU, K., SHI, X., YEUNG, L.W.Y., LAM, P.K.S., WU, R.S.S., ZHOU, B. Hexabromocyclododecane-induced developmental toxicity and apoptosis in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*. 2009, vol. 93, p. 29-36.
- EERKES-MEDRANO, D., THOMPSON, R.C., ALDRIDGE, D.C. Microplastics in freshwater systems: A review of emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water Research*. 2015, vol. 75, p. 63-82.
- HODKOVICOVA, N., HOLLEROVA, A., CALOUDOVA, H., BLAHOVA, J., FRANC, A., GARAJOVA, M., LENZ, J., TICHY, F., FALDYNA, M., KULICH, P., MARES, J., MACHAT, R., ENEVOVA, V., SVOBODOVA, Z. Do foodborne polyethylene microparticles affect the health of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)? *Science of Total Environment*. 2021, vol. 793, 148490.
- KUMARI, K., KHARE, A., DANGE, S. The applicability of oxidative stress biomarkers in assessing chromium induces toxicity in the fish *Labeo rohita*. *Toxicity of Environmental Contaminants*. 2014, 782493.
- OVERTURF, K., GAYLORD, T.G. Determination of relative protein degradation activity at different life stages in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2009, vol. 152, p. 150-160.
- WANG, G.L., WANG, M.C., ZHANG, X.W., CHANG, M.X., XIE, H.X., NIE, P. Molecular cloning, biological effect, and tissue distribution of interleukin-8 in mandarin fish (*Siniperca chuasti*) upon *Flavobacterium columnare* infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 2017, vol. 66, p. 112-119.

**Contact address:** Aneta Hollerová, Mgr., Department of Animal Protection and Welfare & Veterinary Public Health, FVHE VETUNI Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, aneta.hollerova@vri.cz

## Residues of drugs used to treat diseases of affluence and their effects on zebrafish embryos (*Danio rerio*)

<sup>1,2,3</sup>Medkova Denisa, <sup>1</sup>Lakdawala Pavla, <sup>1,4</sup>Hollerova Aneta, <sup>1</sup>Blahova Jana, <sup>3</sup>Postulkova Eva, <sup>1</sup>Svobodova Zdenka

<sup>1</sup>Department of Animal Protection and Welfare & Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno

<sup>2</sup>Department of Animal Breeding, Animal Nutrition and Biochemistry, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno

<sup>3</sup>Department of Zoology, Fisheries, Hydrobiology and Apiculture, Faculty of Agrisciences, Mendel University in Brno

<sup>4</sup>Department of Infectious Diseases & Preventive Medicine, Veterinary Research Institute, Brno

### Summary

Contamination of the aquatic environment with residues of drugs used for the treatment of diseases of affluence is constantly increasing. One of the reasons is imperfect purification in wastewater treatment plants. Another reason is the increasing prescribes and uses of these drugs. Drug residues can have a negative effect on aquatic environment and non-target aquatic organisms. In our study, the toxicity of metformin, metoprolol and enalapril on zebrafish (*Danio rerio*) embryos in five different concentrations was tested. The acute toxicity test was performed according to OECD Guideline No 236. As a result, various negative effect on embryos exposed to metformin, metoprolol and enalapril were observed.

**Keywords:** toxicity tests; aquatic contamination; mortality; hatching; development

### Introduction

Pharmaceutical active substances have been constantly entering the aquatic environment. They are excreted in the origin state or as metabolites through human excretions (Rojo et al., 2021). Furthermore, the removal efficiency of wastewater treatment plants is usually imperfect. Since the pharmaceuticals are entering water bodies continuously, they represent a potential risk for aquatic biota. Moreover, these substances have been considered to be pseudo-persistent contaminants (Rojo et al., 2021). The aim of this experiment was to study toxic effects of typical drugs used for treatment of diseases of affluence as diabetes, cardiovascular diseases and hypertension on fish early life stages (represented by zebrafish embryos). Metformin is the most common drug used to treat type II Diabetes (Elizalde-Velázquez et al., 2021). Metoprolol and enalapril are used to treat diseases of the cardiovascular system and hypertension (van den Brandhof et al., 2010).

### Materials and methods

The experiment was performed according to the Guideline for Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (OECD 2013) for the period of 96 hours with five different concentrations of tested substances. Tested concentration for metoprolol and enalapril were 0.1 (environmental concentration); 10; 100; 1 000 and 100 000 µg/L and for metformin it was 1 (environmental concentration); 10; 100; 1 000 and 100 000 µg/L. Zebrafish eggs were obtained from the certified breeding of Mendel University in Brno. Fertilized eggs of zebrafish were selected using binocular microscope and distributed into 24 microwell for each concentration. Drugs were soluble in ISO 7346 water (ISO, 1996). Embryos were incubated at 26°C with photoperiod 12 hours light/12 hours dark. The solutions were changed every day. We observed mortality, malformation, hatching rate and heartbeat. Statistical analysis was conducted using Unistat 5.6 for Excel.

## Results and discussion

All tested substances at all tested concentrations had a negative effect on hatching rate of zebrafish embryos. In particular, we were observed significantly reduced hatching after 72h exposure among all groups in comparison to the control group. At this time, the mean hatchability percentage was below 50% for embryos exposed to metoprolol, enalapril and metformin, whereas in the control it was 85.7%. However, this significant difference in hatching rate between exposed groups and the control was not any more observed at 96 hours post fertilization (hpf). Van den Brandhof et al. (2010) also described effect on hatching rate at the concentration 50 500 mg/L. Enalapril caused a statistically significant increase ( $p < 0.01$ , 29%) in mortality at the highest tested concentration (100 000  $\mu\text{g/L}$ ). Mortality of embryos exposed to 100  $\mu\text{g/L}$  of metformin was 29% and at 1 000  $\mu\text{g/L}$  and 100 000  $\mu\text{g/L}$  of metformin was 25%. Elizalde-Velázquez et al. (2021) observed statistically higher mortality at the concentration 75  $\mu\text{g/L}$  and 100  $\mu\text{g/L}$  of metformin. Metoprolol did not have no effect on mortality of zebrafish. Brandhof et al. (2010) reported  $\text{LC}_{50}$  of metoprolol for fish  $\geq 101\ 000$  mg/L. At the highest tested concentration (100 000  $\mu\text{g/L}$ ) of metoprolol, enalapril and metformin higher heartbeat were observed. Metoprolol and metformin also caused higher heartbeat at the concentration 1 000  $\mu\text{g/L}$ . Nevertheless, the tested substances had no statistically significant effect on malformation.

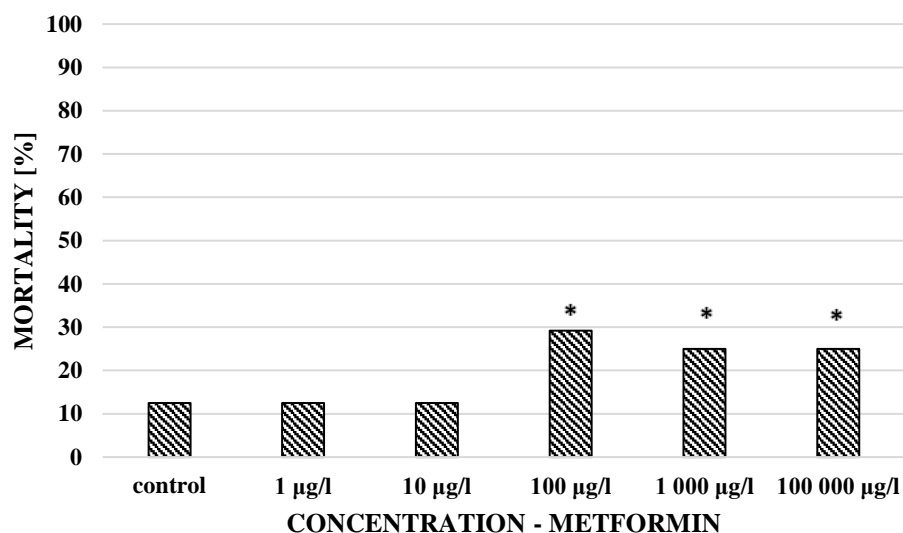


Figure 1: Mortality of zebrafish at 96 hpf after exposure to metformin (\* -  $p < 0.05$ ).

## Conclusion

The results of the study show that drugs commonly used to treat diseases of affluence can have a negative effect on aquatic biota. These substances influence hatching rate and mortality therefore it is important to constantly monitor residues of the pharmaceutical active substances in the aquatic environment. However, it is necessary to point out that this test only took 96 hours, therefore it was an acute toxicity test. More subchronic and chronic toxicity studies with environmentally-relevant concentrations of these pharmaceuticals need to be carried out in order to see whether there is an effect on expression of genes responsible for development of early organisms, activity of defencing enzymes, etc.

## Acknowledgments

This research was supported by project IGA VETUNI Brno 213/2022/FVHE and PROFISH [no. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000869].

**References**

ELIZALDE-VELÁZQUEZ, G.A., GÓMEZ-OLIVÁN, L.M., GARCÍA-MEDINA, S., ISLAS-FLOREZ, H., HERNÁNDEZ-NAVARRO, M.D., GALAR-MARTÍNEZ, M. Antidiabetic drug metformin disrupts the embryogenesis in zebrafish through an oxidative stress mechanism. *Chemosphere*, December 2021, vol. 285, 131213.

ISO 7346. 1996. Waterquality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwaterfish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – Part 1: Static metod.

OECD 2013. Test No 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, France.

ROJO, M., CRISTOS, D., GONZÁLEZ, P., LÓPEZ-ACA, V, DOMÁNICO, A., CARRIQUIRIBORDE, P. Accumulation of human pharmaceuticals and activity of biotransformation enzymes in fish from two areas of the lower Rio de la Plata Basin. *Chemosphere*, March 2021, vol. 266, 129012.

VAN DEN BRANDHOF, E.J., MONTFORTS, M. Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, November 2010, vol. 78, no. 8, s.1862–1866.

**Kontaktní adresa:** Denisa Medková, MVDr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1945/1, 612 42, H19004@vfu.cz

# **SEKCE 5**

## **Veterinární ekologie a choroby volně žijících zvířat**

## Netopýři jako rezervoár zoonotických patogenů

### Bats as reservoirs of zoonotic pathogens

<sup>1</sup>Šárka Bednaříková, <sup>1,2</sup>Veronika Seidlová, <sup>1</sup>Monika Němcová, <sup>3</sup>Alena Balážová, <sup>1</sup>Jana Sedláčková, <sup>2</sup>Jan Zukal, <sup>1</sup>Jiří Pikula

<sup>1</sup>Ústav ekologie a chorob zoonozivních zvířat, zvěře, ryba a včel, Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Česká republika

<sup>2</sup>Ústav biologie obratlovců Akademie věd ČR v.v.i., Květná 8, 603 65 Brno, Česká republika

<sup>3</sup>Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Česká republika

#### Summary

Wildlife species are important hosts for many bacterial pathogens and thus play a crucial role in the maintenance and distribution of certain diseases in natural and/or even urban cycles. European bats can be important reservoirs of some bacterial zoonotic pathogens. In this study, we tested for the presence of bacterial agents in bat tissues from the Czech Republic and Slovakia. The cadavers were collected between 2009–2017 and we detected *Leptospira* spp. in twelve kidney samples (prevalence 5.11 %), *Rickettsia* spp. in nine samples (prevalence 4.57 %) and *Anaplasma phagocytophylum* in one sample (prevalence 0.51 %) of spleen. No liver samples were positive for *Bartonella* spp.

**Keywords:** *Leptospira* spp.; *Bartonella* spp.; *Rickettsia* spp.; *Anaplasma phagocytophylum*; PCR; real-time PCR; Central European bats

#### Úvod

Netopýři jsou významným rezervoárem virových i bakteriálních patogenů a hrají důležitou roli v epidemiologii a šíření patogenů ve světě. Existuje také riziko přenosu bakteriálních patogenů z netopýřů na člověka. Zdá se, že způsob života netopýřů v blízkosti lidí a lidských obydlí navíc může usnadnit tento přenos (Lei and Olival, 2014). V této studii jsme proto podrobili orgány netopýřů detekci vybraných patogenů *Bartonella* spp., *Leptospira* spp., *Rickettsia* spp. a *Anaplasma* sp. metodou PCR. Objasnění rozmanitosti těchto bakterií u netopýřů nám může pomoci pochopit roli netopýřů jako hostitelů nebo přenašečů zoonotických patogenů.

#### Materiál a metodika

Vzorky pocházejí z uhynulých netopýřů tří druhů (*Myotis myotis*, *Nyctalus noctula* a *Vespertilio murinus*) nalezených mezi lety 2009–2017 na území České republiky a Slovenska. Po pitvě netopýřů byly jednotlivé vzorky orgánů umístěny do zkumavek se 70% ethanolem nebo zmrazeny na -80 °C v RNA lateru (tabulka č. 1). Pro analýzy bylo použito 235 vzorků jater pro detekci *Bartonella* spp. a 235 vzorků ledvin pro detekci *Leptospira* spp. Ke stanovení *Rickettsia* spp. a *A. phagocytophylum* bylo využito 197 vzorků sleziny.



