

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ 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

XXII. KONFERENCE MLADÝCH VĚDECKÝCH PRACOVNÍKŮ S MEZINÁRODNÍ ÚČASTÍ

konaná v roce 30. výročí založení
Fakulty veterinární hygieny a ekologie

Sborník příspěvků

VFU Brno, 20. 5. 2020



Brno 2020

Elektronický sborník byl vydán 15. 7. 2020.

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

ISBN 978-80-7305-846-3

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



VYHLEDÁVEJTE



STUĐUJTE



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@maze.cz Web: www.bezpecnostpotravin.cz



Slovo úvodem

Letošní, již XXII. ročník konference, se koná v roce 30. výročí založení Fakulty veterinární hygieny a ekologie. Tak, jak si postupně tato fakulta upevňovala své postavení v rámci univerzitního vzdělávání, tak si i tato konference během dvaceti dvou let svého pořádání upevnila své místo v postgraduálním univerzitním vzdělávání.

Projektovým realizačním záměrem se jedná od prvopočátku nejen o podporu rozvoje zejména vědecko-výzkumné aktivity studentů s akcentem podpory schopnosti komunikovat, prezentovat své výsledky, ale i podpory vzájemného vztahu školitele a studenta DSP. Posilování schopnosti předávat zkušenosti a dovednosti mladým lidem je nedílnou a nezbytnou součástí dovedností akademického pracovníka a současně hnacím motorem posunu vědění.

prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D.

OBSAH

SEKCE 1: HYGIENA A TECHNOLOGIE POTRAVIN

Vplyv skladovania na kvalitu surového kravského mlieka Kováčová, M., Dudriková, E., Výrostková, J., Kováčová, M.	6
Vplyv humínových kyselín na zrecie procesy vo svalovine nosníc Petříková, D., Koréneková, B., Marcinčák, S., Bartkovský, M.	9
Proline content as an additional honey quality parameter Tkáč M., Vorlová L., Zajíčková M., Voděrová, P.	12
Toxigenní profil bakterií <i>Bacillus cereus sensu lato</i> izolovaných z provozoven stravovacích služeb a balených pokrmů Dorotíková, K., Bogdanovičová, K., Kameník, J.	15
Identification of Lactic Acid Bacteria isolated from food service facilities Křepelová, S., Dušková, M., Kameník, J., Bogdanovičová, ., Dorotíková, K.	18
Výskyt vírusu hepatitídy E v potravinovej komodite Dudášová, K., Jacková, A., Šalamúnová, S., Molnár, L., Ciberej, J., Vilček, Š.	22
Salt stress survival of persistent <i>Listeria monocytogenes</i> from food producing plant Pospíšilová, L., Gelbíčová, T., Karpíšková, R.	25
Avian pathogenic <i>Escherichia coli</i> from human urinary infection-their ability to cause chicken embryo letality Kučerová, D., Kubelová, M., Vacková, Z., Koláčková, I., Karpíšková, R.	28
Obohacení sušenek polyfenoly prostřednictvím přídatku bylin a hroznové mouky Král, O., Fursova, K., Javůrková, Z., Dordevic, D., Pospiech, M., Jančíková, S.	31
Determination of antioxidants in coloured wheat biscuits (Oxana, Jumiko and Vanessa) Doleželová, J., Král, M., Tremlová, B.	34
Prepojenie kvalitatívneho screeningu a ELISA metódy pri stanovení kokcidiostatík v krmivách Juščáková, D., Kožárová, I.	37
 SEKCE 2: CHOV ZVÍŘAT, VÝŽIVA ZVÍŘAT A BIOCHEMIE	
Hodnocení vztahu ukazatelů welfare a stresu u koní – pilotní studie Pešková, L., Hostovský, M.	42
Digitálna dermatitída hovädzieho dobytká: Izolácia <i>Treponema spp.</i> z kožných lézií Marčeková, P., Maďar, M., Mudroň, P., Styková, E.	46
Současný stav řešení problematiky selenu ve výživě psů – review Zentrichová, V.	49

SEKCE 3: OCHRANA ZVÍŘAT, WELFARE A ETOLOGIE

Posouzení příčin brakace telat dle jejich patologických nálezů detekovaných při veterinární prohlídce na jatkách	
Kaluža, M., Večerek, V., Voslářová, E., Semerád, Z.	53
Možnosti využití pedometrů k hodnocení welfare dojníc	
Renčínová, V., Večerek, V., Voslářová, E.	56
Hodnocení stresové zátěže ovcí během praktické výuky	
Urbanová, M., Chloupek, P., Doubková, V., Rozkydalová, M., Popelková, T., Tšponová, Z.	59
Hodnocení welfare nosnic na úrovni hejna	
Křivánková, T., Večerek, V., Voslářová, E.	62
Hodnocení welfare v chovu králíků metodou stanovení metabolitů glukokortikoidů v trusu	
Tšponová, Z., Pištěková, V.	65
Využití obohacujících předmětů u individuálně a sociálně ustájených potkanů	
Nádeníček, J., Voslářová, E., Bedáňová, I., Večerek, V.	68
Vývoj zmien telesnej kondície mačiek behom pobytu v útulku ako indikátor welfare	
Vojtkovská, V., Voslářová, E., Večerek, V.	71

SEKCE 4: VEŘEJNÉ A SOUDNÍ VETERINÁŘSTVÍ A TOXIKOLOGIE

Hodnocení úrovně welfare v chovu mléčných koz stanovením kortizolu ve slinách	
Popelková, T., Rozkydalová, M., Pištěková, V.	75
Vliv času a teploty skladování vzorku na stabilitu kortizolu ve slinách prasat	
Rozkydalová, M., Popelková, T., Chloupek, P.	78
Mikroplasty jako potenciální riziko pro vodní organismy	
Hollerová, A., Hodkovicová, N., Faldyna, M., Mareš, J., Blahová, J., Svobodová, Z.	81
Ekotoxicita zlatých nanočástic pro organismy vodních ekosystémů	
Čaloudová, H., Hlávková, D., Palíková, P., Havelková, B., Beklová, M.	84
Antidepressant fluoxetine as a potential pollutant in water environment	
Václavík, A., Medková, D., Sehonová, P., Svobodová, Z.	87
Vliv ethinylestradiolu na celosamčí triploidní populaci dáňá pruhovaného (<i>Danio rerio</i>)	
Koutková, Z., Zentrichová, V., Medková, D., Blahová, J., Svobodová, Z.	90
Změny vybraných biochemických parametrů u pstruha duhového (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) po expozici ethylhexyl methoxycinamátu	
Cahová, J., Blahová, J., Svobodová, Z.	93
Porovnanie alkalickéj a neutrálnej kométovej analýzy po expozícii neonicotinoidom	
Koleničová, S., Holečková B., Galdíková M., Schwarzbacherová V., Halušková, J., Drážovská, M.	96

SEKCE 5: VETERINÁRNÍ EKOLOGIE A CHOROBY VOLNĚ ŽIJÍCÍCH ZVÍŘAT
Plasmids in pathogenic multiresistant *Escherichia coli*

Palkovičová, J., Kutilová, I., DelaFuente, J., Phan, M. D., Medvecký, M., San Millan, A., Dolejská, M. 100

Plasmid-mediated colistin resistance among human clinical *Enterobacteriaceae* isolates: surveillance in the Czech Republic, 2017-2019

Zelendová, M., Jakubů, V., Jamborová, I., Pomorská, K., Medvecký, M., Žemličková, H., Dolejská, M. 103

Enterobakterie a pseudomonády s rezistencí k antimikrobiálním látkám u pelikánů

Šišmová, P., Dolejská, M., Diakou, A., Literák, I. 106

First report of colistin resistance gene *mcr-1* from wildlife in Russia

Tarabai H., Valček, A., Jamborová, I., Vazhov, S. V., Karyakin, I. V., Raab, R., Literák, I., Dolejská M. 109

Vplyv sezónnych zmien na mikrobiálnu asociáciu ovzdušia v chove hovädzieho dobytku

Mindžáková, I., Gregová, G., Szabóová, T., Venglovský, J. 112

Sérologická prevalence protilátek proti patogenu *Borrelia burgdorferi sensu lato* u koní v České republice

Kašpárková N., Bártová E., Šamonilová, E., Žákovská, A. 115

Distribuce infekční mykotické dermatitidy u hadů způsobené *Ophidiomyces ophidiicola*

Příbyl, M., Baláž, V. 118

Forgotten parasites? *Hepatozoon* spp. from Iranian reptiles

Zechmeisterová K., Široký P. 121

Is more dangerous to go to the zoo or to parks in Brno? Detection of infectious agents of selected zoonotic diseases.

Pittermannová, P., Kašpárková, N., Černíková, L., Žákovská A., Bártová, E. 124

Of mice and men – zoonotic diseases in rodent and insectivore reservoir hosts

Balážová, A., Jiroušová, E., Baláž, V. 127

Spatial and numerical responses of Red Kites *Milvus milvus* to the Common Vole *Microtus arvalis* population outbreak

Dostál, M., Tkadlec, E., Raab, R., Horal, D., Matušík, H., Rymešová, D., Literák, I. 130

Biotopové preference celosvětově ohroženého raroha velkého *Falco cherrug* v místech dočasného usídlení v Panonské pánvi

Rozsypalová, L., Raab, R., Spakovszky, P., Rymešová, D., Škrábal, J., Literák, I. 133

Insect ectoparasites from wild passerine birds in the Azore Islands

Ošlejšková, L., Sychra O., Kounková, Š., Gustafsson, D. R., Resendes R., Rodríguez, P., Literák, I. 136

Visualization of digestive tract of ticks

Ondruš, J., Široký, P., Novobilský, A. 139

Druhovú skladbu a detekcia hostiteľskej krvi pakomárikov *Culicoides* v zvernici s raticovou a pernatou zverou

Kasičová, Z., Komorová, P., Schreiberová, A., Halán, M., Kočíšová, A. 142

Vliv probiotik na imunitní odpověď pstruha duhového	
Minářová H., Palíková M., Mareš J., Kudláčková, H., Pojezdal, Ľ., Hodkovicová, N., Machát, R., Blahová, J., Mudroňová, D., Faldyna, M.	145
Teplotně závislá proliferace netopýřích makrofágů jako indikátor vrozené imunity	
Němcová, M., Seidlová, V., Zukal, J., Pikula, J.	148
Hematologické a biochemické parametry u vybraných druhů netopýřů z oblasti Palearktu	
Kubíčková, A., Heger, T., Kaňová, M., Linhart, P., Němcová, M., Pikula, J., Sedláčková, J., Seidlová, V., Zukal, J., Bandouchová, H.	151
Phagocyte activity reflects mammalian homeo- and hetero-thermic physiological states	
Heger, T., Bandouchová, H., Seidlová, V., Němcová, M., Papežíková, I., Piaček, V., Zajíčková, R., Zukal, J., Pikula J.	154
The investigation of binding the conazole fungicide prothioconazole with human serum albumin. Spectroscopic approach.	
Golianová, K., Jutková, A., Verebová, V., Staničová, J.,	157

SEKCE 1

Hygiena a technologie potravin

Vplyv skladovania na kvalitu surového kravského mlieka

Impact of storage on the quality of raw cow's milk

Kováčová Mariana, Dudriková Eva, Výrostková Jana, Korítková Mária

*Ústav hygieny a technológie mlieka, Katedra hygieny a technológie potravín,
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Slovenská republika*

Summary

High nutritional value make milk full-fledged food. The microbial quality of raw milk is strongly influenced by prolonged storage. The aim of this study was to monitor changes in the microbiological quality of raw cow's milk by monitoring changes in the total number of microorganisms and the number of psychrotrophic microorganisms due to storage. Raw cow's milk samples were collected between years 2019 and 2020. Milk samples were determined on the day of milking and 24 hours. and 72 hours. after milking. The results of the statistical analysis showed significant statistical differences ($p < 0.01$) and ($p < 0.001$) in the change in the microbiological quality of raw cow's milk.

Keywords: milk; microbiology; psychrotrophic microorganisms

Úvod

Mlieko patrí k najdôležitejším potravinám živočíšneho pôvodu. Hlavný faktor, ktorý určuje kvalitu mlieka je jeho mikrobiologická záťaž. Aby mohlo byť mlieko použité na ľudskú spotrebu, musí spĺňať určité požiadavky, a to na: počet somatických buniek, celkový počet mikroorganizmov a neprítomnosť inhibičných látok v mlieku. Somatické bunky nachádzajúce sa v surovom kravskom mlieku slúžia ako dôležitý ukazovateľ zdravotného stavu mliečnej žľazy, pričom sa využívajú k detekcii mastitídy (Olatoye et al., 2018). Podľa Nariadenia Komisie (ES) č. 1662/2006 doplňujúceho Nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 z 29. apríla 2004, ktorým sa ustanovujú osobitné hygienické predpisy pre potraviny živočíšneho pôvodu môže surové kravské mlieko obsahovať v jednom mililitri pri teplote 30 °C najviac 400 000 somatických buniek a celkový počet mikroorganizmov (CPM) nesmie byť vyšší ako 100 000 KTJ. Mikrobiálna kontaminácia surového kravského mlieka môže byť ovplyvnená zdravotným stavom dojnice, hygienou životného prostredia, chladením a dĺžkou jeho skladovania. Pri správnych podmienkach dojenia a následného chladenia počas skladovania tvoria psychrotrofné baktérie v mlieku približne 10 %. V prípade, že je mlieko získavané v nevyhovujúcom hygienickom prostredí, môže ich počet predstavovať až 75 % (Samaržija et al., 2012). Z psychrotrofných baktérií boli často z mlieka izolované gram-negatívne rody: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* a *Flavobacterium*, a gram-pozitívne rody: *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium* a *Streptococcus* (Ozer, 2014).

Cieľom práce bolo sledovanie zmien mikrobiologickej kvality surového kravského mlieka počas skladovania, a to: stanovením celkového počtu mikroorganizmov a stanovením počtu psychrotrofných mikroorganizmov.

Materiál a metódy

Bazénové vzorky surového kravského mlieka boli odoberané počas ranného dojenia 1x mesačne v mesiaci október, november, december a január v roku 2019 a 2020. Laboratórne vyšetrenia bazénových vzoriek surového kravského mlieka boli prevedené ihneď po príchode vzoriek do laboratória (0. deň), a následne po 24 hodinách (1.deň) a 72 hodinách (3.deň) uskladnenia vzoriek. Do doby vykonania analýzy boli vzorky surového kravského mlieka uchovávané pri teplote 6 °C. Na mikrobiologickú analýzu boli vzorky spracované podľa STN

EN ISO 6887-5. Celkový počet mikroorganizmov bol stanovený podľa STN EN ISO 4833-1. Paralelne dve platne vhodného desaťnásobného riedenia o objeme 1 ml boli zaliate Plate count agarom (PCA) (HiMedia, India) ochladeného na teplotu 44 – 47 °C. Platne boli inkubované po dobu 72 hodín pri teplote 30 °C. Celkový počet psychrotrofných mikroorganizmov sa stanovil podľa STN EN ISO 6730. Platne boli inkubované pri teplote 6,5 °C po dobu 10 dní. Štatistická analýza bola vykonaná pomocou štatistického programu ANOVA.

Výsledky a diskusia

Celkovo bolo vyšetrených dvadsať bazénových vzoriek surového kravského mlieka. Mikrobiálna kvalita surového mlieka je výrazne ovplyvnená pri jeho predĺženom skladovaní. Najväčší účinok možno pozorovať po dvoch až troch dňoch skladovania surového mlieka pri teplote 6 °C (Vithanage et al., 2016). Mikrobiologický rozbor bazénových vzoriek surového kravského mlieka ukázal, že najnižší počet CPM pri všetkých bazénových vzorkách mlieka bol zaznamenaný v 0. deň stanovenia a najvyšší počet CPM sme pozorovali po 72 hodinách (v 3. deň stanovenia). Súvisí to s rastovou krivkou mikroorganizmov a s dĺžkou lag fázy. Tabuľka č. 1 udáva priemerné hodnoty celkového počtu mikroorganizmov detegované v sledovaných časových intervaloch. Výsledky štatistickej analýzy potvrdili rozdiel v počte CPM medzi 0. dňom a 1. dňom, a to v mesiaci október, kedy došlo k štatisticky významnej zmene ($p < 0,01$) a v mesiaci január ($p < 0,001$). Pri porovnaní tretieho dňa oproti nultému a prvému dňu bol vo všetkých sledovaných mesiacoch stanovený štatisticky výrazný rozdiel ($p < 0,001$) v počte CPM.

Tabuľka 1. Celkový počet mikroorganizmov v bazénových vzorkách surového kravského mlieka počas sledovaného obdobia.

Celkový počet mikroorganizmov (KTJ.ml ⁻¹)				
	Október 2019	November 2019	December 2019	Január 2020
0. deň	47 613 ± 3 360	70 663 ± 1 098	115 488 ± 5 610	30 388 ± 4 320
1. deň	109 625 ± 6 380	175 500 ± 1 739	412 500 ± 1 144	85 725 ± 5 800
3. deň	397 500 ± 5 584	2 460 000 ± 4 861	1 892 625 ± 6 825	370 000 ± 3 878

Počet psychrotrofných mikroorganizmov stanovený v deň odoberania vzoriek a následne po 24 hodinách skladovania vzoriek mlieka bol stanovený pod minimálnou detegovanou hodnotou ($CPM < 15$ KTJ.ml⁻¹). Po 72 hodinách bol pozorovaný nárast počtu psychrotrofných mikroorganizmov v bazénových vzorkách surového kravského mlieka. Priemerná hodnota počtu psychrotrofných mikroorganizmov v mesiaci október bola $18\,538 \pm 436$ KTJ.ml⁻¹, v novembri $53\,500 \pm 755$ KTJ.ml⁻¹, v decembri $68\,000 \pm 559$ KTJ.ml⁻¹ a v januári $17\,238 \pm 229$ KTJ.ml⁻¹. Marchand et al. (2008) uvádza, že existujú aj sezónne variácie v raste mikroorganizmov v mlieku, pričom psychrotolerantné baktérie vykazujú lepšiu rast a vyššiu produkciu proteáz v zimnom období, na rozdiel od letného obdobia. Výsledky práce korelujú s výstupmi iných autorov. Gargouri, Hamed, Elfeki (2013) uvádzajú zvýšenie počtu psychrotrofných mikroorganizmov do $50\,000$ KTJ.ml⁻¹ po skladovaní vzoriek surového mlieka počas 72 hodín.

Záver

Výsledky práce potvrdzujú, že mlieko svojim zložením predstavuje vhodné prostredie pre rast a rozmnožovanie mikroorganizmov. Počas skladovania mlieka sme zaznamenali významný nárast celkového počtu mikroorganizmov, a taktiež zvýšenie počtu psychrotrofných mikroorganizmov. Dodržiavanie hygienických požiadaviek pri získavaní mlieka a jeho

prvotnom ošetrení predstavuje jeden z hlavných faktorov, ktorý priamo vplýva na mikrobiologickú kvalitu surového kravského mlieka počas doby jeho skladovania.

Literatúra

GARGOURI, A. – HAMED, H. – ELFEKI, A. Analysis of Raw Milk Quality at Reception and During Cold Storage: Combined Effects of Somatic Cell Counts and Psychrotrophic Bacteria on Lipolysis. In *Journal of Food Science*. ISSN 1750-3841, 2013, vol. 78, no. 9, p. 1405-1411.

MARCHAND, S. et al. 2009. Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. In *Environmental Microbiology*, ISSN 1462-2920, 2009, vol. 11, p. 467-482.

NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 1662/2006 doplnujúceho Nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 z 29. apríla 2004, ktorým sa ustanovujú osobitné hygienické predpisy pre potraviny živočíšneho pôvodu. [10-04-2019] Dostupné na internete: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SK/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1662&from=SK>>.