Tabulka č. 1: Přehled základních údajů o vzorcích.

	<i>Bartonella</i> spp.	<i>Leptospira</i> spp.	<i>Rickettsia</i> spp. a <i>A. phagocytophylum</i>
Typ vzorku	játra	ledviny	slezina
<i>Myotis myotis</i>	187	187	155
<i>Nyctalus noctula</i>	43	43	38
<i>Vespertilio murinus</i>	5	5	4
samice	160	160	139
samci	75	75	58
Česká republika	225	225	190
Slovenská republika	10	10	7
Celkem vzorků	235	235	197

DNA byla nejprve extrahována z jater, ledvin a slezin pomocí kitu NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Dueren, Německo) dle pokynů výrobce. Následně byla provedena PCR amplifikace DNA *Bartonella* spp. dle Schorn et al. (2011) a *Leptospira* spp. dle Ahmed et al. (2012) a Merien et al. (1992). V případě *Rickettsia* spp. a *A. phagocytophylum* bylo využito duplex real-time PCR podle Balážová et al. (2020). Přehled primerů a sond je uveden v tabulce č. 2. Podmínky PCR reakcí jsou shrnuty v tabulce č. 3. Všechny PCR pozitivní produkty byly sekvenovány pomocí Sangerova sekvenování a následně porovnány se sekvencemi v GenBank pomocí MegaBLAST.

Tabulka č. 2: Použité primery a sondy.

patogen	primery/sondy	název	sekvence	zdroj
<i>Bartonella</i> spp.	primer	BA 325	CTTCAGATGATGATCCCAAGCCTTCTGGCG	Schorn et al., 2011
		BA 1100	GAACCGACGACCCCTGCTTGCAAAGCA	
<i>Leptospira</i> spp.	primer	Lau02	AGC AGA CCA ACA GAT GCA ACG	Ahmed et al., 2012
		Lau01	ACT CTT TGC AAG CAT TAC CGC	Merien et al., 1992
		Lep R	TCC CCC CAT TGA GCA AGA TT	
		Lep F	GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG	
<i>Rickettsia</i> spp.	primer	gltA-CS-5	GAGAGAAAATTATATATCCAAATGTTGAT	Labruna et al., 2004
		gltA-CS-6	AGGGTCTTCGTGCATTCTT	
	sonda	gltA-CS probe Hex	CATTGTGCCATCCAGCCTACGGT	
<i>Anaplasma</i> spp.	primer	ApMSPf	ATGGAAGGTAGTGTGGTTATGGTATT	Courtney et al., 2004
		ApMSPr	TTGGTCTTGAAGCGCTCGTA	
	sonda	ApMSPp-HEX	TGGTGCCAGGGTTGAGCTTGAGATTG	

Tabulka č. 3: Podmínky metody PCR a real-time PCR.

	metoda	fáze	počet cyklů	cílové teplota (°C)	trvání (h:m:s)
<i>Bartonella</i> spp.	PCR	počáteční denaturace	1	95	0:15:00
				94	0:00:30
		amplifikace	38	66	0:00:50
				72	0:00:30
závěrečná polymerační reakce		1	72	0:05:00	
<i>Leptospira</i> spp.	PCR	počáteční denaturace	1	94	0:03:00
				94	0:00:30
		amplifikace	40	58	0:00:30
				72	0:00:40
závěrečná polymerační reakce		1	72	0:05:00	
<i>Rickettsia</i> spp. a <i>A. phagocytophylum</i>	qPCR	počáteční denaturace	1	95	0:10:00
				95	0:00:10
		amplifikace	45	51	0:00:10
				60	0:00:30
závěrečná polymerační reakce		1	40	0:00:10	

## Výsledky

Z vyšetřených vzorků ledvin bylo *Leptospira* spp. pozitivních 5,11 %, z toho v České republice 4,89 % a ze Slovenské republiky 10 % z vyšetřených netopýřů. Celkově převažovaly samice 12,8 % nad samci. Pokud jde o druhy netopýřů, leptospiry byly detekovány u 5,88 % *M. myotis* a u 2,33 % *N. noctula*. DNA *Rickettsia* spp. byla nalezena ve 4,57 % vzorků slezin, a to ve všech případech u netopýřů z České republiky 4,74 % a to pouze u samic 12,51 %. Co se druhů netopýřů týče, detekovali jsme rickettsie u 2,58 % *M. myotis*, 10,53 % *N. noctula* a u 25 % *V. murinus*. *A. phagocytophylum* byla nalezena u

jednoho z vyšetřovaných netopýrů, a to u samice druhu *N. noctula* z České republiky. Ani v jednom případě pozitivního vzorku se nejednalo o koinfekci. DNA *Bartonella* spp. jsme nedetekovali u žádného z 235 vzorků jater.

### Diskuze

Specifické ekologické, epidemiologické a imunologické faktory umožňují netopýrům přenášet široké spektrum zoonotických patogenů (Mühldorfer, 2013). Již dřívější studie uvedly riziko přenosu některých bakteriálních agens vyskytujících se u netopýrů na člověka. Přenos zoonotických patogenů mezi netopýry a lidmi mohou ovlivňovat také antropogenní změny (Hayman et al., 2013), což by mohlo předpovídat potencionální vzrůstající nebezpečí do budoucnosti. Studie také poskytují informace o bakteriích, které se zdají být specifické pouze pro netopýry a/nebo mohou být spojeny s určitými druhy netopýrů, jejich stanovišti nebo ektoparazity. V některých případech navíc infikovaní netopýři nevykazují specifické příznaky onemocnění, což by mohlo naznačovat koevoluci bakterií s hostitelem (Mühldorfer, 2017; Mühldorfer, 2013).

I přesto se však jen málo studií zabývá bakteriálním osídlením orgánů a tkání netopýrů. Často jsou využívány matrice jako například trus, moč, sliny nebo hematofágní ektoparazité netopýrů. Aktivní monitoring patogenů pomocí invazivně odebraných vzorků je znemožněn hlavně v důsledku legislativní ochrany netopýrů v Evropě. Z toho důvodu analýzy provedené na kadáverech jsou cenným zdrojem informací.

### Závěr

Cílem studie bylo vyšetřit netopýří kadávery na přítomnost bakterií *Bartonella* spp. v játrech, *Leptospira* spp. v ledvinách a *Rickettsia* spp. a *A. phagocytophilum* v tkáni slezin získaných na území České a Slovenské republiky. Nejvyšší záchyt ve vzorcích byly bakterie *Leptospira* spp. s celkovou prevalencí 5,11 %, následovaly *Rickettsia* spp. s prevalencí 4,57 % a bakterii *A. phagocytophilum* jsme detekovali v jednom vzorku. Metoda PCR neodhalila přítomnost bakterií *Bartonella* spp. ani v jednom odebraném vzorku.

### Literatura

- AHMED, S.A.; SANDAI, D.A.; MUSA, S.; HOE, C.H.; RIADZI, M.; LAU, K.L.; TANG, T.H. Rapid diagnosis of leptospirosis by multiplex PCR. *The Malaysian journal of medical sciences*. 2012, vol. 19, no. 3, s. 9.
- 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, vol. 11, no. 5.
- COURTNEY, J.W.; KOSTELNIK, L.M.; ZEIDNER, N.S.; MASSUNG, R.F. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, vol. 42, no. 7, s. 3164–3168.
- HAYMAN, D.T.; BOWEN, R.A.; CRYAN, P.M.; MCCRACKEN, G.F.; O'SHEA, T.J.; PEEL, A.J.; GILBERT, A.; WEBB, C.T.; WOOD, J.L. Ecology of zoonotic infectious diseases in bats: current knowledge and future directions. *Zoonoses and Public Health*. 2013, vol. 60, no. 1, s. 2–21.
- LABRUNA, M.B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M.C.; BOUYER, D.H.; MCBRIDE, J.W.; PINTER, A.; POPOY, V.; GENNARI, S.M.; WALKER, D.H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, vol. 4, no.1, s. 90–98.
- LEI, B.R.; OLIVAL, K.J. Contrasting Patterns in Mammal–Bacteria Coevolution: *Bartonella* and *Leptospira* in Bats and Rodents. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2014, vol. 8, no. 3.

---

MERIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992, vol. 30, no. 9, s. 2219–24.

MÜHLDORFER, K. Bats and Bacterial Pathogens: A Review. *Zoonoses and Public Health*. 2013, s. 60.

MÜHLDORFER, K. Bats, bacteria and their role in health and disease. *Microbiology Australia*. 2017, vol. 38, s. 28–29.

SCHORN, S.; PFISTER, K.; REULEN, H.; MAHLING, M.; SILAGHI, C. Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Parasites & Vectors*. 2011, vol. 4, no. 1, s. 135.

**Kontaktní adresa:** Šárka Bednaříková, Mgr., Ústav ekologie a chorob zoovířat, zvěře, ryb a včel, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H20322@vfu.cz

## Detekce trypanosom v krvi zajíců polních (*Lepus europaeus*) z České republiky

### Detection of trypanosomes in blood of European brown hares (*Lepus europaeus*) from the Czech Republic

<sup>1</sup>Veitová Lucie, <sup>1</sup>Kalocsányiová Vendula, <sup>1</sup>Band'ouchová Hana, <sup>1</sup>Heger Tomáš, <sup>2</sup>Lesiczka Paulina Maria, <sup>1</sup>Linhart Petr, <sup>1</sup>Piaček Vladimír, <sup>1</sup>Sedláčková Jana, <sup>1</sup>Pikula Jiří

<sup>1</sup>Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno

<sup>2</sup>Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno

#### Summary

Trypanosomes are an important genus of unicellular parasites belonging to the class Kinetoplastea. They are able to infect a variety of vertebrates. In the Czech Republic, they were detected in many vertebrates, including bats. The European brown hare (*Lepus europaeus*), representative of the order Lagomorpha, can be a reservoir of many infections. Its populations in Czechia have been declining for a long time. We analysed 200 samples of blood from hares for presence of trypanosomes using nested PCR. There were two positive samples that we sent for sequencing. This is the first time, when trypanosomes have been directly detected in the European brown hare.

**Keywords:** Trypanosoma; European hare; *Lepus europaeus*; nested PCR; Czech Republic

#### Úvod

Zajíc polní (*Lepus europaeus*) je původně stepní druh, který se s nástupem zemědělství úspěšně adaptoval na rozmanitou zemědělskou krajinu (Frylestam, 1980). Mimo období páření žije samotářsky, velikost jeho teritoria se pohybuje v rozmezí 10–100 ha (Reitz and Leonard, 1994). Zajíc ve svém teritoriu potřebuje mít k dispozici dostatek potravy a je pro něj velmi důležitá rozmanitost bylin a plodin, které se zde pěstují (Tapper and Barnes, 1986). V Evropě dochází k neustálému poklesu populací zajíců již od 60. let minulého století. Je všeobecně známo, že za dlouhodobým poklesem stojí především změny v obhospodařování zemědělské půdy, což vede ke ztrátě rozmanitosti krajiny a pěstovaných plodin. Pokles populací zajíců způsobují také predátoři a onemocnění, tyto faktory však pravděpodobně působí spíše krátkodobě (Edwards et al., 2000). Zajíci mohou rovněž fungovat jako zdroj mnoha infekčních onemocnění, např. pasteurelózy, pseudotuberkulózy, brucelózy (Edwards et al., 2000), tularemie, listeriózy a boreliózy (Tremel et al., 2007). U zajíců byli také detekováni původci významných endoparazitárních onemocnění, např. *Toxoplasma gondii* a *Leishmania infantum* (Tsokana et al., 2019)

Trypanosomy patří do kmenu Euglenozoa a třídy Kinetoplastea (Adl et al., 2019) jsou skupinou významných a celosvětově rozšířených parazitů způsobujících vážná onemocnění lidí a hospodářských i volně žijících zvířat. Nejvíce studovanými druhy jsou ty, které způsobují vážná onemocnění u lidí a nejsou endemické na evropském kontinentu. Mezi autochtonní druhy v Evropě patří např. *Trypanosoma theileri*, *T. melophagium* nebo *T. lewisi*. V České republice jsou popsány např. *Trypanosoma grosi*, *T. vespertilionis* a *T. dionisii* (Magri et al., 2021). U zajíce polního zatím nebyly trypanosomy prokázány, cílem naší studie tedy bylo vyšetřit pomocí nested PCR vzorky krve zajíců z České republiky právě na přítomnost trypanosom.

#### Materiál a metody

K vyšetření byly použity vzorky krve zajíců ulovených v roce 2021 v lokalitách Drnholec (n= 2), Kyjov (n= 10), Letovice (n= 3), Opatovice (n= 8), Tuřany (n=89), Velké Pavlovce

(n= 62), Znojmo (n= 3) a Žichlínek (n= 23). Krev byla odebírána pomocí jehly a stříkačky ze srdce. Izolace DNA byla provedena pomocí komerčního kitu DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Německo). K detekci trypanosom byla použita metoda nested PCR podle protokolu pro detekci *Trypanosoma spp.* popsané v publikaci Seward et al. (2017). PCR byla provedena pomocí přístroje Mini Opticon (Bio-Rad, USA) s reakční směsí (20 µl) obsahující 10 µl EmeraldAmp Max PCR Master Mix (Takara, Japan), 4 µl vody, 0.5 µl každého primeru (10 pmol/µl) a 5 µl izolované DNA v prvním kole. Ve druhém kole bylo použito 5 µl PCR produktu z prvního kola místo DNA. Pozitivní bendy byly vyříznuty z gelu a purifikovány pomocí kitu High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Švýcarsko). Purifikovaná DNA byla zaslána na sekvenaci.

### Výsledky

Z celkem 200 vyšetřovaných zajíců byli 2 pozitivní na přítomnost *Trypanosoma spp.* V obou případech se jednalo o dospělé samce z Tuřan. Osekvenovaná část 18S rDNA byla porovnána pomocí BLAST (NCBI). Největší podobnost vykazovaly oba naše vzorky se sekvencí *Trypanosoma pestanai* (AJ009159; podobnost 94,84 %).

### Diskuze

*Trypanosoma pestanai* patří do podrodu *Megatrypanum*. Tento podrod má širokou škálu vektorů, zahrnující ovády (*T. theileri*), kloše (*T. melophagium*) a roztoče (*T. talpae*). Vektorem *T. pestanai* je blecha *Paraceras melis*, jejímž hostitelem je jezevec lesní (*Meles meles*). Ve skupině *Megatrypanum* je to výjimečné a je možné, že *T. pestanai* má užší vztah s parazity zařazenými do podrodu *Herpetosoma* (Lizundia et al., 2011). Na zajících polních parazitují nejrůznější druhy blech, např. *Pullex irritans*, *Nosopsyllus fasciatus* (Dik a Uslu, 2018), *Spilopsyllus cuniculi* nebo *Echidnophaga myrmecobii* (Shepherd et al., 1977). *N. fasciatus* a *S. cuniculi* jsou vektory trypanosom, první z nich přenáší *T. evotomys*, druhá *T. nabiasi* (Molyneux, 1969; Hamilton et al., 2005). Tyto druhy trypanosom patří do skupiny *Herpetosoma*, přičemž *T. nabiasi* je parazitem se zajícem příbuzného králíka divokého (*Oryctolagus cuniculus*). Vzhledem k nejbližší podobnosti s *T. pestanai* je u námi detekovaného druhu trypanosomy rovněž pravděpodobný přenos blechami. Nasvědčuje tomu i skutečnost, že také *Trypanosoma nabiasi* u králíků je přenášena blechami. K získání dalších informací o novém druhu trypanosomy, o cestě přenosu a vlivu na zdravotní stav zajíců, je však zapotřebí dalšího výzkumu.

### Závěr

U zajíců zatím nebyly trypanosomy přímo detekovány. V naší studii byly zjištěny ve dvou z celkem 200 vyšetřených vzorků. Sekvenací a následným srovnáním se sekvencemi v databázi NCBI bylo zjištěno, že se zřejmě jedná o dosud nepopsaný druh, nejvíce podobný *T. pestanai*, která se vyskytuje u jezevců.

### Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem ITA VETUNI (č. 2021ITA21).

### Literatura

ADL, S. M., BASS, D., LANE, C. E., LUKEŠ, J., SCHOCH, C. L., SMIRNOV, A., AGATHA, S., BERNEY, C., BROWN, M. W., BURKI, F.; et al. Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2019, vol. 66, no. 1, p. 4-119.

DIK, B., USLU, U. Ectoparasites of hares (*Lepus europaeus* Pallas) in Konya province, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2018, vol. 42, no. 1, p. 65-72.

- EDWARDS, P. J., FLETCHER, M. R., BERNY, P. Review of the factors affecting the decline of the European brown hare, *Lepus europaeus* (Pallas, 1778) and the use of wildlife incident data to evaluate the significance of paraquat. *Agriculture, ecosystems & environment*. 2000, vol. 79, no. 2-3, p. 95-103.
- FRYLESTAM, B. Utilisation of farmland habitats by European hares, (*Lepus europaeus*, Pallas) in southern Sweden. *Swedish Wildlife Research*. 1980, vol. 11, p. 271-284.
- HAMILTON, P. B., STEVENS, J. R., HOLZ, P., BOAG, B., COOKE, B., GIBSON, W. C. The inadvertent introduction into Australia of *Trypanosoma nabiasi*, the trypanosome of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and its potential for biocontrol. *Molecular Ecology*. 2005, vol. 14, no. 10, p. 3167-3175.
- LIZUNDIA, R., NEWMAN, C., BUESCHING, C. D., NGUGI, D., BLAKE, D., SIN, Y. W., et al. Evidence for a Role of the Host-Specific Flea (*Paraceras melis*) in the Transmission of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *pestanai* to the European Badger. *PLoS ONE*. 2011, vol. 6, no. 2, e16977.
- MAGRI, A., GALUPPI, R., FIORAVANTI, M. Autochthonous *Trypanosoma spp.* in European Mammals: A Brief Journey amongst the Neglected Trypanosomes. *Pathogens*. 2021, vol. 10, no. 3, p. 334.
- MOLYNEUX, D. H. The morphology and biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) evotomys* of the bank-vole, *Clethrionomys glareolus*. *Parasitology*. 1969, vol. 59, no. 4, p. 843-857.
- REITZ, F., LEONARD, Y. Characteristics of European hare, *Lepus europaeus*, use of space in a French agricultural region of intensive farming. *Acta Theriologica*. 1994, vol. 39, p. 143-157.
- SEWARD, E. A., VOTÝPKA, J., KMENT, P., LUKEŠ, J., KELLY, S. Description of *Phytomonas oxycareni* n. sp. from the salivary glands of *Oxycarenum lavaterae*. *Protist*. 2017, vol. 168, p. 71-79.
- SHEPHERD, R. C., NOLAN, I. F., LANE, I. L., EDMONDS, J. W. Ectoparasites of the European hare (*Lepus europaeus* (Pallas)) in two regions of Victoria. *Australian Journal of Entomology*. 1977, vol. 16, no. 1, p. 1-5.
- TAPERR, S. C., BARNES R. F. W. Influence of farming practice on the ecology of the brown hare (*Lepus europaeus*). *Journal of Applied Ecology*. 1986, vol. 23, p. 39-52.
- TREML F., PIKULA J., BANDŮCHOVÁ H., HORÁKOVÁ J. European brown hare as a potential source of zoonotic agents. *Veterinární Medicína*. 2007, vol. 52, p. 451-456.
- TSOKANA, C. N., SOKOS, C., GIANNAKOPOULOS, A., BIRTSAS, P., ATHANASIOU, L. V., VALIAKOS, G., SOFIA, M., CHATZOPOULOS, D.C., KANTERE, M., SPYROU, V., BURRIEL, A.R., BILLINIS, C. Serological and molecular investigation of selected parasitic pathogens in European brown hare (*Lepus europaeus*) in Greece: inferring the ecological niche of *Toxoplasma gondii* and *Leishmania infantum* in hares. *Parasitology Research*. 2019, vol. 118, no. 9, p. 2715-2721.
- Kontaktní adresa:** Lucie Veitová, Mgr., Ústav ekologie a chorob zoonozvířat, zvěře, ryb a včel, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H20328@vfu.cz

## Genetic diversity of Lake Sinai Virus in the Czech Republic

<sup>1,2</sup>Eliška Čukanová, <sup>2</sup>Romana Moutelíková, <sup>2</sup>Jana Prodělalová

*1Ústav ekologie a chorob zoonozivních zvířat, zvěře, ryb a včel,  
Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita, Brno  
2Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno*

### Summary

*Lake Sinai virus (LSV) is a honey bee-infecting virus with two officially recognised species: LSV 1 and LSV 2. There is currently a limited number of whole-genome LSV sequences, yet the genetic variability of the virus indicates that there are more than two species in existence. Extracted nucleic acid of 209 honey bee samples were screened by PCR method for presence of LSV, which was found in 36.9% of the samples. LSV-positive samples underwent additional PCR reaction with primers targeting region coding RNA-dependent RNA polymerase of the virus. Subsequently, the PCR products were sequenced and the acquired sequences were used for first round of phylogenetic analysis. Several of the isolates were selected for whole-genome sequencing. Obtained sequences were used for additional phylogenetic analyses. The results indicate the presence of at least three genetically distinct groups of LSV in the Czech Republic. Finally, we obtained two LSV sequences via whole-genome sequencing.*

**Keywords:** *Apis mellifera; Lake Sinai Virus; honey bee virus; phylogenetics; phylogenetic analysis; molecular biology*

### Introduction

*Lake Sinai virus (LSV) is a recently discovered monophyletic viral complex containing single-strand positive-sense RNA genome (Runckel et al. 2011). The role of the virus in the pathological process and its epidemiological significance has not been completely clarified yet. Two species are recognized by ICTV: Lake Sinai virus 1 (LSV 1) and Lake Sinai virus 2 (LSV 2) within genus *Sinaivirus*. LSV was recently fully classified within the *Riboviria* realm and placed into newly formed family *Sinhaliviridae* within order *Nodamuvirales* (ICTV, Walker et al. 2020). The viral complex is genetically diverse; *Sinaivirus* can be separated into 4 main phylogenetic clades (Cornman 2019, Šimenc et al. 2020). Although the virus is not considered a major threat to honey bee health, the phylogeny of the virus has been the focus of only a handful of previously published papers. The aim of our study was screening of honey bee samples from the Czech Republic for the presence of *Lake Sinai virus* and additionally, characterisation of the Czech LSV strains.*

### Materials and Methods

We obtained a set of 209 samples of honey bees from Bee Research Institute at Dol. The samples were collected in 2015 and come from experimental apiaries placed in different parts of the Czech Republic, from colonies with varying health conditions. Each sample consisted of a pool of six bees from a single honey bee colony. Sampled bees were frozen in laboratory.

Contents of each sample were homogenised with garnet beads (PowerBead Tubes, 0.7 mm, MO BIO Laboratories, USA) in phosphate-buffered saline (Biosera, France) by vortexing (3500 rpm/2 min). Subsequently, the homogenates were centrifuged (13,000 rpm/1 min) and 100 µl of the supernatant was used in nucleic acid extraction with use of TRI Reagent (Sigma Aldrich, USA). Extracted nucleic acids were stored at -80 °C until further use.

The extracted nucleic acids underwent an initial screening for presence of Lake Sinai Virus. First, reverse transcription with random primers was performed using the ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) according to the standard protocol. Subsequently, the synthesized cDNA was examined for the presence of specific viral sequences by PCR, using previously published primers (Ravoet et al. 2013). Aptamer Hot Start Master Mix (Top-Bio, Prague, Czech Republic) was used for the PCR reaction. Finally, the presence of PCR products was visualised by electrophoresis on 1.5% agarose gel with Midori Green stain (Nippon Genetics Europe, Dueren, Germany), followed by UV light transillumination.

LSV-positive samples were additionally screened by PCR using previously published primers (Ravoet et al. 2015) targeting the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) region of the LSV genome (603 bp long product). The 603 bp long PCR products were sequenced via commercial Sanger sequencing (Eurofins, Germany). The sequences were deposited in the GenBank (OK245389-OK245413) and used to construct a dendrogram in the MEGA X software, with additional LSV sequences available in the database. The dendrograms were constructed using the neighbour-joining clustering method, Tamura 3-parameter model (calculation of the evolutionary distances) and bootstrap test of 1,000 replicates (determination of reliability of the dendrogram). Several genetically distinct samples of sufficient RNA quantity were chosen for the whole-genome sequencing on NovaSeq 6000 platform by Illumina. The library preparation, sequencing and nucleotide sequence mapping to reference sequences were performed by a commercial provider (SeqMe, Dobříš, Czech Republic). The sequences for LSV strains were assembled into contigs using the graphical viewer Tablet. The sequences obtained by whole-genome sequencing were analysed in Mega X. Sequences obtained via whole-genome sequencing were uploaded to the database (MZ773494-5).

## Results and Discussion

According to the initial screening, LSV was present in detectable quantities in 73 (36.9%) of the samples. In additional screening, we successfully obtained partial (603 bp) LSV RdRp sequence of 26 samples. The obtained sequences were used to construct a dendrogram. Majority of our RdRp sequences (19, 73.1%) formed a cluster genetically close to the lineage of LSV 2 (HQ888865) reference sequence. However, the cluster formed an independent branch along with South African LSV strain SA1 (NC\_035111). Aside from this major cluster, our sequences formed two additional smaller clusters. Both of these clusters were genetically closer to LSV 1 (HQ871931) than to LSV 2. One group of our LSV sequences clustered with Swedish sequences (MH267699-700), belonging to unofficial strain LSV 3 and unclassified strains from Slovenia (MG918125) and Papua New Guinea (MT482469). The second group formed a cluster with unclassified strain of Israel origin (MW397636).