OLATOYE, O. et al. Bulk tank somatic cell count and associated microbial quality of milk from selected dairy cattle herds in Oyo State, Nigeria. In *Italian Journal of Food Safety*. ISSN 2239-7132, 2018, vol. 7, no. 2, p. 95-100.

OZER, B. H., AKDEMIR-EVRENDILEK, G. *Dairy Microbiology and Bio-chemistry: Recent Developments*. CRC Press. 2014, 4-7 s. ISBN 978-1-4822-3502-9.

SEMAŽINA et al.: Psychrotrophic bacteria and milk quality. In *Mljekarstvo*. ISSN 1846-4025, 2012, vol. 62, p. 77-95.

STN EN ISO 4833-1 – Mikrobiológia potravinárskeho reťazca. Horizontálna metóda na stanovenie počtu mikroorganizmov. Časť 1: Metóda počítania kolónií kultivovaných pri 30 °C zalievaním inokula. Bratislava, SR: SÚTN. 2013.

STN EN ISO 6730 – Mlieko. Stanovenie počtu jednotiek tvoriacich kolónie psychrotrofných mikroorganizmov. Technika počítania kolónií vykultivovaných pri 6, 5 °C. Bratislava, SR: SÚTN. 2000

STN EN ISO 6887-5 – Mikrobiológia potravín a krmív. Úprava analytických vzoriek, príprava základnej suspenzie a desaťnásobných riedení na mikrobiologické skúšanie. Časť 5: Špecifické pokyny na úpravu mlieka a mliečnych výrobkov. Bratislava, SR: SÚTN. 2010.

VITHANAGE, N. R. et al. Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. In *International Dairy Journal*. ISSN 0958-6946, 2016, vol. 57, p. 80-90.

Kontaktná adresa: Mariana Kováčová, Mgr., Ústav hygieny a technológie mlieka, UVLF Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika, mariana.kovi@gmail.com

Vplyv humínových kyselín na zrecie procesy vo svalovine nosníc

Effect of humic acids on maturation processes in muscle of laying hens

Petriková Dominika, Koréneková Beáta, Marcinčák Slavomír, Bartkovský Martin

*Ústav hygieny a technológie mäsa, Katedra hygieny a technológie potravín,
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Slovak Republic*

Summary

This work deals with the influence of humic acids on maturation processes in the muscle of laying hens. The experiment included 50 laying hens of the Lohman Brown classic hybrid. The control group was fed with commercial feed mixtures for laying hens. In the experimental group, humic acids were added to the commercial feed mixtures for laying hens at a concentration of 1%. Physico-chemical parameters were determined in breast and thigh muscle samples 24 hours, 3 and 7 days after killing. The positive effect of humic acids on lactic acid and phosphates concentrations and also pH values was observed in this study.

Keywords: *humic acids; lactic acid; phosphates; pH; laying hens*

Úvod

Humínové látky sú prírodné, žlté až hnedožlté organické zlúčeniny s relatívne vysokou molekulovou hmotnosťou, ktoré vznikajú rozkladom rastlinnej a živočíšnej hmoty a enzymatickou činnosťou mikroorganizmov. Tento proces rozkladu sa nazýva humifikácia. Prírodné sa nachádzajú v zemine, rašelini, hnedom uhli a pod.. Patria medzi najsilnejšie chelatujúce činitele spomedzi prírodných organických látok. Humínové látky obsahujú humínové kyseliny, fulvonové kyseliny, nerozpustný zvyšok - humín a niektoré mikroelementy (Fe, Mn, Cu, Zn) (Kadam et al., 2009). V súčasnosti sa humínové látky používajú v poľnohospodárstve, ochrane životného prostredia, farmakológii, medicíne, chovateľstve (El-Hack et al., 2015). V chovoch, kde boli aplikované humínové kyseliny do krmnej dávky boli zaznamenané vyššie denné prírastky. Tým, že zvyšujú vstrebávanie živín z krmiva zabezpečujú zvýšenie hmotnosti zvierat a bez toho, aby muselo prijímať väčšie množstvo krmiva, takže tieto látky aj pozitívne ovplyvňujú jatočnú výťažnosť. Chovy sú viac vyrovnané, zvieratá majú lepšiu kondíciu a znižuje sa úhyn (Kaya et al., 2009).

Materiál a metódy

Na experiment sa použilo 20 nosníc (*Gallus gallus domesticus*), plemeno Lochman Brown Classic. 17-týždňové sliepky boli získané od slovenského dodávateľa (Eggro-farm s.r.o., Košická Polianka). Nosnice boli chované na hlbokoj podstielke vo voľnom výbehu. Prístup k vode mali *ad libitum*. Kŕmené boli raz denne, pričom množstvo krmiva záviselo od ich veku. Nosnice vo veku 13 až 18 týždňov dostávali 75g krmiva/kus/deň, 19 - týždenné sliepky dostávali 81g krmiva/kus/deň, 20 týždňov staré sliepky až do prvej znášky dostávali 93 g krmiva/kus/deň a sliepky v znáške 100 g krmiva/kus/deň. Nosnice boli náhodne rozdelené do 2 skupín - kontrolná a experimentálna skupina. Kontrolná skupina (K) bola kŕmená priemyselne vyrábanou kompletnou kŕmnom zmesou (KKZ) pre nosnice (DeHeus, Bučovice, Česká republika). Pokusná skupina (HK) bola kŕmená KKZ s prídavkom humínových kyselín v koncentrácii 1 % (Humac s.r.o., Slovenská republika) od 20. týždňa života nosníc. Na 31. týždeň veku boli nosnice usmrtené cervikálnou dislokáciou a jatočne opracované. Odobraté boli vzorky prsnej (16) a stehennej (16) svaloviny, ktoré boli uskladnené pri 4°C. Fyzikálno – chemická analýza sa vykonala 24 h po usmrtení a na 3. a 7. deň zrenia. Na stanovenie kyseliny mliečnej a fosfátov sa využila metóda elektroforetickej analýzy. Kyselina mliečna a fosfáty boli

extrahované zo svaloviny destilovanou vodou. Vzorky po filtrácii boli stanovené Elektroforetickým analyzátorom (EA 102, Villa Labeco s.r.o., SR) za použitia vodivostného detektora. Prúd v predseparačnej kolóne (dĺžka 90 mm) bol 250 μ A a v analytickej kolóne (dĺžka 160 mm) 50 μ A. Použitý bol vodiaci elektrolyt: 10 mmol HCl + β -alanín + 0,1% m-HEC a zakončujúci elektrolytu: 5 mmol kyselina kaprónová + 5 mmol TRIS. Analýzy boli vyhodnotené programom ITP Pro 32 a udávané v g/100g vzorky. Hodnoty pH boli stanovené sklenenou elektródou vo vodnom extrakte svaloviny pH-metrom (InoLab WTW 720). Výsledky z tohto experimentu boli štatisticky analyzované pomocou programu GraphPad Prism 5.0. Získané boli priemery \pm smerodajná odchýlka ($X \pm SD$). Na porovnanie výsledkov medzi skupinami sa použil Studentov *t*-test ($p \leq 0,001$ ***; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,05$ *), na porovnanie výsledkov medzi jednotlivými dňami *post mortem* v rámci jednej skupiny sa použila jednocestná Anova (Tukeyove porovnanie, $p < 0,05$).

Výsledky a diskusia

Koncentrácie kyseliny mliečnej a fosfátov v prsnej a stehennej svalovine nosníc boli najvyššie 24 hodín po zabití v kontrolnej aj experimentálnej skupine (Tabuľka 1 a 2). Dynamika kyseliny mliečnej v celom časovom intervale zrecieho procesu v mäse odráža kvantitatívnu premenu glykogénu na kyselinu mliečnu. V počiatkovej fáze je jej nárast najvýraznejší. Rýchlosť poklesu pH je závislá od aktivity glykolytických enzýmov ihneď po usmrtení. Konečná hodnota pH je určená počiatkovými rezervami glykogénu vo svale. Nízke pH je spojené so zlou schopnosťou zadržiavania vody a vysoké pH súvisí so zlou skladovateľnosťou, pretože vytvára priaznivejšie prostredie pre rast a množenie baktérii. Normálna hodnota pH jednu hodinu po usmrtení je okolo 6,9 - 7,1 a hodnota pH 24 hodín *post mortem* je okolo 5,7 - 5,9 (Gomez-Basauri et al., 1992). Rýchlosť poklesu hodnôt pH závisí aj od koncentrácie glukózy, teploty svalu a metabolického stavu zvierat pred zabitím (Sanz et al, 2002). V našom experimente počas celej doby zrenia svaloviny boli vyššie koncentrácie kyseliny mliečnej a fosfátov a od toho sa odvíjajúce nižšie hodnoty pH namerané v experimentálnej skupine (HK). Humáty spôsobujú zníženie produkcie stresových hormónov u zvierat, kde bol pozorovaný menší vplyv na vonkajšie podnety, ako napríklad na ich vysokú koncentráciu, či obmedzenú plochu výbehu (Kaya et al., 2009). Takéto zvieratá majú vyšší obsah glykogénu, a tým pádom vyšší obsah kyseliny mliečnej vo svalovine po zabití. Taktiež humínové kyseliny pozitívne vplývajú na metabolizmus bunky, zvyšuje sa tvorba ATP (Vaško a kol., 2008), preto svalovina obsahuje vyššie koncentrácie fosfátov ako kontrolná skupina.

Tabuľka.1: Výsledky fyzikálno-chemickej analýzy vzoriek prsnej svaloviny (priemer \pm SD).

Parametre	Deň <i>post mortem</i>	Skupiny		P hodnota
		K	HK	
Kyselina mliečna (g/100 g vz.)	1.	1,69 \pm 0,20 ^b	2,14 \pm 0,35 ^a	**
	3.	1,61 \pm 0,11 ^b	1,83 \pm 0,08 ^b	***
	7.	1,29 \pm 0,13 ^a	1,46 \pm 0,13 ^c	*
Fosfáty (g/100 g vz.)	1.	1,00 \pm 0,24 ^a	1,33 \pm 0,13 ^a	**
	3.	0,88 \pm 0,09 ^{ab}	1,01 \pm 0,12 ^b	***
	7.	0,69 \pm 0,07 ^b	0,86 \pm 0,11 ^b	**
pH hodnoty	1.	5,85 \pm 0,11 ^b	5,69 \pm 0,07 ^b	**
	3.	5,92 \pm 0,10 ^b	5,74 \pm 0,14 ^b	**
	7.	6,20 \pm 0,07 ^a	6,00 \pm 0,10 ^a	***

^{a-c} Hodnoty v stĺpci s iným horným indexom sú štatisticky odlišné (Tukey's, P, 0,05).

Signifikantne zmeny medzi kontrolnou a pokusnou skupinou na hladine: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ (T-test)

Tabuľka 2: Výsledky fyzikálno-chemickej analýzy vzoriek stehennej svaloviny (priemer \pm SD).

Parametre	Deň <i>post mortem</i>	Skupiny		P hodnota
		K	HK	
Kyselina mliečna (g/100 g vz.)	1.	1,12 \pm 0,23	1,39 \pm 0,14	*
	3.	0,98 \pm 0,15	1,28 \pm 0,23	**
	7.	0,92 \pm 0,19	1,17 \pm 0,20	*
Fosfáty (g/100 g vz.)	1.	0,92 \pm 0,18 ^a	1,04 \pm 0,23 ^a	
	3.	0,67 \pm 0,09 ^b	0,78 \pm 0,14 ^b	
	7.	0,56 \pm 0,13 ^b	0,64 \pm 0,07 ^b	
pH hodnoty	1.	6,09 \pm 0,08 ^b	5,92 \pm 0,07 ^b	***
	3.	6,12 \pm 0,06 ^b	6,00 \pm 0,10 ^b	*
	7.	6,31 \pm 0,09 ^a	6,18 \pm 0,08 ^a	**

^{a-c} Hodnoty v stĺpci s iným horným indexom sú štatisticky odlišné (Tukey's, P, 0,05).

Signifikantne zmeny medzi kontrolnou a pokusnou skupinou na hladine: * p \leq 0,05; ** p \leq 0,01; *** p \leq 0,001 (T-test)

V stehennej svalovine boli namerané nižšie koncentrácie kyseliny mliečnej a fosfátov v dôsledku nižšieho obsahu glykogénu a rýchlejšieho vyčerpania ATP v tomto type svaloviny (Fernandez-Lopez et al., 2003).

Záver

Na základe výsledkov získaných v tejto štúdií môžeme konštatovať, že doplnenie 1 % prídavku humínových kyselín do krmnej zmesi pre nosnice pozitívne ovplyvnilo postmortálne zmeny. Vďaka vyššej koncentrácii kyseliny mliečnej vo svalovine sme získali hydínové mäso s nižšou konečnou hodnotou pH, čo predĺžilo trvanlivosť mäsa.

Podakovanie

Práca bola vykonaná vďaka finančnej podpore Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-14-0397.

Literatúra

SANZ Y., 2002. Role of muscle and bacterial exopeptidases in meat fermentation. In: F Toldr'a (ed.) *Research Advances in the Quality of Meat and Meat Products*. Research Signpost, Trivandrum, pp. 143–155.

EL-HACK A.B.D., ALAGAWANY, M., 2015. Performance, egg quality, blood profile, immune function, and antioxidant enzyme activities in laying hens fed diets with thyme powder. *J. Anim. Feed Sci.*, 24, pp. 127-133.

KADAM A.S. et al., 2009. Influence of herbal early chick nutritional supplement on the growth performance, serum biochemical and immune response of broiler chicken. *Int J Poult Sci* 8, pp. 349-354

KAYA C.A., TUNCER S.D., 2009. The effects of humates on fattening performance, carcass quality and some blood parameters of broilers. *J Anim Vet Adv* 8, pp. 281-284.

GOMEZ-BASAURI J.V., REGENSTEIN J.M., 1992. Vacuum packaging, ascorbic acid and frozen storage effects on heme and non-heme iron content of mackerel. *J Food Sci* 57, pp. 1337–1339.

VAŠKO, L., VAŠKOVA J., FAJERČAKOVA, A., HUBKOVA, B., 2008. Humínové kyseliny intenzifikačný faktor pri výrobe biopotravín, 13. *Ekológia vo vybraných aglomeráciách*, Hrádok, pp. 48-51.

FERNANDEZ-LOPEZ J. et al., 2003. Physical, chemical and sensory properties of bologna sausage made with ostrich meat. *J Food Science* 68, pp. 1511–1515.

Kontaktná adresa: Dominika Petriková, Mgr., Ústav hygieny a technológie mäsa, UVLF Košice, Komenského 73, 04181, Košice, Slovenská republika, Dominika.Petrikova @ student.uvlf.sk

Proline content as an additional honey quality parameter

Tkáč Matej, Vorlová Lenka, Zajíčková Marcela, Voděrová Petra

*Dpt. of Animal Origin Food & Gastronomic Sciences, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic*

Summary

Our study focused on the analysis of proline content in the honey samples (n=60) collected in stores in Brno (n= 30), from Czech (n= 20) and Slovak beekeepers (n=10) during the years of 2018 and 2019. We proceeded in accordance with the "Harmonised Methods of the International Honey Commission" (Bogdanov, 2009). The proline contents (mg/kg) varied considerably from 109.3 ± 11.59 to 1062.1 ± 6.16 ; with the highest average value obtained for honeydew honeys (572.2 ± 256.75). Among the analysed unifloral honeys the lowest proline contents (mg/kg) were obtained for black locust honeys (202.0 ± 30.48), followed with lime honeys (342.2 ± 82.95). From among all analysed honey samples only five samples' (8.3 %) proline content was lower than 180 mg/kg. The most significant difference ($p < 0.01$) was observed between Czech beekeepers and commercial Czech honeys.

Keywords: *unifloral honey; beekeepers honey; proline content; blossom honey; honeydew honey*

Introduction

The amino acid proline is a characteristic component of honey. Proline is added to honey by bees as a secretion of their pharyngeal glands (Bogdanov et al., 2004). It is the most abundant amino acid in honey – it accounts for 50-85 % of the total amino acid content (Belitz et al., 2009). The concentration of proline in honeys varies depending on the botanical origin of the honey, as a number of studies pointed out (Persano-Oddo et al., 2004 and Flanjak et al., 2016). The lowest average concentration of proline is observed in black locust honeys 222 ± 58 mg/kg, followed by rape honeys 235 ± 49 mg/kg, lime honeys 352 ± 102 mg/kg, sunflower honeys 562 ± 146 mg/kg and finally honeydew honeys 468 ± 127 mg/kg (Persano-Oddo et al., 2004). Although the concentration of proline is not a parameter of honey stipulated by law, a concentration lower than 180 mg/kg may indicate an immaturity of honey or an adulteration of honey with sugar syrups (Bogdanov, 2009).

The aim of this paper was to determine the proline concentration in honeys collected in the markets in the Czech Republic and in honeys collected directly from Czech and Slovak beekeepers. We also aimed to compare the detected proline concentrations with an indicative value of 180 mg/kg and to determine whether there are statistically significant differences in the content of proline between the analysed groups of honeys from a geographical point of view.

Material and Methods

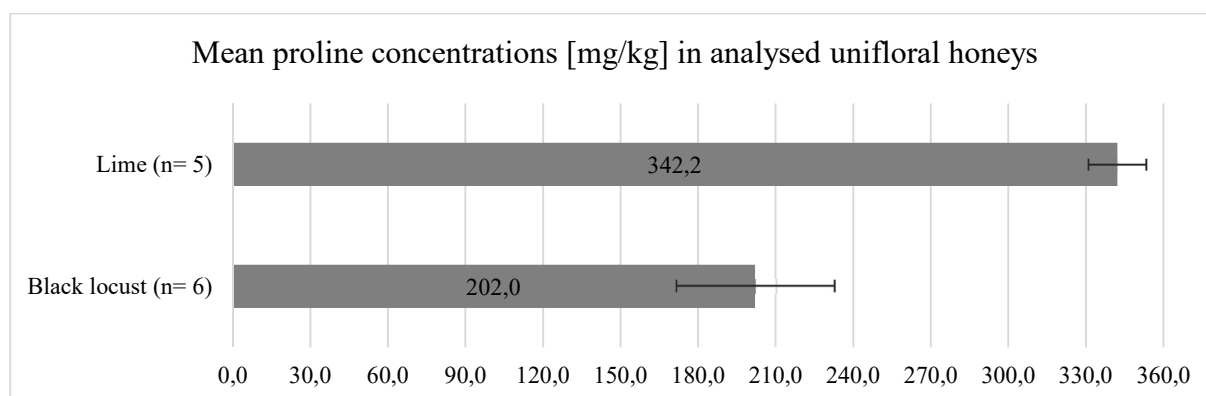
Honey samples collected in the markets (n = 30) in 2018 in Brno (Czech Republic) were analysed. Furthermore, honey samples (n = 30) collected directly from beekeepers from different regions of the Czech Republic (n = 20) in 2018 and 2019 were analysed as well as honey samples from various regions of the Slovak Republic (n = 10) in 2018. Honey samples were stored in the dark at 23 ± 2 °C in original packaging until the analysis.

The proline content was determined spectrophotometrically. The principle of the determination is the reaction of proline with ninhydrin forming a colour complex. We performed the analysis according to the "Harmonized Methods of the International Honey Commission" (Bogdanov, 2009). The Excel (Microsoft Corp., US) and Unistat 5.6 programmes were used for data processing and statistical evaluation.