We were able to obtain only two LSV sequences of sufficient quality via whole-genome sequencing; three whole genes of strain 88/15 and four whole genes (whole genome) of strain 587/15. Our two isolates are very similar to each other, being identical in 96.08% of their nucleotide sequence and 97.16% of their translated amino acid sequence. Both strains belong to distinct clade which shares a common ancestor with LSV 2. Furthermore, the Czech strains are relatively genetically distinct from the reference strain of the LSV 2 species with which they share only 74.09% (88/15) and 74.51% (587/15) of the nucleotide sequence; 76.98% (88/15) and 76.79% (587/15) of amino acid sequence. The previously described strains belonging to the same LSV species displayed >95% nucleotide homology and >97% amino acid homology to the consensus of each species (Grabersteiner et al. 2001). Our strains hold



similarity to one another which is sufficient for them to be considered the same species but are not sufficiently homologous with LSV 2 to be categorised as LSV 2. Compared with the complete sequences available in the database, strain SA1 appears to be genetically closest to the obtained Czech strains, with amino acid homology of over 96% (96.57% for 88/15; 96.81% for 587/15) and a nucleotide homology of roughly 93% (92.98% for 88/15; 93.74% for 587/15). This is surprising given the geographical origin of the SA1 isolate (South Africa).

### Conclusion

We identified three genetically distinct clusters of LSV virus present in the Czech Republic. We successfully obtained two sequences of LSV (3 whole genes, 4 whole genes) via whole-genome sequencing. Our sequences are first Czech LSV strains in the database to date. Our findings may provide a valuable addition to the LSV sequences in the database, given that the number of whole-genome sequences of the virus is very limited.

### Acknowledgements

This study was supported by project QK1910286 from Ministry of Agriculture of the Czech Republic. We would like to thank Bee Research Institute at Dol for the provision of the samples.

### Literature

- CORNMAN, R. S. Relative abundance and molecular evolution of *Lake Sinai virus* (*Sinaivirus*) clades. *Peer J*. 2019, vol. 7, e6305.
- GRABENSTEINER, E.; RITTER, W.; CARTER, M.J.; DAVISON, S.; PECHHACKER, H. ET AL. Sacbrook virus of the honeybee (*Apis mellifera*): rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001, vol. 8, no. 1, p. 193-104.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV) Available online: <<https://ictv.global/taxonomy/>> [15 May 2022]
- RAVOET, J.; MAHARRAMOV, J.; MEEUS, I.; DE SMET, L.; WENSELEERS, T. ET AL. Comprehensive Bee Pathogen Screening in Belgium Reveals *Crithidia mellificae* as a New Contributory Factor to Winter Mortality. *PLoS One*. 2013, vol. 8, no. 8, e72443.
- RAVOET, J.; DE SMET, L.; WENSELEERS, T.; DE GRAAF, D. C. Genome sequence heterogeneity of Lake Sinai virus found in honey bees and Orf1/RdRP-based polymorphisms in a single host. *Virus Res*. 2015, vol. 201, p. 67-72.
- RUNCKEL, C.; FLENNIKEN, M.L.; ENGEL, J.C.; RUBY, J.C.; GANEM, D.; ET AL. Temporal Analysis of the Honey Bee Microbiome Reveals Four Novel Viruses and Seasonal Prevalence of Known Viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS One*. 2011, vol. 6, no. 6, e20656.
- ŠIMENC, L.; KULHAR, U.; JAMNIKAR-CIGLENEČKI, U.; TOPLAK, I. First Complete Genome of *Lake Sinai Virus* Lineage 3 and Genetic Diversity of *Lake Sinai Virus* Strains from Honey Bees and Bumble Bees. *J. Econ. Entomol*. 2020, vol. 20, no. 20, p. 1-7.
- WALKER, P.J.; SIDDELL, S.G.; LEFKOWITZ, E.J.; MUSHEGIAN, A.R.; ADRIAENSSENS, E.M. ET AL. [Changes to virus taxonomy and the Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses](#). *Arch Virol*. 2020, vol. 165, no. 11, p. 2737-2748.

**Contact address:** Eliška Čukanová, Mgr., Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H19350@vfu.cz

## Insight in a behaviour of Central European Red Kites wintering in Italy

<sup>1</sup>Marek Dostál, <sup>1</sup>Jan Škrábal, <sup>2</sup>Rainer Raab, <sup>3</sup>Matteo Caldarella, <sup>1</sup>Ivan Literák

<sup>1</sup>Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno

<sup>2</sup>Technisches Büro für Biologie Mag. Dr. Rainer Raab

<sup>3</sup>Centro Studi Naturalistici Onlus

### Summary

Migration and over-wintering strategy of raptors can be influenced by many factors such as sex, age and experience of birds, habitat variability and food availability. Based on the telemetry data of nine Red Kites (*Milvus milvus*), we observed *in situ* their wintering grounds in southern Italy during winter 2019/2020. Red Kites originated from Austria and the Czech Republic arrived to their wintering grounds from 10<sup>th</sup> August to 5<sup>th</sup> December 2019 and departed between 9<sup>th</sup> February and 7<sup>th</sup> May 2020. Tagged Kites stayed in their wintering grounds from 73 to 207 days (mean 135±46 SD). These birds occupied home range and the core area from 39.3 to 9 351 km<sup>2</sup> (KDE 95%; mean 3 591±3460 SD) and 6 to 1 998 km<sup>2</sup> (KDE 50%; mean 566±483 SD), respectively. We observed a total of 242 Red Kites at nine communal roost sites (min. = 14, max. = 45 individuals) used by tagged Red Kites. Roosts were situated at an average altitude of 630 m above sea level. Agricultural countryside with small or large fields, small or large forest patches, meadows, pastures, sheep or cattle farms surrounded areas around communal roosts of Red Kites.

**Keywords:** *Milvus milvus*, raptors, telemetry, behaviour, Austria, Czech Republic

### Introduction

The Red Kite (*Milvus milvus*) is a medium-sized raptor native to the European continent. Recent estimates indicate a global population of between 60,000 and 70,000 mature individuals and approximately 35,000 breeding pairs (BirdLife International 2020). Red Kites from Central European countries including Austria and the Czech Republic disperse to winter in Southern Europe in a broad belt from Iberian and Italian peninsulas to the Balkans, but a part of the population stay to winter in their natal area (Literák et al. 2022).

Until the end of 20<sup>th</sup> century, Red Kite was once a common species widespread from north-western Italy, down the Tyrrhenian side of the peninsula, to southern Italy, Sicily and Sardinia (Brichetti & Fracasso 2003). At present, the Italian distribution of Red Kites is highly fragmented, with a total of estimated 426-519 breeding pairs, essentially concentrated in central and southern Italy (Cillo & Laterza 2014). The causes of population decline could be habitat degradation and illegal killing through persecution and poisoning (Carter 2001). Successful reintroductions in northern Italy have increased populations in Tuscany and Marche (Ferlini 2019). Beside breeding population, Italy offers wintering grounds for Red Kite from Central Europe during the winter (Literák et al. 2022). The last census of wintering Red Kites carried out in 2021 showed the presence of 1 782-1 902 wintering individuals in Italy (Guido Ceccolini, unpublished data).

Although, there is a recent work regarding to wintering of Red Kites from Central Europe in Western and South-Western Europe, including Italy (Panter et al. 2022), the behaviour of Red Kites in communal roosts during winter period in Italy remained unsolved. Here in this work, we aimed to a strategy of Red Kites from Central Europe wintering in Italy by using data from Kites originating from Austria and the Czech Republic tagged with GPS/GSM transmitters supplemented with observations *in situ*.

## Material and Methods

We equipped nine Red Kites originated from Austria and the Czech Republic with GPS/GSM (Global Position System/Global System for Mobile Communication) telemetry devices as described previously (Literák et al. 2022). The coordinates of bird positions at their winter grounds were analysed using a geographic information system (GIS) and the software ArcGIS 10.1. We performed Spearman correlation test for non-parametric data using software Unistat to assess the relation between age and home range size. Spatiotemporal activities of these nine tagged Kites were monitored in details throughout the winter period of 2019/2020. Based on the telemetry data, we conducted the field observations from 3<sup>rd</sup> February to 11<sup>th</sup> February 2020 at nine communal night roosts of Red Kites in the central and southern part of Italy. In this study we employed Kernel Density Estimate (KDE) 95 % and 50 % to determine the size of the home range and the core area of wintering Red Kites, respectively.

## Results

Nine Red Kites originated from Austria and the Czech Republic arrived to their wintering grounds from 10<sup>th</sup> August to 5<sup>th</sup> December 2019 and departed between 9<sup>th</sup> February and 7<sup>th</sup> May 2020. Birds winter on average for  $135 \pm 46$  days. The size of the home range was ranging from 39 to 9 351 km<sup>2</sup> ( $\bar{x} = 3591 \pm 3460$  km<sup>2</sup>) estimated as KDE 95 %. Core area was ranging from 6 to 1 998 km<sup>2</sup> ( $\bar{x} = 566 \pm 483$  km<sup>2</sup>) estimated as KDE 50 %. Older birds tagged in 2015, 2016 and 2017 showed tendency to use noticeably smaller areas ( $1\,388 \pm 928$  km<sup>2</sup> as KDE 95%) for wintering than younger birds tagged in 2018 and 2019 ( $5\,027 \pm 3050$  km<sup>2</sup> as KDE 95%). Furthermore, we found a negative correlation between age and home range size ( $r = -0.8$ ,  $p < 0.05$ ). Wintering birds occupied winter grounds in average elevation of 661 m above sea level (asl).

We counted total of 242 Red Kites at all communal night roosts (min. 14, max. 45 in individual roosts) which were situated at an average altitude of 630 m asl (min. 390 m, max. 940 m). An agricultural countryside with small or large fields and farms was typical for all study areas. In the area of Campomaggiore, Maschito and Masseria Manta, Red Kites used the edge of a large forest as a roosting site. However, small forest patches were used as roosting sites close to Balvano, Barisci, Buccino, Coletorto, Imef-Pantano and Salcito.

## Discussion

Based on the telemetry data, we suggest that Central European Red Kites arrived to their winter grounds in Italy mostly during October. Moreover, major part of elderly Kites arrived later and departed earlier, probably due to their previous and upcoming breeding season, respectively. These findings fit well in characteristics of migration and over-wintering strategy of Red Kites from Central Europe at their wintering grounds in the Iberian Peninsula, France, Italy and South-eastern Europe (Literák et al. 2019; García-Macía et al. 2022b; Literák et al. 2022).

Our results show that in migrating Red Kites, juveniles used larger area than adults at their wintering grounds. The same was reported recently in similar studies (Panter et al. 2022; García-Macía et al. 2022a). This variability could be influenced by many factors such as habitat variability, food availability, interspecific and intraspecific competition, birds' age and/or experience, and methods used to estimate the home range size (Panter et al. 2022).

Previously, communal roosts of Red Kites were described in lowlands in South-eastern Europe with the altitude from 4 to 150 m asl (Literák et al. 2019). And although, Red Kites are usually associated with medium-low elevations being most common between 400 and 600

m asl (Seoane et al. 2003), birds in this study used communal roost sites at an average altitude of 630 m asl which corresponded with an inhabited areas of over-wintering grounds with an average altitude of 661 m asl. This condition could be a key factor which influences the space use of Red Kites in southern Italy and point to the high environmental plasticity of Red Kites (see also Panter et al. 2022).

We observed an agricultural countryside with small or large fields, small or large forest patches, meadows, pastures, sheep or cattle farms which surrounded areas close to communal roosts of Red Kites. Thus, a very similar habitat of the wintering areas which was described in Central and South-eastern Europe (Literák et al. 2019).

### Conclusion

We assume that there is a variability among spatiotemporal activities of Red Kites at their wintering grounds across the Europe. Density of Red Kite population, social interactions in communal roosts, habitat characteristics and food availability may have a key role for the wintering ground selection in Italy and elsewhere.

### Acknowledgements

We thank to Guido Ceccolini, Andrea Minganti, Connor Panter and Matteo Visceglia, who helped us with the field research in Italy throughout winter period 2019/2020.

### References

- BIRDLIFE INTERNATIONAL. *Milvus milvus*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2020. 2020.
- BRICHETTI P.; FRACASSO C. *Ornitologia Italiana – Vol. 1*. Perdisia Editore, 2003.
- CARTER I. *The Red Kite*. Chelmsford, UK: Arlequin Press, 2001.
- CILLO N.; LATERZA M. *Il nibbio reale in Italia*. Santa Fiora, Grosseto, 2014.
- FERLINI F. *The Birds of Italy 1. Anatidae – Alcidae*. *Rivista Italiana di Ornitologia*. 2019, vol. 88, p. 59–60.
- GARCÍA-MACÍA J.; DE LA PUENTE J.; BARMEJO-BARMEJO A.; RAAB R.; URIOS V. High variability and dual strategy in the wintering Red Kites (*Milvus milvus*). *Diversity*. 2022a, vol. 14, p. 117.
- GARCÍA-MACÍA J.; VIDAL-MATEO J.; DE LA PUENTE J.; BARMEJO A.; RAAB R.; URIOS V. Seasonal differences in migration strategies of Red Kites (*Milvus milvus*) wintering in Spain. *Journal of Ornithology*. 2022b, vol. 163, p. 27–36.
- LITERÁK I.; HORAL D.; RAAB R.; MATUŠÍK H.; VYHNAL S.; RYMEŠOVÁ D.; SPAKOVŠZKY O.; SKARTSI T.; POIRAZIDIS K.; ZAKKAK S.; TOMIK A.; SKYRPAN M. Sympatric wintering of Red Kites and Black Kites in South-East Europe. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*. 2019, vol. 65, p. 381–398.
- LITERÁK I.; RAAB R.; ŠKRÁBAL J.; VYHNAL S.; DOSTÁL M.; MATUŠÍK H.; MAKOŇ K.; MADERIČ B.; SPAKOVŠZKY P. Dispersal and philopatry in Central European Red Kites *Milvus milvus*. *Journal of Ornithology*. 2022, vol. 163, p. 469–479.
- PANTER C.T.; LITERÁK I.; RAAB R.; TOLHURST B.A.; WHITE R.L. Age, landscape, and arrival date explain ranging behaviour of wintering Red Kites in southwest Europe. *Journal of Wildlife Management*. 2022, vol. 86.
- SEOANE J.; VIÑUELA R.; DÍAZ-DELGADO R.; BUSTAMANTE J. The effects of land use and climate on red kite distribution in the Iberian Peninsula. *Biological Conservation*. 2003, vol. 111, p. 401–414.