Results and Discussion

The determined proline concentrations (mg/kg) were varied considerably in honeys and ranged from 109.3 ± 11.59 to 1062.1 ± 6.16 ; with a mean value of 391.0 ± 212.51 . Proline concentrations (mg/kg) in honeys from the markets with declared EU and non-EU origin ($n = 20$) ranged from 183.0 ± 3.86 to 1062.1 ± 6.16 ; with a mean value of 523.5 ± 255.70 . In honeys from the markets with declared origin in the Czech Republic (CR) ($n = 10$) we recorded proline concentrations (mg/kg) ranging from 109.3 ± 11.59 to 297.4 ± 10.79 ; with a mean value of 213.7 ± 70.69 . Among the analysed honeys from the markets with declared origin in the Czech Republic a proline concentration less than 180 mg/kg was detected in 4 samples of blossom honeys (40 %). The proline concentrations (mg/kg) in these honeys ranged from 109.3 ± 11.59 to 161.1 ± 7.72 .

In contrast, all analysed honeys directly from Czech beekeepers ($n = 20$) had a proline concentration higher than 180 mg/kg. Their average proline concentration (369.4 ± 134.43 mg/kg) was 1.7 times higher compared to the average value detected in honeys from the markets with declared origin in the Czech Republic. In addition, statistically highly significant difference ($p < 0.01$) between the proline concentrations in honeys from the markets with declared origin in the Czech Republic and honeys directly from Czech beekeepers was detected. The Quality Standard for Slovak Honey no. 1/2006 in contrast to the Quality Standard for Czech Honey no. 1/1999 states the minimum proline concentration for blossom honeys (210 mg/kg), except for black locust honeys and for honeydew honeys (350 mg/kg) in the supplementary requirements. By comparing the determined proline concentrations in honey samples directly from Slovak beekeepers with the requirements of the Quality Standard for Slovak Honey no. 1/2006 proline concentrations lower than 210 mg/kg were detected in 2 samples of blossom honeys, however, they were black locust honeys. Proline concentrations (mg/kg) in the analysed blossom honeys ($n = 7$) ranged from 228.0 ± 19.62 to 400.4 ± 22.49 . Among the analysed honeydew honeys ($n = 3$) from Slovak beekeepers a proline concentration lower than 350 mg/kg was detected in 1 sample – the concentration of 257.9 ± 42.32 mg/kg. The difference in the determined proline concentrations between the honeys directly from Czech and Slovak beekeepers was statistically insignificant ($p > 0.05$). The mean proline concentrations of the analysed unifloral honey samples are presented in the graph.



Graph 1: Mean proline concentrations [mg/kg] in analysed samples of unifloral honeys directly from Czech and Slovak beekeepers.

The determined proline concentrations in the analysed unifloral honeys fully corresponded to the values reported by Persano-Oddo et al. (2004). The lowest proline concentrations were recorded in samples of black locust honeys, for which the lower proline concentration is typical. The proline concentration contributes to the characterisation of unifloral honeys.

Conclusion

The proline concentration is a variable parameter in honey. Despite the observed variability in the determined proline concentrations, this parameter is useful in the assessment of the botanical origin of honey. Among the analysed honey samples (n = 60), proline concentrations lower than 180 mg/kg were detected in 5 samples (8.3 %). These were mostly blossom honeys (n = 4) collected from the markets with declared origin in the Czech Republic and one sample of black locust honey directly from the Slovak beekeeper. Most of the analysed honeys directly from Slovak beekeepers, except for 1 sample of honeydew honey, met the minimum proline concentration according to the Quality Standard for Slovak Honey no. 1/2006. The statistically highly significant difference (p<0.01) detected in the determined proline concentrations between honey samples directly from Czech beekeepers and honeys from the markets with declared origin in the Czech Republic and the highest proportion of honeys with proline concentration lower than 180 mg/kg detected indicates the effect of honey processing to proline concentration and high quality of honeys directly from beekeepers.

Acknowledgements

The study was financially supported by the Institutional Research Support Funds allocated to the Dpt. of Animal Origin Food & Gastronomic Sciences FVHE UVPS Brno.

References

- BELITZ, H-D., GROSCH, W., SCHIEBERLE, P. 2009. *Food Chemistry*, Berlin: Springer.
- BOGDANOV, S. 2009: Harmonized methods of the International Honey Commission. Available at: <http://www.ihcplatform.net/ihc-methods2009.pdf>
- BOGDANOV, S., RUOFF, K., PERSANO ODDO, L. 2004. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie*, vol. 35, p. S4–S17.
- Czech Beekeepers' Association 1999: Quality Standard for Czech Honey No. 1/1999. Available at: <http://www.vcelarstvi.cz/dokumenty-cms/smernicemed.pdf>
- FLANJAK, I., STRELEC, I., KENJERIĆ, D., PRIMORAC, L. 2016. Croatian produced unifloral honey characterized according to the protein and proline content and enzyme activities. *Journal of Apicultural Science*, vol. 60, no. 1, p. 39.
- PERSANO ODDO, L., PIRO, R. 2004. Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, vol. 35, p. S38–S81.
- Slovak Beekeepers' Association 2006: Quality Standard for Slovak Honey No. 1/2006. Available at: https://vcelari.sk/wp-content/uploads/2020/03/NORMA-SLOVENSK%C3%9D-MED_1_2006_-2012.pdf

Contact address: Matej Tkáč, Mgr., Dpt. of Animal Origin Food & Gastronomic Sciences, FVHE UVPS Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H17009@vfu.cz

**Toxigenní profil bakterií *Bacillus cereus sensu lato* izolovaných
z provozoven stravovacích služeb a balených pokrmů**
**Toxigenic profile of *Bacillus cereus sensu lato* bacteria in mass catering
and ready-to-heat meals**

Dorotíková Kateřina, Bogdanovičová Kateřina, Kameník Josef

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

Summary

B. cereus is a well-known causative agent of foodborne bacterial intoxications in particular linked to the restaurant and catering sector. Recently, the toxigenic potential of other *B. cereus sensu lato* (*B. cereus s.l.*) species was also confirmed. Therefore, the present investigation was undertaken to study the incidence and toxigenic potential of *Bacillus cereus* group species in mass catering and ready-to-heat meals. There were 334 samples examined. Recorded incidences of *B. cereus s. l.* in meals from food service facilities and ready-to-heat meal samples were 39.2 % (40/102) and 19.4 % (45/232), respectively. All of the detected isolates ($n = 92$) belonged to *B. cereus* group. However, only 75.0 % were identified as *B. cereus sensu stricto* (*B. cereus s.s.*). A high proportion of isolates (25.0 %) were classified as *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* and *B. mycoides*. Screening of isolates by multiplex polymerase chain reaction revealed the overall distribution of various enterotoxin genes of *nheABC* complex, *hblDAC* complex and nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production as 97.8, 45.7 and 5.4 %, respectively. Since ready-to-heat (RTH) foods are not commonly sterilized by heat treatment before consumption, *B. cereus s. l.* contamination may cause severe food safety problems. Also, there is an urgent need for further data concerning the occurrence of *B. thuringiensis* in food, in particular as *B. thuringiensis* is a commonly used biopesticide.

Keywords: *Bacillus cereus*; *Bacillus thuringiensis*; intoxication; cereulide; food poisoning

Úvod

Skupina *B. cereus* je subdivizí rodu *Bacillus*, také známá jako *B. cereus sensu lato*. Zahrnuje rostoucí seznam geneticky úzce příbuzných grampozitivních, sporotvorných bakterií. Mezi nejvýznamnější druhy této skupiny patří *B. anthracis*, *B. cereus s.s.*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* a *B. toyonensis*. Členové skupiny *B. cereus* jsou široce distribuováni v různých prostředích po celém světě. Mohou růst za velmi proměnlivých podmínek (aerobních i anaerobních) a ve velkém teplotním rozsahu. Díky tvorbě endospor jsou vysoce odolní vůči teplu, pH a vysušení. Jejich inaktivace a odstranění z prostředí potravinářských podniků je téměř nemožné. Většina z těchto druhů je nositelem významného patogenního potenciálu (Messelhäußer a Ehling-Schulz, 2018).

B. cereus s. s. způsobuje dvě odlišné formy gastrointestinálního onemocnění – diarhogenní a emetický syndrom. Diarhogenní syndrom je způsoben termolabilními enterotoxiny – nehemolytickým enterotoxinem, hemolysinem BL a cytotoxinem K (CytK) (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008) a je často spojován s konzumací kontaminovaného masa, omáček a mléčných výrobků (McKillip, 2000). Naproti tomu emetický syndrom vzniká po konzumaci potravin obsahujících již vyprodukovaný emetický toxin cereulid a většinou se pojí s rýžovými pokrmy (McKillip, 2000; Ehling-Schulz *et al.*, 2004). Typickými příznaky alimentární intoxikace jsou nevolnost a zvracení, tyto většinou odezní do 24 hodin. Nicméně, v poslední době přibývá počet hospitalizací a těžkých případů se smrtelnými následky (Messelhäußer a Ehling-Schulz, 2018).

Materiál a metody

Pro zhodnocení výskytu bakterií *B. cereus s. l.* v pokrmech bylo v 6 stravovacích zařízeních odebráno 36 vzorků pokrmů (102 dílčích vzorků), 63 balených hotových pokrmů bylo pořízeno v tržní síti (232 dílčích vzorků). Vzorky pokrmů byly vyšetřovány dle jejich charakteru (příloha, maso, salát apod.) a s ohledem na postup přípravy a úchovy (oddělené/směs). Vzorky pokrmů byly s určitými modifikacemi vyšetřeny kvalitativně na přítomnost bakterie *B. cereus* dle ČSN EN ISO 7932. Samotné kultivaci předcházelo pomnožení v pufované peptonové vodě (Oxoid, UK) při teplotě 37 °C/24 hodin. Následně byly vzorky vyočkovány na Mannitol Yolk Polymyxin B agar (Oxoid, UK) a inkubovány při teplotě 30 °C/18-24 hodin.