**Contact address:** Dostál Marek, Mgr., Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, dostalm@vfu.cz

## History, dispersal and habitat selection in Central European Caspian gulls *Larus cachinnans*

<sup>1</sup>Šimon Krejčí, <sup>2</sup>Josef Chytil, <sup>1</sup>Lenka Rozsypalová, <sup>1,3</sup>Ivan Literák

<sup>1</sup>Department of biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Palackého tř. 1, 61242 Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>Ornithological Station, Comenius Museum in Přerov, Bezručova 10, 75002 Přerov, Czech Republic

<sup>3</sup>CEITEC VFU Brno, University of Veterinary Sciences Brno, Palackého tř. 1, 61242 Brno, Czech Republic

### Summary

The Caspian gull (*Larus cachinnans*) has recently spread from Ukraine to Poland, Germany and other European countries. In the Czech Republic, the first breeding birds were recorded in 1990 at the Nové Mlýny Reservoir (NMR), since when the number of breeding pairs has increased to 248 in 2020. As there is little available information on the dispersal and spread of gulls originating from Central Europe, pulli Caspian gulls hatched at the NMR were tagged with telemetry loggers. By combining recovery of the ringed birds and telemetry data, we found that gulls from NMR dispersed in all directions, with the main destinations being within the Czech Republic, Poland, Germany, the Netherlands, Belgium and Hungary. Telemetry recordings indicated waterbodies as the most selected environment, followed by landfill sites, mineral extraction sites, industrial or commercial units and arable or other agricultural land.

**Keywords:** *Larus cachinnans*; Natal dispersal; Habitat preference; Philopatry

### Introduction

The Caspian gull (*Larus cachinnans*) has recently spread from the Black, Caspian and Azov Seas and Lakes Balkash and Saisan to the Moscow region, Poland, Germany and elsewhere in Europe (Malling Olsen and Larson 2004; Vavřík et al. 2005). There is a strong support, that the Central European Caspian gull population has an eastern origin from their core nesting areas on the Black and Azov Seas and from inland regions of Ukraine reservoirs (Boere 2006; Dubinina 2015). In the Czech Republic was first breeding recorded in 1990 at the Nové Mlýny Reservoir (NMR), in the south-eastern part of the Republic. Since then, the breeding numbers increased gradually, according to the national census of breeding birds (Vavřík et al. 2005). By January 2020 were in the Czech Republic recorded 4 402 Caspian gulls (Musilová et al. 2021).

There is little information on natal and breeding dispersal, natal and breeding philopatry and the spread of established breeding Caspian gull populations in Central Europe. Of the known studies, one recorded ringed in eastern Germany (Bairlein et al. 2014), and the other reported a Caspian gull ringed as a pullus in a Polish colony (Leclerc 2016). There is also little information on habitat preferences of Caspian gulls dispersing from Central European populations. It is believed, that the key factors responsible for further successful colonisation are the availability of fish from aquacultural ponds and access to refuse at landfill sites during winter (Skórka and Wójcik 2008, Lenda et al. 2010). In effort to address the lack of data on dispersal and habitat selection, an in-depth investigation of ringed and GPS (global positioning system) tagged Caspian gulls hatched at the NMR was undertaken.

### Material and Methods

Study took place on the 3,200 ha NMR system situated on the Dyje River in south Moravia, Czech Republic. The Caspian gull breeding colony is located on a small flat islet in the middle reservoir (48.8930 N, 16.6057 E). By 2020, a total of 685 Caspian gull pulli had been ringed with metal and plastic rings at the NMR and, of these, 345 (50.4 %) have been re-

observed. A total of 1,809 observations of ringed Caspian gulls have been registered at the NMR. Ten pulli gulls were fitted with 20 g Ornitela telemetry loggers equipped with solar panels, functioning in both GPS and GSM (global system for mobile communication) mode. The position coordinates were analysed using the ArcGIS 10.1 software package and the free extension ArcMET Software for ArcGIS 10.1. Initially, ten pulli caught at the NMR breeding colony were equipped with telemetry loggers (five in 2018 and five in 2019). Six of the telemetry birds (three from 2018 and three from 2019) died within 45 days of release, and these were then excluded from the study. Natal dispersal was defined as all dispersal by an individual prior to its first breeding, while breeding dispersal was defined as all dispersal after the first breeding up until the fourth calendar year. Dispersal behaviour of ringed birds and telemetry tracked birds were analysed separately. Dispersal direction was defined by dividing the space around the colony on NMR into four quarters. Individual movement patterns were based on gull movement trajectories. Estimated natal philopatry was determined as a variable straight-line distance between the birth site and the position coordinates of three-year-or-older ringed gulls during May and/or June. For habitat selection we used GPS positions for the four telemetry tracked Caspian gulls (R1-R4). The data were processed using ArcMap 10.1 ArcGIS software (ESRI, USA), using a CORINE Land Cover raster map. To determine overall habitat selection, we used the “compana” function for compositional analysis in the AdehabitatHS package in R v.3.6.1.

## Results

Natal dispersal in telemetry-fixed gulls was highly variable, most positions from R1, R2 and R3 being in a lowland area of south Poland and most positions from R4 being in a lowland area of Hungary. Farthest dispersal distances in R1, R2, R3 and R4 were 252, 436, 602 and 513 km, respectively. The most recoveries of ringed gulls were lowland areas of the Czech Republic, western Poland, Germany, the Netherlands and Belgium. We processed 40 recoveries of three-year-or-older gulls ringed in the NMR and checked in May/June. Average gull distance was 91 km (range 0–445 km, SD  $\pm 128$ ) from the breeding colony, with an average azimuth of  $176^\circ$ . All positions obtained were north-east, north, north-west or west of the natal breeding colony. Repeated recoveries from later breeding periods were obtained for five birds, with an average distance of 0.66 km (range 0–1.86 km, SD  $\pm 0.63$ ) from their previous estimated breeding site, and average azimuth of  $116^\circ$ .

Waterbodies were the dominant habitat selected by Caspian gulls with telemetry loggers, with landfill sites the next most common habitat, followed by mineral extraction sites, industrial or commercial units and arable land. For one Caspian gull (R1), 580 positions (8 %) were on building roofs close to the riverine port in Vienna, Austria.

## Discussion

Ukrainian birds appear to disperse in a mainly north-westerly direction (Neubauer et al. 2007). Our data from both recoveries of ringed birds and GPS telemetry suggests that intensity of dispersal tended to be highest in directions from northeast to northwest. Moreover, our data indicated that estimated natal philopatry also fitted well with this concept.

Caspian gulls in inland Central European habitats have shown good reproductive performances, particularly in colonies near fishponds (Skórka et al. 2005). It would also appear that the availability of landfill sites provides an important alternative food source in the form of household refuse. Our tracking confirmed that Caspian gulls frequently foraged on reservoirs (presumably on fish), on local landfill sites (household refuse) and on nearby arable land (vertebrates/ invertebrates). Central European Caspian gull populations have also

grown rapidly, to the point where they are now considered invasive in some areas, i.e. they are having a negative impact on native bird species (Skórka et al. 2005).

### Conclusion

As individual dispersal patterns were highly variable, our data suggest highest dispersal directions from northeast to northwest. Extensive aquacultural fish ponds, open landfill sites or large areas of managed arable land represent important food sources and are likely to be key factors enabling the spread of Caspian gulls.

### Acknowledgements

We thank František Zicha, Anna Koukolíková, Radek Lučan, Jaroslav Cepák, Jaroslav Sedláček, Vlasta Škorpíková, Thomas Zuna-Kratky, David Horal, Gašpar Čamlík and Petr Macháček for help with providing the necessary data and other support. This study was supported by a grant under project 2021ITA31 from the University of veterinary Sciences, Brno.

### References

- BAIRLEIN F., DIERSCHKE J., DIERSCHKE V., SALEWSKI V., GEITER O., HÜPPOP K., KÖPPEN U., FIEDLER W. Atlas der Vogelzugs, Ringfunde deutscher Brut- und Gastvögel. AULA-Verlag, Wiebelsheim, 2014.
- BOERE. G. C., GALBRAITH, C. A. & STROUD, D. A. Waterbirds around the world. TSO Scotland Ltd, Edinburgh, UK 2006.
- DUBININA Y. Y. The seasonal placement of the Caspian Gull *Larus cachinnans* from the northern-western coast of the Azov Sea based on ringing results. *Avocetta*. 2015 vol. 39, p. 59–66.
- LECLERC F. Les Laridés à Caen: apport de la lecture des bagues colorées. *Cormoran*. 2016 vol. 20 p. 181–184.
- LENDI M., ZAGALSKA-NEUBAUER M., NEUBAUER G., SKÓRKA P. Do invasive species undergo metapopulation dynamics? A case study of the invasive Caspian gull, *Larus cachinnans*, in Poland. *J Biogeogr*. 2010 vol. 37 p. 1824–1834.
- MALLING OLSEN K., LARSSON H. Gulls of Europe, Asia and North America, Helm Identification Guides. A & C Black, London, 2004.
- VAVŘÍK M., HUDEC K., MÁLKOVÁ P. (2005) Fauna ČR, Ptáci – Aves II/2 (second revised edition). Academia Praha, Czech Republic, 2005.
- MUSILOVÁ Z., MUSIL P., NEUŽILOVÁ Š., GAJDOŠOVÁ D., ŠENKÝŘOVÁ A. Mezinárodní sčítání vodních ptáků v Česku v lednu 2020 [The International Waterbirds Census in Czechia in January 2020]. *Aythya*. 2021, vol. 7 p. 1–15.
- Neubauer G., Zagalska-Neubauer M., Betleja J. The origin of ‘Caspian gulls’ breeding in Poland. *Br Birds*. 2007, vol. 100 p. 552–557.
- SKÓRKA P., WÓJCIK J.D. Habitat utilisation, feeding tactics and age-related feeding efficiency in the Caspian gull *Larus cachinnans*. *J Ornithol*. 2008 vol. 149 p. 31–39.
- SKÓRKA P., WÓJCIK J.D., MARTYKA R. Colonization and population growth of Yellow-legged Gull *Larus cachinnans* in southeastern Poland: causes and influence on native species. *Ibis*. 2005, vol. 147 p. 471–482.

**Contact address:** Krejčí Šimon, Mgr., Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE VETUNI, Palackého tř.1946/1, 612 42 Brno, krejcis@vfu.cz

## Detekce trypanosom v krevních vzorcích drobných hlodavců

### Trypanosoma detection in blood samples of small rodents

<sup>1</sup>Kalocsányiová Vendula, <sup>1</sup>Veitová Lucie, <sup>1</sup>Balážová Alena, <sup>1</sup>Baláž Vojtěch, <sup>1</sup>Linhart Petr, <sup>1</sup>Band'ouchová Hana

<sup>1</sup>Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita, Brno

#### Summary

Rodents are an important reservoir for many pathogenic agents. The aim of our study was to monitor the presence of the genus *Trypanosoma*, the blood parasite, in various rodent species living in Czech Republic. Trypanosomes are worldwide distributed blood parasites infecting a broad spectrum of host species, including humans. In our study we examined 144 blood samples from several rodent species and shrews using nested PCR protocol with a positive finding in 7 samples. Positive samples were purified from electrophoretic gel and sent for sequence analysis. The prevalence of trypanosomes found in our study was 4.86 %. As a next step in our research, we plan to expand our analysis on haematological and biochemistry profile of naturally infected individuals and assess the effect of trypanosomes on health of small rodents.

**Keywords:** *Trypanosoma* spp.; small rodents, nested PCR, *Apodemus* sp., Czech Republic

#### Úvod

Trypanosomy (*Kinetoplastea*) jsou celosvětově rozšířenými krevními parazity mnoha rozličných živočišných druhů. Savčí trypanosomy dělíme podle jejich vývoje ve vektoru do dvou skupin: salivaria a stercoraria. Zatímco jedinci patřící do skupiny salivaria jsou často patogenní pro své hostitele, skupina stercoraria, kam náleží podrod *Herpetosoma*, bývá většinou pro svého hostitele nepatogenní (Hoare, 1972).