Molekulární charakterizace izolátů B. cereus s.l.: K izolaci DNA varem byly použity kolonie narostlé na agaru s glukózou, tryptonem a kvasničným extraktem (po předchozí kultivaci při 30 °C/24 hodin). Vždy výhradně jedna kolonie byla rozsuspendována ve 100 µl sterilního fyziologického roztoku a zahřívána při 100 °C/10 minut, následovalo odstředění při 13 000 rpm/1 min. Pro druhovou identifikaci izolátů a detekci genů kódujících produkci emetického toxinu (cereulid), nehemolytického enterotoxinu (Nhe) a hemolysinu BL (Hbl) byly použity celkem 4 sady multiplex PCR (mPCR). Analýzy byly přizpůsobeny použití PPP Master Mixu (Top-Bio, CZ). Vyhodnocení probíhalo na základě výsledků elektroforézy s použitím 2% agarózového gelu.

Chemotaxonomická charakterizace izolátů B.cereus s. l.: Druhová identifikace izolátů, které nebyly identifikovány jako *B. cereus s. s.* pomocí PCR, byla prováděna za použití metody MALDI-TOF MS, přístroje Microflex™ LT Systém (Bruker Daltonik, DE). Hmotnostní spektra byla zpracována softwarem MALDI BioTyper (verze 3.0; Bruker Daltonik, DE). Výsledky identifikace byly vyjádřeny jako BioTyper log (skóre) indikující podobnost neznámého MALDI-TOF MS profilu s referenčním molekulárním identifikátorem v databázi (Freiwald a Sauer, 2009).

Výsledky

Z celkového počtu 334 vyšetřených dílčích vzorků bylo na přítomnost bakterií skupiny *B. cereus s. l.* pozitivních 85 (25,4 %) vzorků pokrmů. Pokrmy z provozoven stravovacích služeb byly kontaminovány v 39,2 % případů. V balených hotových pokrmech byly bakterie skupiny *B. cereus* zaznamenány s nižší frekvencí, a to téměř v každém pátém vzorku (19,4 %). Z celkových 92 pozitivních izolátů spadajících mezi *B. cereus s. l.* bylo 69 izolátů identifikováno jako *B. cereus s. s.* (75,0 %). Geny kódující produkci alespoň jednoho typu sledovaných toxinů byly detekovány u 69/69 (100 %) izolátů *B. cereus s.s.* Vysoký podíl izolátů (25 %) byl klasifikován metodou MALDI-TOF MS jako *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* a *B. mycoides*. U těchto druhů byl zaznamenán významný patogenní potenciál, 21 z 23 izolátů (91,3 %) bylo nositeli jednoho nebo více genů komplexů diarhogenních enterotoxinů. Větší druhová variabilita byla detekována u vzorků balených hotových pokrmů, kde bylo identifikováno 34,0 % izolátů odlišných druhu *B. cereus s.s.*, oproti 14,3 % v případě pokrmů z provozoven stravovacích služeb. Téměř všechny získané izoláty (97,8 %) nesly gen pro produkci nehemolytického enterotoxinu (Nhe). Enterotoxigenní profil izolátů odhalil přítomnost alespoň jednoho genu komplexu HBL (*hbl*DAC) u 42 izolátů (45,7 %). Izoláty frekventovaně nesly jednotlivé geny komplexu *nhe*ABC a *hbl*DAC současně (44,6 %). Gen kódující produkci toxinu vyvolávající emetickou formu alimentárního onemocnění (*ces*) se vyskytoval u 5/92 izolátů (5,4 %) a to vždy v kombinaci s jedním nebo více geny komplexu NHE.

Diskuse

Dle studie Ngamwongsatit *et al.* (2008) se vyskytují tři geny komplexů HBL a NHE společně vždy v jednom operonu. Nicméně, studie Tewari *et al.* (2015) tyto poznatky spolu s naší studií vyvrací. U námi získaných izolátů bakterií *B. cereus s. l.* byla detekována nepřítomnost jednoho nebo dvou genů v komplexu NHE u 68/90 izolátů (75,6 %). Geny komplexu HBL vykazují nižší variabilitu, u izolátů byly zpravidla detekovány všechny tři geny současně (64,3 %). Přestože je význam *B. cereus s. s.* v oblasti alimentárních onemocnění nesporný, role dalších druhů skupiny *B. cereus* ve vzniku a šíření onemocnění z potravin je dosud nejasná. V rámci naší studie byla zaznamenána vysoká míra detekce dalších druhů spadajících do skupiny *B. cereus*, včetně druhu *B. thuringiensis*. V souvislosti s rostoucí kontaminací potravin tímto druhem a zjištěným vysokým toxigenním potenciálem vyvstává naléhavá potřeba posouzení rizika užívání *B. thuringiensis* jako biopesticidu.

Závěr

Tato studie odhaluje vysoké zastoupení bakterií *B. cereus s. l.* v tepelně opracovaných pokrmech podávaných v rámci provozoven stravovacích služeb, stejně jako v hotových balených pokrmech. V obou případech před samotnou konzumací nedochází k opětovnému důkladnému tepelnému opracování pokrmu, které by vedlo k usmrcení vegetativních forem bakterií. Jak v potravinářských závodech specializujících se na výrobu hotových balených pokrmů, tak ve stravovacích zařízeních je proto nutné důkladné dodržování principů správné výrobní a hygienické praxe, aby se zamezilo výskytu, či se přinejmenším snížilo riziko vzniku alimentárního onemocnění u spotřebitelů.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena grantem IGA VFU Brno 214/2019/FVHE.

Literatura

- ČSN EN ISO 7932, 2005. Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu presumptivních *Bacillus cereus* – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. Praha: ČNI.
- EHLING-SCHULZ, M., M. FRICKER a S. SCHERER, 2004. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Molecular Nutrition & Food Research*. 48(7), s. 479-487.
- FREIWALD, A. a S. SAUER, 2009. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nature Protocols*. 4(5), s. 732-742.
- MCKILLIP, J.L., 2000. Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 77(4), s. 393-399.
- MESSELHÄUBER, U. a M. EHLING-SCHULZ, 2018. *Bacillus cereus* — a Multifaceted Opportunistic Pathogen. *Current Clinical Microbiology Reports*. 5(2), s. 120-125.
- NGAMWONGSATIT, P., W. BUASRI, P. PIANARIYANON, C. PULSRIKARN, M. OHBA, A. ASSAVANIG a W. PANBANGRED, 2008. Broad distribution of enterotoxin genes (*hblCDA*, *nheABC*, *cytK*, and *entFM*) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. *International Journal of Food Microbiology*. 121(3), s. 352-356.
- STENFORS ARNESEN, L.P., A. FAGERLUND a P.E. GRANUM, 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*. 32(4), s. 579-606.
- TEWARI, A., S. P. SINGH a R. SINGH, 2015. Incidence and enterotoxigenic profile of *Bacillus cereus* in meat and meat products of Uttarakhand, India. *Journal of Food Science and Technology*. 52(3), s. 1796-1801.

Kontaktní adresa: Kateřina Dorotíková, Mgr., Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, dorotikovak@vfu.cz

Identification of Lactic Acid Bacteria isolated from food service facilities

**Křepelová Simona, Dušková Marta, Kameník Josef, Bogdanovičová Kateřina,
Dorotíková Kateřina**

*Dpt. of Animal Origin Food & Gastronomic Sciences, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic*

Summary

The aim of this study was to identify lactic acid bacteria (LAB) isolated from samples obtained from food service facilities. Samples were taken from 7 staff canteens (n=97) and 6 school canteens (n=58), especially from the work environment (n = 107) and from the hands of staff (n = 48). Isolates were identified by MALDI-TOF MS. One hundred and twenty strains of LAB were isolated from samples taken in staff canteens (68 environment; 29 hands of staff). The genera Enterococcus (47 %), Lactococcus (25 %) and Leuconostoc (16 %) were among the most frequently identified LAB. The genera Lactobacillus (5 %), Carnobacterium (5 %) and Weissella (3 %) were less common among isolated strains. Seventy-four strains of LAB were isolated in samples taken in school canteens (39 environment; 19 hands of staff). The genera Enterococcus (54 %), Lactococcus (19 %) and Lactobacillus (11 %) were among the most frequently identified strains. The spectrum of bacterial genera does not differ in samples taken in staff canteens and school canteens. Most common was the detection of enterococci, which are considered to be risky because of genes of antibiotic resistance.

Keywords:

Introduction

Lactid acid bacteria (LAB) are commonly found in the environment of food service facilities. LAB can serve as a reservoir of antibiotic resistance genes with follow-up transmission to bacteria of other groups including pathogens (Devirgiliis et al., 2013). One of the possible ways of spreading antibiotic resistance is considered the food chain (EFSA, 2017). The aim of this study was to identify LAB isolated from samples obtained from food service facilities. Part of the study was comparison of occurrence of identified genera of LAB obtained from food service facilities with identified genera of LAB obtained from meat production plants.

Materials and Methods

In this work, we focused on identification of strains of LAB isolated from samples at 13 food service facilities in the Czech Republic (7 staff canteens; 6 school canteens). From staff canteens were removed and examined a total of 327 samples (205 environment; 122 hands of staff). From school canteens were removed and examined a total of 192 (110 environment; 82 hands of staff). We collected samples from the environment (swabs from work surfaces, table desks, cutlery, and the equipment controls) and the hands of the food service staff. Swabs from the environment were taken using sterile abrasive sponges from an area of approximately 100 cm². The hands of staff were examined microbiologically using the Glove-juice method. Basic processing of the samples was carried out in accordance with the standards ISO 7218 (2008), ISO 6887-1 (2008) and ISO 15214 (2000). LAB were cultivated on MRS agar (30 °C/72 h). Isolates with negative oxidase and catalase tests were further identified using a MALDI-TOF mass spectrometer. A standard extraction protocol adapted from Freiwald and Sauer (2009) was followed. Mass spectrometry measurements were performed using an Ultraflex III operated in the linear positive ion mode using FlexControl 3.0 software. Mass spectra were processed using FlexAnalysis and BioTyper software.