Hlodavčí trypanosomy jsou vysoce hostitelsky specifické, jsou si morfologicky podobné a pro jejich přesné rozlišení je nutná molekulární diagnostika. Podrod *Herpetosoma* zahrnuje hlodavčí trypanosomy a jejich vektorem jsou různé bleší druhy. Hlavním zástupcem je zde *T. lewisi* a mnoho potencionálně nových druhů je pojmenováno jako *T. lewisi*-like a je nutná jejich molekulární verifikace (Noyes et al., 2002).

#### Materiál a metody

Pro naši studii bylo použito 144 vzorků krve drobných hlodavců a rejsků, konkrétně myšice temnopásé (*Apodemus agrarius*, n=14), myšice lesní/křovinné/malooké (*Apodemus flavicollis/silvaticus/uralensis*., n=93), norníka rudého (*Myodes glareolus*, n=34) a rejska obecného (*Sorex araneus*, n=3). Zvířata byla odchycena v období 4. – 7. 11. 2021 v katastru obce Salaš ve Zlínském kraji. Vzorky krve byly získány ze srdce post mortem. Izolace DNA ze vzorků byla provedena pomocí komerčního kitu High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Švýcarsko), podle návodu výrobce. PCR detekce patogena proběhla pomocí protokolu popsaného v publikaci Seward et al. (2017) metodou nested PCR. PCR amplifikace proběhla na přístroji Mini Opticon (Bio-Rad, USA), reakční směs o objemu 20 µl tvořilo 10 µl EmeraldAmp Max PCR Master Mix (Takara, Japonsko), 4 µl vody, 2 x 0.5 µl primerů (10 pmol/µl) a 5 µl analytu. Reakce proběhla ve dvou kolech, v prvním byla jako analyt použita DNA vyizolovaná ze vzorku, ve druhém kole pak analytem bylo 5 µl směsi z prvního kola. Výsledný produkt PCR byl vizualizován pomocí gelové elektroforézy za použití negativní a pozitivní kontroly. Pozitivní bendy byly vypurifikovány z gelu pomocí komerčního kitu High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Švýcarsko) a byly zaslány na osekvenování.



## Výsledky

Z celkového množství 144 vyšetřovaných vzorků bylo zaznamenáno 7 pozitivních vzorků. Sekvenací a následnou analýzou sekvencí pomocí online nástroje BLAST (NCBI) byla u šesti adultních jedinců myšice *Apodemus flavicollis/silvaticus/uralensis* potvrzena *Trypanosoma grosi* a u jednoho jedince norníka rudého (*Myodes glareolus*) byla nalezena trypanosomě příbuzná *Parabodo caudatus*.

## Diskuse

*Trypanosoma grosi* byla dříve řazena do skupiny trypanosom podobných *T. lewisi*, a to do podskupiny, do které náležely trypanosomy čeledi *Muridae* a *Cricetidae*. Nyní se *T. grosi* řadí do kladu trypanosom s blíže nespécifikovaným podrodem (Schoch et al., 2020). V Evropě byla tato trypanosoma zaznamenána na území Francie, Německa, Maďarska, Irska, Velké Británie, Ruska, Polska a Slovenska (Magri et al. 2021). Magri et al. (2021) ve své studii uvádí její nález na území Česka, ale jedná se zde o mylnou interpretaci studie, kterou prováděli Karbowski et al. (2009) na Slovensku. V České republice se jedná o její první záchyt.

Tato trypanosoma vykazuje hostitelskou specifitu k rodu *Apodemus*, což se prokázalo i v naší studii. Prevalence *T. grosi* byla v naší studii 4,86 %, což je o poznání nižší oproti studii ze sousedního Slovenska, kde byla prevalence 12,7 % (Karbowski et al., 2009). Tento rozdíl je pravděpodobně dán sezonním charakterem onemocnění, kdy se popisuje záchyt trypanosom v období od června do listopadu (Karbowski et al., 2009).

*Parabodo caudatus* je v současnosti považován za neparazitický druh bičíkatých organismů. Nicméně tento organismus je prozatím nedostatečně prostudován a některé studie naznačují možný parazitický potenciál (Winterhoff et al., 2020). Pro bližší určení vztahu rodu *Parabodo* a rodu *Myodes* je nutné provedení cílenější studie.

## Závěr

V naší studii jsme poprvé prokázali přítomnost *Trypanosoma grosi* na území České republiky s prevalencí 4,86 % u volně žijící populace myšic rodu *Apodemus*. Pravděpodobně se jedná o autochtonního parazita s nízkou patogenitou pro svého hostitele, nicméně tuto hypotézu je nutné dále potvrdit. Nález *Parabodo caudatus* u norníka rudého (*Myodes glareolus*) je potřeba dále prověřit a vyhodnotit.

## Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem ITA VETUNI (č. 2021ITA21).

## Literatura

HOARE, C. A. (1972). The trypanosomes of mammals. A zoological monograph., Blackwell Scientific Publications, 5 Alfred Street, Oxford, p. 749.

KARBOWIAK, G., STANKO, M., FRIČOVÁ, J., WITA, I., WERSZKO, J., PETKO, B. Blood parasites of the striped field mouse *Apodemus agrarius* and their morphological characteristics. *Biologia*, 2009, vol. 64, p. 1219-1224.

MAGRI, A., GALUPPI, R., FIORAVANTI, M. Autochthonous *Trypanosoma* spp. in European Mammals: A Brief Journey amongst the Neglected Trypanosomes., *Pathogens*, 2021, vol. 10, no. (3), p. 334.

NOYES, H. A., AMBROSE, P., BARKER, F., BEGON, M., BENNET, M., BOWN, K. J., KEMP, S. J. Host specificity of *Trypanosoma (Herpetosoma)* species: Evidence that bank voles (*Clethrionomys*

*glareolus*) carry only one *T. (H.) evotomys* 18S rRNA genotype but wood mice (*Apodemus sylvaticus*) carry at least two polyphyletic parasites., *Parasitology*, 2002, vol. 124, p. 185–190.

SCHOCH, C.L.; CIUFO, S.; DOMRACHEV, M.; HOTTON, C.L.; KANNAN, S.; KHOVANSKAYA, R.; LEIPE, D.; MCVEIGH, R.; O'NEILL, K.; ROBBERTSE, B.; et al., NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. Database 2020, baaa062

SEWARD, E. A., VOTÝPKA, J., KMENT, P., LUKEŠ, J., KELLY, S. Description of *Phytomonas oxycareni* n. sp. from the salivary glands of *Oxycarenum lavaterae*. *Protist*. 2017, vol. 168, p. 71-79.

WINTERHOFF, M. L., ACHMADI, A. S., RPYCROFT, E. J., HANDIKA, H., JAYA, P., RIZALDI, T., et al. Native and Introduced Trypanosome Parasites in Endemic and Introduced Murine Rodents of Sulawesi, *Journal of Parasitology*, 2020, vol. 106, p. 523-536

**Kontakní adresa:** Vendula Kalocsányiová, MVDr., Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, [H20323@vfu.cz](mailto:H20323@vfu.cz)

## Prevalencia endoparazitov tráviaceho traktu psovitých šeliem na území Slovenskej a Českej republiky

### Prevalence of endoparasites of the digestive tract of canine carnivores in the territory of Slovak and Czech Republics

<sup>1</sup>Adam Šimon, <sup>1</sup>Piaček Vladimír, <sup>1</sup>Bednaříková Šárka, <sup>1</sup>Němcová Monika, <sup>1</sup>Zukalová Kateřina, <sup>1</sup>Píkula Jiří

<sup>1</sup>Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno

#### Summary

Monitoring of individual endoparasitosis is essential to determine the health status of wild canine populations. Some of these parasites are of zoonotic significance and pose a risk to public health. We examined 17 faecal samples from canine animals originating in the territory of Slovakia and the Czech Republic: *Vulpes vulpes* (12), *Canis lupus* (5). Diagnostic methods used: flotation method, commercial kit Kruuse Giardia Quick test (detection of *Giardia duodenalis* antigen). The following were identified in *Canis lupus*: *Taenia* spp. (1), *Trichuris vulpis* (2). Two fecal samples were negative. In the species *Vulpes vulpes* we identified: *Trichuris vulpis* (5), *Taenia* spp. (3), *Toxascaris leonina* (2), *Giardia duodenalis* (1). Four fecal samples were negative.

**Keywords:** carnivores; endoparasitosis; *Taenia* spp.; *Trichuris vulpis*; *Toxascaris leonina*; *Giardia duodenalis*;

#### Úvod

Monitoring jednotlivých endoparazitóz u psovitých šeliem má zásadný význam pre zhodnotenie zdravotného stavu voľne žijúcich populácii a možného rizika prenosu zoonotických parazitóz. U psovitých šeliem sa vyskytuje niekoľko endoparazitov: *Toxocara canis*, *Eimeria vulpis*, *Isoospora vulpis*, *Alaria alata*, *Taenia hydatigena*, *Toxascaris leonina*, *Uncinaria stenocephala*, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Echinococcus multilocularis*, *Dipylidium caninum* (Svobodová a kol. 1994). Jednou z najnebezpečnejších zoonóz, ktoré ohrozujú ľudí, je *Echinococcus multilocularis*. Prevalencia u líšok je 30% (Miterpakova a Dubinsky, 2011)

Stabilná populácia vlka sivého na území Slovenskej republiky sa pohybuje okolo 350 - 400 kusov, na území Českej republiky je okolo 70. Líška hrdzavá sa vyskytuje na 93,5 % územia Slovenska. Hustota populácie sa pohybuje od 0,5 - 3 líšky na km<sup>2</sup>, v závislosti na dostupnosti potravy. Hustota populácie v Českej republike sa pohybuje od 1 - 2,5 líšky na km<sup>2</sup>. Takáto hustota populácie má výrazný vplyv na šírenie parazitóz v populácii líšok.

Pochopenie epizootologie zoonotických parazitických infekcií je dôležité pre minimalizáciu rizík pre ľudí. Preto bolo cieľom tejto štúdie zistiť prevalenciu gastrointestinálnych parazitov u psovitých šeliem na území Slovenskej a Českej republiky.

### Materiál a metódy

V období od januára do decembra roku 2021 boli odobraté vzorky čerstvého trusu od 17 jedincov psovitéých šeliem. 5 vzoriek od vlka sivého (*Canis lupus*) a 12 vzoriek od líšky hrdzavej (*Vulpes vulpes*). Vzorky trusu boli získané u líšok hrdzavých ulovených legálnym spôsobom v priebehu celého kalendárneho roku zo 7 revírov (5 x ČR, 2 x SR). V prípade vlka dravého prebiehal zber vzoriek v súčinnosti s projektom monitoringu veľkých šeliem. Vzorky trusu boli konzervované v skúmavkách s etylénom a uskladnené v chladničke pri 4 °C a boli vyšetrené do 48 hodín od odberu.

Na vyšetrenie a identifikáciu endoparazitóz boli použité nasledovné metódy: komerčná súprava Kruuse Giardia quick test (detekcia antigénu *Giardia duodenalis*). Ďalej boli použité rutinné techniky na identifikáciu lariiev a vajíčok, a to flotačná metóda.

Každá vzorka bola vyšetrená za pomoci optického mikroskopu Levenhuk 720B pri zväčšení X40, X100, X400 a X1000, a to vo forme natívnej vzorky a následne po ofarbení Diff-Quick.

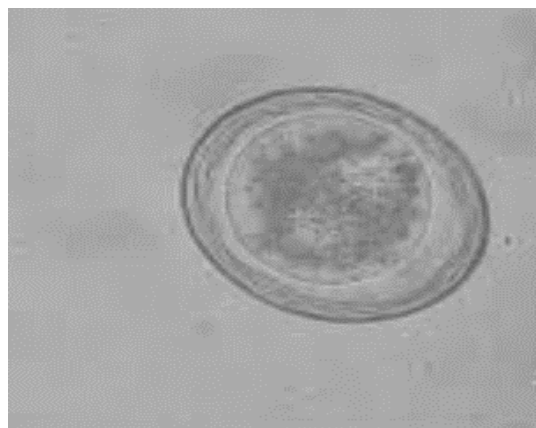
### Výsledky a diskusia

Boli detekované gastrointestinálne parazity z kmeňa *Nematoda* a *Platyhelminthes*. Prevalencia parazitov v našom výskume bola u líšky hrdzavej (66,7 %) a u vlka sivého (60 %). Pri koprologickom vyšetrení u líšky boli nájdené vajička *Trichuris vulpis* (41,7 %), *Taenia* spp. (25 %), *Toxoscaris leonina* (16,7 %) a *Giardia duodenalis* 8,3 %. U vlka bola prevalencia jednotlivých *Trichuris vulpis* (40 %), *Taenia* spp. (20 %).

V roku 2013 bola publikovaná štúdia (Borecka, Gawor a Zieba, 2013), ktorá monitorovala výskyt edoparazitóz u šeliem na území Poľska. Prevalencia endoparazitóz u líšky hrdzavej: *Trichuris vulpis* (27 %), *Taenia* spp. (2,2 %). U vlka sivého boli nájdené *Trichuris vulpis* (13,9 %), *Tenia* spp. (1,4 %).

Tabuľka 1. Prevalencia endoparazitóz gastrointestinálneho traktu u vlka sivého (*Canis lupus*) a líšky hrdzavej (*Vulpes vulpes*) na území Slovenskej a Českej republiky

Druh	Počet vzoriek	<i>Trichuris vulpis</i>	<i>Taenia</i> spp.	<i>Toxoscaris leonina</i>	<i>Giardia duodenalis</i>	Spolu
<i>Vulpes vulpes</i>	12	41,7 %	25 %	16,7 %	8,3 %	66,7 %
<i>Canis lupus</i>	5	40 %	20 %	-	-	60 %



**Obr. 1.** Vajíčko *Trichuris vulpis* u lišky hrdzavej.

**Obr. 2.** Vajíčko *Toxoscaris leonina* u lišky hrdzavej.

### Záver

Detekované parazity *T.vulpis*, *T.leonina*, *Taenia* spp. bežne kolujú v populáciách líšok hrdzavých a vlkov sivých. *E. multilocularis* sa nevyskytoval ani v jednej vzorke. Výsledky potvrdzujú, že gastrointestinálne endoparazitózy sa bežne vyskytujú v populáciách psovitých šeliem. Riziko pre človeka je pri nájdených parazitózach nízke, treba však pravidelne monitorovať výskyt a oblasť výskytu jednotlivých parazitóz s ohľadom na zoonotické riziko.

### Literatúra

MECH, D.; BOITANI, L. [Wolves: Behaviour, Ecology and Conservation. University of Chicago Press, 2010, s.323–324. ISBN 9780226516981.](#)

HALÁN, M.; et al. Atlas parazitov. Univerzita veterinárneho lekárstva a farmácie v Košiciach. 2022, ISBN 9788080776862.

MITERPAKOVA, M.; DUBINSKY, P. Fox tapeworm (*Echinococcus multilocularis*) in Slovakia — summarizing the long-term monitoring. [Helminthologia](#). 2011, s. 155-162.

ČABANOVÁ, V.; GUIMARAES, N.; HURNÍKOVÁ, Z.; CHOVANCOVÁ, G.; URBAN, P.; MITERPÁKOVÁ, M. Endoparasites of the grey wolf (*Canis lupus*) in protected areas of Slovakia. *Ann Parasitol*. 2017

CRIADO-FORNELIO, A.; GUTIERREZ-GARCIA, L.; RODRIGUEZ-CAABEIRO, F.; REUS-GARCIA, E.; et al. A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara. *Veterinary Parasitology*. 2000, vol 92(4), s. 245-251.

BORECKA, A.; GAWOR, J.; ZIEBA, F. A survey of intestinal helminths in wild carnivores from the Tatra National Park, southern Poland. *Annals of Parasitology*. 2013, s.169-172.

MITERPÁKOVÁ, M.; HURNÍKOVÁ, Z.; ANTOLOVÁ, D.; DUBINSKÝ, P. Endoparasites of red fox (*Vulpes vulpes*) in the Slovak Republic with the emphasis on zoonotic species *Echinococcus multilocularis* and *Trichinella* spp. *Helminthologia*. 2009, vol 46, s.73-79.

POPIOŁEK M., SZCZĘSNA J., NOWAK S., MYŚLAJEK R.W. Helminth infections in faecal samples of wolves *Canis lupus* L. from the western Poland. *Journal of Helminthology*. 2007, s.339-344.

**Kontaktní adresa:** Adam Šimon, MVDr., Ústav ekologie a chorob zoolivních zvířat, zvěře, ryb a včel, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H20321@vfu.cz

## Novel opportunity for adaptation of antibiotic resistant bacteria? Plasmids harbouring genes encoding the prebiotic utilization

<sup>1,2</sup>Nohejl Tomas, <sup>1,2</sup>Palkovicova Jana, <sup>2</sup>Valcek Adam, <sup>1,2,3,4</sup>Dolejska Monika

<sup>1</sup>Department of Biology and Wildlife Diseases, University of Veterinary Sciences Brno, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>CEITEC VFU, University of Veterinary Sciences Brno, Brno, Czech Republic

<sup>3</sup>Department of Clinical Microbiology and Immunology, The University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

<sup>4</sup>Faculty of Medicine, Biomedical Center, Charles University, Pilsen, Czech Republic

### Summary

The *fos* genes responsible for short-chain fructooligosaccharide (scFOS) utilization has been recently found on chromosome and IncHI1 plasmids of pathogenic bacteria. The plasmids encoding prebiotic metabolism could play a key role as a transitional link in the adaptation of antimicrobial resistant (AMR) bacteria. In the collection consisting of 11000 AMR isolates we detected 307 isolates harbouring *fos* genes. We present their genetic background and suggest their possible mobilization on plasmids harbouring antibiotic resistance genes (ARGs) or virulence factors as well.

**Keywords:** Antibiotic resistance; plasmid; prebiotics; *fos* genes; *Escherichia coli*

### Introduction

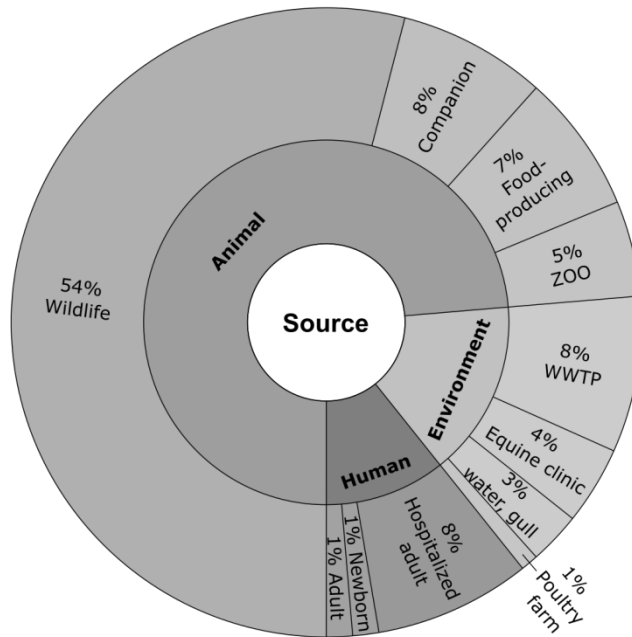
It was considered that *Enterobacteriaceae* are unable to grow in conditions with prebiotics as an only source of carbon. Nevertheless, the first isolate, avian extraintestinal pathogenic *E. coli* BEN2908, utilizing commonly used prebiotics, was found in chicken intestine [1]. This isolate was able to utilize prebiotic scFOS owing to the *fos* operon consisting of seven *fos* genes carried by chromosome. The studies on isolates of equine origin discovered horizontal transfer of the *fos* operon on IncHI1 plasmids along with ARGs [2,3,4]. The first detected was the plasmid pEQ1 obtained from *E. coli* originating from the faeces of a hospitalized horse in the Czech Republic [2]. The follow-up studies revealed the dissemination of the IncHI1 plasmid-encoded *fos* operon also in the Netherlands, Germany, Denmark and France among healthy horses [3,4]. Despite several cases of detection of the *fos* operon, the global distribution in bacterial genomes remains unknown. The *fos* operon possibly plays a role in the adaptation of plasmids among AMR bacteria and therefore promote the spread of ARGs between bacterial populations.

### Material and Methods

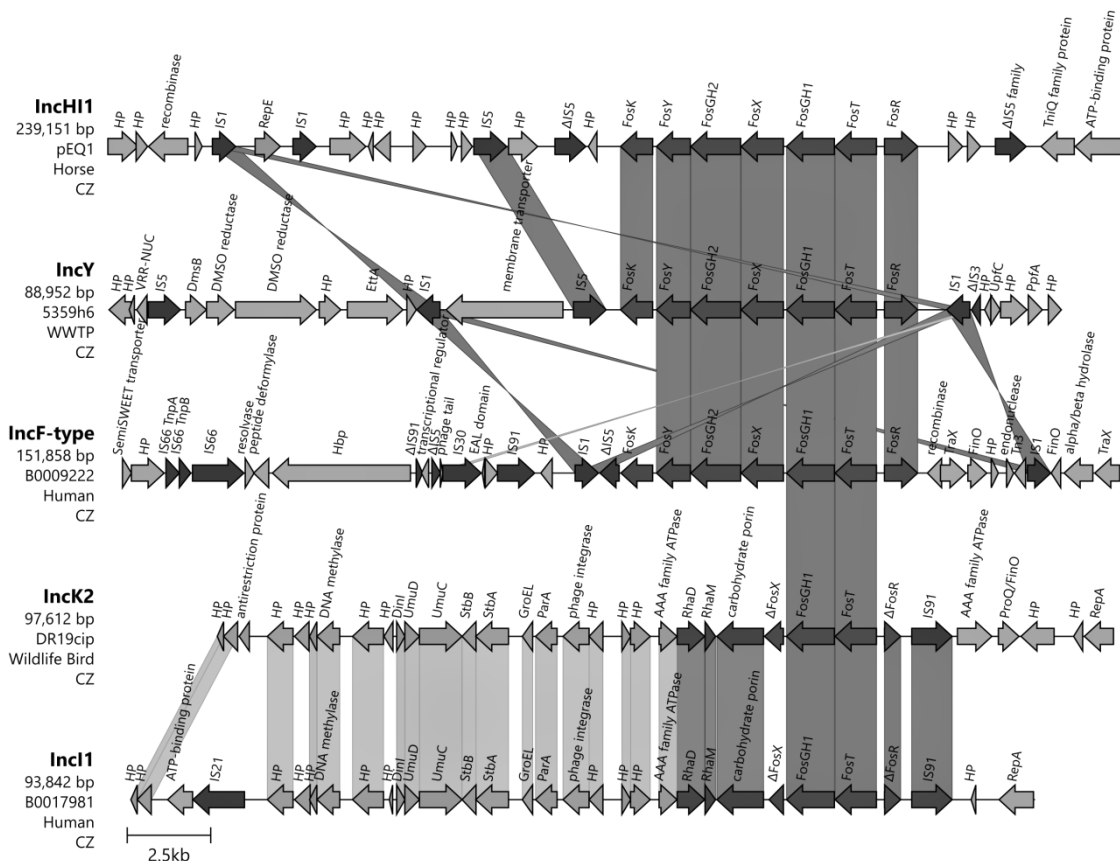
PCR screening was performed to detect the *fosT* gene in more than 11000 antibiotic resistant isolates (mostly *E. coli*) obtained between 2005 and 2019 from humans, food-producing and companion animals as well as wildlife and environment in Europe, North and South America, Africa and Australia. The short-read Illumina and long-read MinION sequencing enabled to elucidate the structure and genetic context of the *fos* operon. The obtained genomes were assembled and annotated. Phenotypic, in silico and phylogenetic analysis were performed to enlighten the *fos* genes complete genetic environment and their role in the evolution of AMR bacteria.

### Results

We obtained 307 isolates with *fosT* gene, corresponding to about 2.8% of all screened isolates (Figure 1). 80% of *fosT*-positive isolates originated from newly found sources. From 237 representative isolates subjected to whole genome sequencing, 162 showed chromosomal location of the *fos* genes, while in 77 isolates the genes were carried by plasmids. The genetic environment of the *fos* genes varied between individual plasmid groups (Figure 2).



**Figure 1. The wide distribution of the *fos* operon in connection with the source of the isolate.** The chart indicates the wide occurrence of the *fos* operon in diverse sources compared to previous studies of isolates mainly originating from horses.



**Figure 2. Structural comparison of the *fos* operon integrated within plasmid sequences with their genetic background.** Dark grey colour represents the genetic sequences of interest (genes encoding saccharide utilization and insertion sequences), light grey colour are accessory genes. HP is an abbreviation for hypothetical protein. Vertical blocks between sequences indicate regions of shared similarity above 95% according to blastn.

IncK2 and IncI1 plasmids lacked some of the *fos* genes but phenotypic test verified that these bacteria also are able to utilize scFOS. These plasmids carried genes mediating utilization of rhamnose instead. The complete *fos* operon located on plasmids was highly associated with the insertion sequence family IS1 among diverse plasmid groups (IncHI1, IncY and IncF-type). Plasmids carrying the *fos* operon included IncF-type (n=28), IncHI1 (n=27), IncK2 (n=14), IncI1 (n=4) and IncY (n=4) groups. The occurrence of *fos* genes together with ARGs was found in IncHI1 (multi-drug resistance region), IncK2 (*bla*<sub>TEM-1A</sub>), IncI1 (*sul2*, *tet(A)*) plasmids and IncY phage-like plasmids (*aadA5*, *dfrA17*, *sul2* and *tet(A)*). IncF-type plasmids harboured genes for virulence factors.

## Discussion

This study showed wide occurrence of the *fos* genes among various sources. Compared to other studies, where the *fos* genes plasmid location was strictly bound to IncHI1 plasmids originating from horse isolates [2,3,4], we demonstrated a substantial diversity in the *fos* genes harbouring plasmids. We observed broad range of the *fos* genes genetic background suggesting different ways of its mobilization compared to the *fos* operon detected in previous studies [2,3].