Results

Staff canteens

Of the total of examined samples were LAB detected in 97 (29,6 %) cases (68 environment; 29 hands of staff). One hundred and twenty strains of LAB were isolated in the positive samples (87 environment; 33 hands of staff) represented in 6 genera. The spectrum of bacterial genera did not differ significantly in samples from the environment and hands of staff and genera of *Enterococcus*, *Lactococcus* and *Leuconostoc* were among the most frequently identified LAB. *Carnobacterium* and *Weissella* were less common among isolated strains in both groups. Only bacteria of the genus *Lactobacillus* showed a higher percentage of detection in samples from the hands of staff (Table 1). The list of individual of genera and strains are shown in detail in Table 1.

School canteens

Of the total of examined samples were LAB detected in 58 (30 %) cases (39 environment; 19 hands of staff). Seventy-four strains of LAB were isolated in the positive samples (49 environment; 25 hands of staff) represented in 7 genera. The genera *Enterococcus* and *Leuconostoc* were among the most frequently identified LAB in samples from the environment and hands of staff. The genera *Lactococcus* and *Carnobacterium* showed higher detection in samples from the environment of school canteen than in samples from hands of staff. In contrast, the genus *Lactobacillus* was detected to a lesser extent in samples from the environment of school canteens than in samples from staff's hands. The genera *Weissella* and *Carnobacterium* were detected only in samples from the environment of school canteens and the genus *Pediococcus* was detected only in one sample from staff's hands. The list of individual of genera and strains are shown in detail in Table 1.

Comparison of occurrence of identified genera of LAB obtained from food service facilities with identified genera of LAB obtained from meat production plants

LAB were detected in 155 samples obtained from food service facilities (n=13; 97 samples from staff canteens; 58 samples from school canteens). One hundred and ninety four strains of LAB were isolated from the positive samples (136 environment; 58 hands of staff) represented in 7 genera. In case of meat production plants (n=2), LAB were detected in 78 samples (67 environment; 11 hands of staff). One hundred twenty-five strains of LAB were isolated from the positive samples (113 environment; 12 hands of staff) represented in 8 genera. For comparison was used a database of samples from Department of Animal Origin Food and Gastronomic Sciences. The list of individual genera (%) are shown in Table 2.

Discussion

In this study the microbial situation was monitored in terms of the occurrence of LAB in the environment and hands of staff in seven staff canteens and six school canteens. The results showed that the most frequently identified bacterial genera, both in staff canteens and in school canteens were lactococci and enterococci, which occur as part of the natural intestinal microflora of animals, including humans (Baluka et al., 2015). Some enterococci, especially *E. faecalis*, *E. faecium* and *E. durans*, are considered to be bacteria of fecal origin (Dušková et al. 2016; Švec et al., 2014). In our study were most often found these species as well (Table 1). Enterococci represented risk in terms of antibiotic resistance, as many study confirmed (Pesavento et al. 2014; Pavia et al., 2000). The authors state that enterococci should be considered not only as potential pathogens, but also as reservoirs of genes encoding antibiotic resistance, which can be further transmitted to other pathogenic and non pathogenic bacteria (Pesavento et al., 2014). The spectrum of bacterial genera, for samples from food service facilities and samples from meat processing plants showed significant differences. The genera *Lactobacillus* a *Leuconostoc* were most often detected in samples from meat processing plants

than in samples from food service facilities. The genera *Pediococcus* and *Weissella* showed higher detection (Table 2). Whether this higher incidence is caused by a higher incidence of this bacteria in the in the environment of meat processing plants or if it comes from feedstock is not entirely clear, because LAB occur naturally in the plant environment. (Vasilopoulos et al.,2010; Dušková et al., 2015)

Conclusion

The microbial status in food service facilities can be considered as potentially risky with a focus on the occurrence of potentially resistant LAB. Due to the possible danger of follow-up transmission of antibiotic resistance genes to pathogenic bacteria and non-pathogenic bacteria of the intestinal microflora, monitoring of the occurrence of LAB in food service facilities is the first important step to ensure the quality and safety of the food served. Determination of antimicrobial resistance of identified strains will be the subject of further research.

Table 1: Identification of lactic acid bacteria from staff canteens and from school canteens.

Staff canteens					
Genera	Environment		Hands of staff		Representation of specific strains (%)
	No. of strains	%	No. of strains	%	
<i>Enterococcus</i>	45	52	11	33	<i>E. faecalis</i> (31); <i>E. faecium</i> (25); <i>E. casseliflavus</i> (23); <i>E. mundtii</i> (7); <i>E. durans</i> (5); <i>E. gilvus</i> (5); <i>E. devriesei</i> (2); <i>E. gallinarum</i> (2)
<i>Lactococcus</i>	20	23	10	31	<i>Lc. lactis</i> (87); <i>Lc. garvieae</i> (13)
<i>Leuconostoc</i>	14	16	5	15	<i>Leuc. Mesenteroides</i> (74); <i>Leuc. lactis</i> (21); <i>Leuc. citreum</i> (5)
<i>Carnobacterium</i>	4	5	2	6	<i>C.maltaromaticum</i> (50); <i>C. divergens</i> (50)
<i>Lactobacillus</i>	2	2	4	12	<i>Lb. Curvatus</i> (16,6); <i>Lb. lactis</i> (16,6) <i>Lb. Paraplantarum</i> (16,6); <i>Lb. fructivorans</i> (16,6); <i>Lb.Sakei</i> (16,6) <i>Lb. homohiochii</i> (16,6);
<i>Weissella</i>	2	2	1	3	<i>W. viridescens</i> (100)
Total LAB	87		33		
School canteens					
<i>Enterococcus</i>	26	53	14	56	<i>E. faecalis</i> (35); <i>E. casseliflavus</i> (30); <i>E. faecium</i> (18); <i>E. gallinarum</i> (15) <i>E. durans</i> (2)
<i>Lactococcus</i>	13	27	1	4	<i>Lc. lactis</i> (64); <i>Lc. garvieae</i> (36)
<i>Leuconostoc</i>	4	8	2	8	<i>Leuc. mesenteroides</i> (83); <i>Leuc. lactis</i> (17)
<i>Carnobacterium</i>	3	6	-	-	<i>C. divergens</i> (100)
<i>Lactobacillus</i>	1	2	7	28	<i>Lb. paraplantarum</i> (25); <i>Lb. gravieae</i> (25); <i>Lb. lactis</i> (25); <i>Lb. sakei</i> (25)
<i>Weissella</i>	2	4	-	-	<i>W. cibaria</i> (50); <i>W. hellenica</i> (50)
<i>Pediococcus</i>	-	-	1	4	<i>P. pentosaceus</i> (100)
Total LAB	49		25		
<i>E. Enterococcus</i> <i>Lc. Lactococcus</i> , <i>Leuc. Leuconostoc</i> , <i>C. Carnobacterium</i> , <i>Lb. Lactobacillus</i> <i>W. Weissella</i> , <i>P. Pedicoccus</i>					

Table 2: The comparison of occurrence (%) of lactic acid bacteria from food service facilities occurrence of lactic acid bacteria with production plants

Genera	Meat production plants (Environment; Hands of staff)		Food service facilities (Environment; Hands of staff)	
	No. of strains	%	No. of strains	%
<i>Enterococcus</i>	8	6	96	49
<i>Lactococcus</i>	12	10	44	23
<i>Leuconostoc</i>	40	32	25	13
<i>Carnobacterium</i>	1	< 1 %	9	5
<i>Lactobacillus</i>	47	38	14	7
<i>Weissella</i>	9	7	5	3
<i>Pediococcus</i>	7	6	1	< 1 %
<i>Streptococcus</i>	1	< 1 %	-	-
Total LAB	125		194	

References

- BALUKA, S. A., MILLER, R., KANEENE, J. B. (2015). Hygiene practices and food contamination in managed food service facilities in Uganda. *African Journal of Food Science*, 9(1), pp. 31-42.
- DEVIRGILIIS, C., ZINNO, P., PEROZZI, G. (2013): Update on antibiotic resistance in foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species. *Frontiers in Microbiology*, 4, p. 301.
- DUŠKOVÁ, M., KAMENÍK, J., ŠEDO, O., ZDRÁHAL, Z., SALÁKOVÁ, A., KARPÍŠKOVÁ, R., LAČANIN, I. (2015). Survival and growth of lactic acid bacteria in hot smoked dry sausages (non-fermented) with and without sensory deviations. *Food Control*, 50, pp. 804–808.
- DUŠKOVÁ, M., KAMENÍK, J., LAČANIN, I., ŠEDO, O., ZDRÁHAL, Z., (2016). Lactic acid bacteria in cooked hams – Source of contamination and chances of survival in the product. *Food Control*, 61, pp. 1-5.
- EFSA (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* 2017; 15 (12): 50.
- FREIWALD, A., SAUER, S. (2009). Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nature Protocols*, 4, pp. 732-742.
- PAVIA, M., NOBILE, C. G. A., SALPIETRO, L., ANGELILLO, I. F., (2000). Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. *Journal of Food Protection*, 63, pp. 912-915.
- PESAVENTO, G., CALONICO, C., DUCCI, B., MAGNANINI, A., LO NOSTRO, A. (2014): Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. *Food Microbiology*, 41, pp. 1-7.
- ŠVEC, P., FRANZ, C. M. A. P. (2014): The family *Enterococcaceae*. In: Holzappel, W. H., Wood, B. J. B. (eds.): *Lactic Acid Bacteria. Biodiversity and Taxonomy*. Wiley Blackwell, 1. vydání, Chichester, UK, p. 606
- VASILOPOULOS, C., DE MAERE, H., DE MEY, E., PAELINCK, H., DE VUYST, L., LEROY, F. (2010). Technology-induced selection towards the spoilage microbiota of artisan-type cooked ham packed under modified atmosphere. *Food Microbiology*, 27, pp. 77-84.