## Conclusions

Study demonstrates new-found plasmids carrying ARGs together with genes encoding scFOS utilization. Our findings suggest their possible co-selection and mobilization on plasmids creating another potential risk in the AMR crisis. The combination of antibiotics and scFOS presumably creates selective pressure environment therefore optimal conditions for disseminating the plasmids harbouring ARGs.

## Acknowledgement

This study was supported by project 18-23532S from Czech Science Foundation and by IGA VETUNI (209/2021/FVHE).

## References

- [1] CHOUKHA I, et al. 2006. A *selC*-Associated Genomic Island of the Extraintestinal Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain BEN2908 Is Involved in Carbohydrate Uptake and Virulence. *Journal of Bacteriology* Jan 2006, 188 (3) 977-987. doi: 10.1128/JB.188.3.977-987.2006
- [2] DOLEJSKA M, et al. 2014. Complete sequences of IncHI1 plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnrS1* in equine *Escherichia coli* provide new insights into plasmid evolution. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 2014; 69: 2388–2393. doi: 10.1093/jac/dku172
- [3] VALCEK A, et al. 2021. Horsing around: *Escherichia coli* ST1250 of equine origin harbouring epidemic IncHI1/ST9 plasmid with *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and an operon for short-chain fructooligosaccharides metabolism. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021 Feb 22. doi: 10.1128/AAC.02556-20
- [4] DE LAGARDE M, et al. 2020. Spread of multidrug-resistant IncHI1 plasmids carrying ESBL gene *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and metabolism operon of prebiotic oligosaccharides in commensal *Escherichia coli* from healthy horses, France, *International Journal of Antimicrobial Agents* 2020, 55 (6). doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105936

**Contact address:** Tomáš Nohejl, Mgr., Department of Biology & Wildlife Diseases, FVHE VETUNI, Palackeho tr. 1946/1, 612 42 Brno, H19014@vfu.cz



## Sperm variability in temperate bat species

Kateřina Zukalová<sup>1</sup>, Vladimír Piaček<sup>1</sup>, Šárka Bednařiková<sup>1</sup>, Tereza Otčenášková<sup>2</sup>, Pavel Stopka<sup>2</sup>, Jiří Pikula<sup>1</sup>, Veronika Seidlová<sup>1</sup>, Jan Zukal<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Ecology and Diseases of Zoo Animals, Game, Fish and Bees, University of Veterinary Sciences Brno

<sup>2</sup>Faculty of Science Charles University in Prague

<sup>3</sup>Institute of Vertebrate Biology of the Czech Academy of Sciences

### Summary

As a adaptive strategy to environmental changes, the temperate bats exhibit several unique features in their reproductive cycle. We used a non-invasive pulsed electroejaculation generator device to obtain sperms from 37 individuals of 7 species of temperate bats. We found out, that sperm morphology differs between the species of the genus *Myotis* even between all other bat species. Our results suggest that sperm size and expected sperm competition are negatively correlated with the level of sociality.

**Keywords:** Chiroptera, morphometry, reproduction, males, swarming site

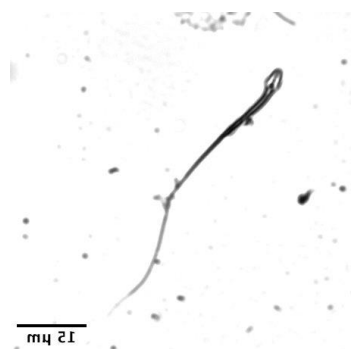
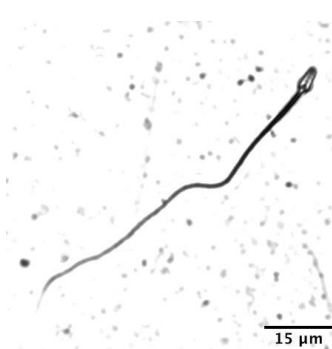
### Introduction

The life cycle of temperate bat species differs dramatically in many aspects from most mammals due to hibernation. In males, spermatogenesis takes place from spring to autumn, when the activation of Leydig cells enlarges the seminiferous tubules and thus increases the size of the testicles by up to 40%. In autumn mating season, bats copulate, and mature spermatozoa are stored in the *cauda epididymis* and in the *testes* shrink. Additional copulations may occur in winter and spring, but new sperm are not expected to form (Gustafson 1979). With a few exceptions, the mating systems of most European bat species are not well described. It is supposed that the most common mating system for European bat species is the so-called "resource-defense polygyny" (Teršová 2018). This type of mating system assumes that both males and females may mate with multiple partners. The success of the male depends on postcopulating processes, i.e., the sperms of multiple males compete for fertilization of female. Operation sex ratio, it means the number of available reproductive females, in colony thus may also affect mating systems (Keeley and Keeley 2004). The colony size can range from a few individuals in the species *Myotis bechsteinii*, through hundreds of individuals in the species *Myotis daubentonii* to colonies numbering several thousand individuals, e.g., *Myotis myotis*. The aim of the study was to confirm the hypothesis that with higher sperm competition, it is more advantageous for males to have a larger number of smaller sperms.

### Material and Methods

During the evening emergence from the Kateřinská Cave, a total 37 bats of 7 species were caught in the trapping cages or netted during September swarming (3 males of *Rhinolophus hipposideros*, 11 males of *Myotis emarginatus*, 9 males of *Myotis bechsteinii*, 6 males of *Myotis nattererii*, 3 males of *Myotis myotis*, 2 males of *Myotis dasycneme*, 2 males of *Myotis daubentonii* and 1 male of *Plecotus auritus*). The individuals were measured, weighed, and placed separately in marked canvas bags. The animals were housed individually using an

inhaler with an isoflurane at a concentration of 1.5-2%. After the animal was anaesthetized, a microelectrode of the pulsed electroejaculation generator device (Utility Model) was inserted into the rectum to achieve semen ejaculation (0.3-3 mA, 50 Hz). The ejaculate was collected with a sterile tip, with 5  $\mu$ l pipetted onto the slide for morphometric analysis. The samples were then fixed 3.7% formaldehyde solution in PBS for 10 minutes. The samples were then wash in PBS for 10 minutes and then in distilled water for 5 minutes. Finally, slides were stored at 4  $^{\circ}$ C in a humid box. Sperm was scanned on an inverted wildfield microscope (Leica DMi8 WF with LAS-X software). Sperm parameters were measured in open-source software FIJI (30 sperms per species). The measured values were head length, head width, midpiece length and tail length. Discriminant analysis was performed using MATLAB software.

Figure 1 Sperm of *Myotis myotis*Figure 2 Sperm of *Rhinolophus hipposideros*

## Results

We did not find any special sperm structures in any species, such as acrosome hooks in rodents (Fig 1 and 2). The shortest were sperm of *Myotis emarginatus* (Tab 1), while the longest sperm shows the males of *Myotis nattereri*. Discriminant analysis (the first two axis explained 87 % of variability) shows structural differences based on sperm morphometry of different bat species. These differences are markable in species of the genus *Myotis* (Fig 3). The independent status of the genus *Plecotus* may be due to its differences in specific ecology or also to a small sample.

Table 1 Morphometric parameters of sperms

Proportions	<i>Rhip</i>	<i>Mema</i>	<i>Mbech</i>	<i>Mnat</i>	<i>Mmyo</i>	<i>Mdas</i>	<i>Mdau</i>
<b>Head_length</b>	5.951	4.956	5.365	5.392	4.646	4.497	5.082
<b>Head_width</b>	2.869	2.921	2.846	2.806	2.923	2.801	2.862
<b>Mid_length</b>	12.753	10.785	14.071	13.02	13.622	15.471	11.68
<b>Tail_length</b>	74.868	59.803	70.969	76.271	61.549	65.172	63.809
<b>Total length</b>	93.572	75.544	90.405	94.683	79.817	85.14	80.571

## Discussion

Gamete morphology is used to understand mating systems across domesticated and wild animals. Morphometric parameters of sperms differ significantly between mammalian species. The data from 284 species (only 6.2% of all mammals) show that sperm size is inverse to body mass except for the Chiroptera (Cummins and Woodall 1985). Long *flagella* can allow greater speed and compressive strength to be achieved. It is thought that longer sperm may swim faster, but that increased mitochondrial demands on *flagella* may shorten the life of these cells (Stockley 1997). In general, high sperm motility is an essential feature for successful fertilization. In some species of Rodentia, special structures like apical hooks, which increase the speed of movement have been identified as an adaptation mechanism in sperm competition (Immler et al 2007). No such structures were confirmed in the studied bat species. The fact that sperm competition (and thus indirectly mating systems) affects their size has been demonstrated for birds where sperm size was positively associated with the risk of their competition. In mammals, this relationship has not yet been demonstrated within any group (Teršová 2018). Our results suggest that sperm size and thus sperm competition are negatively correlated with colony size. *Myotis emarginatus* and *Myotis myotis* form the largest known maternity colonies

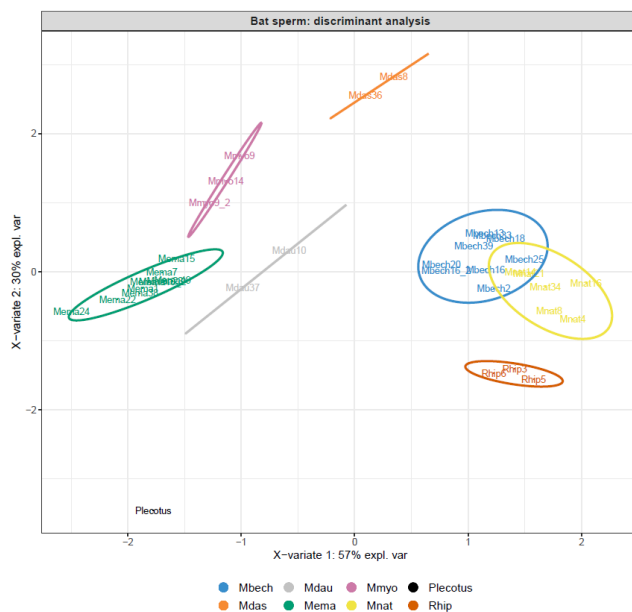


Figure 3: Discriminant analysis based on sperm morphometric parameters of bat species under study.

of the species we studied. We commonly find several thousand individuals of females with young within one roost (*pers. obs.*). Theoretically, the most intense sperm competition can occur in these species where operational sex ratio is highly disbalanced. In other hand, *Myotis bechsteinii*, *Myotis nattereri* and *Rhinolophus hipposideros* form only small groups of up to tens of individuals, corresponding to the lowest risk of sperm competition (Kerth et al 2003, Swift 1997, *pers. obs.*) and they have the longest sperms among our studied species. *Tadarida brasiliensis* forms the largest mammalian group in the world, numbering several million individuals. This species is behaviourally flexible and male copulation strategy and social

mating system change with colony size (Keeley and Keeley 2004). The diversity of bat mating systems and related reproduction strategies is still underestimated.

### Conclusion

Sperm morphology probably determines their functionality and there are significant changes in sperm length across different taxa, as well as between individuals of the same species. Bats social groups range in size from several individuals to groups of hundreds or thousands, leading to huge differences in the risk of sperm competition. Overall, Chiroptera show the greatest diversity in sperm length of all mammals, so it is important to examine not only their morphology but also the environmental factors that affect it.

### Funding

The study was supported by the IGA VETUNI Brno project No. 216/2021/FVHE.

### Literature

- CUMMINS J.M., WOODALL P.F. On mammalian sperm dimensions. *J.Reprod.Fert.* 1985, 75,153-175.
- GUSTAFSON A.W. Male reproductive patterns in hibernating bats. *J.Reprod.Fert.*1979, 56, 317-331.
- IMMLER S., MOORE H.D.M., BREED W.G., BIRKHEAD T.R. By hook or by crook? Morphometry, competition and cooperation in rodent sperm *Plos One* 2007, 1, e170
- KEELEY A.T.H., KEELEY The mating system of *Tadarida brasiliensis* (Chiroptera: Molossidae) in a large highway bridge colony *Journal of Mammalogy* 2004, 85(1):113-119, 2004
- KERTH E., KIEFER A., TRAPPMANN C., WEISHAAR M. High gene diversity at swarming sites suggest hot spots for gene flow in the endangered Bechstein's bat *Conservation Genetics* 2003, 4, 491-499.
- STOCKLEY P. Sexual conflict resulting from adaptations to sperm competition. *TREE* 1997, 12 154-159.
- SWIFT, S. M. Roosting and foraging behaviour of Natterer's bats (*Myotis nattereri*) close to the northern border of their distribution. *Journal of Zoology*, 1997, 242.2: 375-384.
- TERŠOVÁ K. Párovací systémy a fenotyp spermií u netopýrů. Bakalářská práce PřFMU, pp71

**Kontaktní adresa:** Kateřina Zukalová, Mgr., Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H20363@vfu.cz

Editace:	prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D. doc. MVDr. Bohumíra Janštová, Ph.D. doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D. Mgr. Alena Skočková, Ph.D.
Název:	XXIV. konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí. Sborník příspěvků
Ústav:	Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie
Počet stran:	89
Vydání:	1.
Rok vydání:	2022
Vydavatel:	Veterinární univerzita Brno

**ISBN 978-80-7305-869-2**