Contact adress: Simona Křepelová, Ing. Mgr, MBA Mgr., Dpt. of Animal Origin Food & Gastronomic Sciences, FVHE UVPS Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H17008@vfu.cz

Výskyt vírusu hepatitídy E v potravinovej komodite

The occurrence of hepatitis E virus in food commodity

¹Dudášová Katarína, ¹Jacková Anna, ¹Šalamúnová Slavomíra, ²Molnár Ladislav,
³Ciberej Juraj, ¹Vilček Štefan

¹Ústav epizootológie a preventívnej veterinárskej medicíny, ²Klinika vtákov, exotických a voľne žijúcich zvierat,

³Ústav pre chov a choroby zveri a rýb,

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Slovenská republika

Summary

Hepatitis E virus (HEV) is one of the major pathogens causing viral hepatitis E worldwide. In developed countries, cases of HEV infections are sporadic and are mainly related to the consumption of inadequately heat-treated food of animal origin. The mammalian genotypes HEV-3 and HEV-4 are zoonotic, the main reservoir species are wild boars and domestic pigs. The aim of our study was the detection of hepatitis E virus in wild boar liver and phylogenetic analysis of obtained nucleotide sequences. We analyzed a total of 110 samples from wild boars of two age categories, ≤ 6 months ($n = 78$) and ≥ 2 years ($n = 32$). The presence of HEV RNA was analyzed by RT-PCR, the target region was part of the ORF1 genome of HEV. The overall incidence of HEV was 12,73%. In the young animals category (≤ 6 months) were 14,10% positive samples, the adult category (≥ 2 years) was less prevalent with 9,38% positive samples. Phylogenetic analysis revealed the presence of the zoonotic genotype HEV-3, indicating a potential risk to game consumers.

Keywords: hepatitis E virus; wild boar; liver tissue

Úvod

Vírus hepatitídy E (HEV) patrí medzi závažné patogény spôsobujúce vznik vírusovej hepatitídy a predstavuje celosvetový problém. HEV je neobalený vírus s lineárnym ssRNA genómom pozitívnej polarita pozostávajúcim z troch otvorených čítacích reťazcov (ORF1 – ORF3). Podľa súčasnej taxonómie ICTV (Medzinárodný výbor pre taxonómiu vírusov) patrí do čeľade *Hepeviridae*, ktorá sa člení na 2 rody: *Orthohepevirus* a *Piscihepevirus*. Rod *Orthohepevirus* zahŕňa všetky cicavce a vtáče izoláty HEV a člení sa na 4 druhy (A – D) [1]. Izoláty infikujúce populácie diviakov lesných patria do druhu *Orthohepevirus A*, do ktorého patrí 7 genotypov (HEV-1 – HEV-7). Genotypy **HEV-3 a HEV-4 sú zoonotické**, infikujú diviaky, ľudí, domáce ošípané, hovädzí dobytok, ovce, kozy, psy, zajace a jeleňovitú zver [2] a genotypy HEV-5 a HEV-6 boli doposiaľ izolované od diviakov len na ázijskom kontinente [3]. HEV-1 a HEV-2 boli izolované iba od humánnych pacientov [4], genotyp HEV-7 bol izolovaný zo vzoriek ťavy jednohrbej ako aj od humánneho pacienta [5].

Genotypy HEV-3 a HEV-4 sa vyskytujú prevažne v rozvinutých krajinách, spôsobujú sporadické prípady hepatitídy E u ľudí spájané s konzumáciou tepelne nedostatočne spracovaného mäsa a produktov živočíšneho pôvodu, s cestovaním do endemických krajín alebo s profesionálnou expozíciou (priamy kontakt), pričom k šíreniu vírusu v populácii zvierat dochádza fekálno-orálnou cestou [6]. Zoonotický prenos HEV bol dokázaný viacerými štúdiami. V Španielsku bolo diviacie mäso potvrdené ako zdroj infekcie zistením identických sekvencií HEV u ôsmich členov rodiny a vo zvyškoch mäsa, ktoré skonsumovali [7]. Podobne sa aj v ďalšom prípade preukázalo, že sekvencie HEV získané z pečene diviaka sú totožné so sekvenciami izolovanými od dvoch pacientov, ktorí ju jedli [8]. Diviaky spolu s domácimi ošípanými sú považované za hlavný **rezervoárový druh** zvierat HEV a predstavujú riziko infekcie nielen pre ľudskú populáciu, ale aj pre ostatné domáce a voľne žijúce zvieratá.

Cieľ práce

Cieľom tejto práce bola detekcia výskytu HEV v populácii diviakov z poľovných revírov vo východnej časti Slovenskej republiky a následná fylogenetická analýza získaných sekvencií za účelom genetickej typizácie HEV a odhalenia rizika nákazy pre konzumentov diviny.

Materiál a metodika

Na analýzu sme použili vzorky pečeneového tkaniva diviakov lesných (*Sus scrofa*) (n=110) dvoch vekových kategórií: mladých jedincov do 6 mesiacov veku (n=78) a dospelých jedincov starších ako 2 roky (n=32). Vek jedincov bol odhadnutý skúsenými poľovníkmi. Prvým krokom analýzy bola izolácia RNA použitím TRIzol reagent (Ambion) podľa protokolu od výrobcu. Na syntézu komplementárnej DNA (cDNA) sme použili RevertAid reverznú transkriptázu (Thermo Fisher Scientific) a gén špecifický primer (ORF1a1). Ďalším krokom bola nested polymerázová reťazová reakcia. Na amplifikáciu časti ORF1 genómu HEV o veľkosti 287 bp sme použili primery ORF1s1/ORF1a1 a ORF1s2/ORF1a2 a Taq DNA polymerázu (BioLabs) [9]. Na vyhodnotenie výsledkov nested RT-PCR sme využili agarózovú elektroforetickú separáciu PCR produktov. Po ofarbení farbivom Gel-Red (Biotum) sme amplikóny vizualizovali pomocou zobrazovacieho zariadenia Gel Doc EZ (BIO-RAD) s príslušným softvérom. Získané PCR produkty boli sekvenované komerčnou firmou (Microsynth) použitím Sangerovej metódy. Fylogenetickú analýzu nukleotidových sekvencií sme vykonali v programoch DNASTAR (Lasergene) a MEGA6. Všetky použité kmene, ako aj referenčné kmene HEV sme získali z GenBank databázy NCBI.

Výsledky a diskusia

Celkový výskyt RNA HEV u diviakov predstavoval 12,73%. V kategórii mladých jedincov sme detegovali RNA HEV na úrovni 14,10% a menší výskyt bol zaznamenaný u dospelých jedincov – 9,38% (Tabuľka 1). Fylogenetická analýza nami získaných HEV sekvencií preukázala, že všetky patrili do zoonotického genotypu HEV-3 a ich vzájomná nukleotidová (nt) podobnosť bola v rozmedzí 83,1 – 100%.

Tabuľka 2: Výskyt HEV u diviakov na Slovensku.

	Počet (n)	HEV+ (%)	HEV- (%)
Mladé jedince	78	11 (14,10%)	67 (85,90%)
Dospelé jedince	32	3 (9,38%)	29 (90,62%)
Celkovo	110	14 (12,73%)	96 (87,27%)

V európskych krajinách bol zaznamenaný výskyt RNA HEV v rôznych typoch vzoriek diviaka lesného na úrovni od 0 po 68,2% [10]. Približne rovnaký výskyt HEV vo vzorkách pečeni, ako v našej práci, bol zaznamenaný v štúdií z Nemecka (14,9%) [11] a Maďarska (10,7%) [12], vyšší v Taliansku (33,5%) [13] a nižší vo Francúzsku (5,8%) [14], pričom sekvencie HEV zo všetkých týchto krajín sa začlenili do genotypu HEV-3.

Záver

Výsledky tejto práce potvrdili prítomnosť a cirkuláciu zoonotického genotypu HEV-3 medzi diviakmi z poľovných revírov vo východnej časti Slovenskej republiky a poukazujú na možné riziko transmisie HEV z diviakov na ostatné voľne žijúce a domáce druhy zvierat. Naše výsledky upozorňujú na možnosť infekcie ľudí týmto vírusom prostredníctvom konzumácie tepelne neopracovaných potravín živočíšneho pôvodu, predovšetkým diviny a prostredníctvom priameho kontaktu s infikovanými zvieratami.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla vĎaka podpore projektu APVV-15-0415.

Literatúra

PURDY, M.A.; HARRISON, T.J.; JAMEEL, S.; MENG, X.J.; OKAMOTO, H.; VAN DER POEL, W.H.M.; SMITH, D.B. and ICTV Report Consortium. 2017 ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae. *Journal of General Virology*. 2017, vol. 98, no. 11, s. 2645-2646.

KENNEY, S.P. The current host range of Hepatitis E. *Viruses*. 2019, vol. 11, no. 5, s. 452.

SATO, Y.; SATO, H.; NAKA, K.; et al. A nationwide survey of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars in Japan: identification of boar HEV strains of genotypes 3 and 4 and unrecognized genotypes. *Archives of Virology*. 2011, vol. 156, no.8, s. 1345-1358.

PURCELL, R.H.; EMERSON, S.U. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *Journal of Hepatology*. 2008, vol. 48, no. 3, s. 494-503.

LEE, G.H.; TAN, B.H.; PURDY, M.A.; et al. Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology*. 2016, vol. 150, no. 2, s. 355-357.

DALTON, H.R.; KAMAR, N.; IZOPET, J. Hepatitis E in developed countries: current status and future perspectives. *Future Microbiology*. 2014, vol. 9, no. 12, s. 1361-1372.

RIVERO-JUAREZ, A.; FRIAS, M.; MARTINEZ-PEINADO, A.; RISALDE, M.A.; et al. Familial Hepatitis E outbreak linked to wild boar meat consumption. *Zoonoses and Public Health*. 2017, vol. 64, no. 7, s. 561–565.

MATSUDA, H.; OKADA, K.; TAKAHASHI, K.; MISHIRO, S. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *Journal of Infectious Diseases*. 2003, vol. 188, no. 6, s. 944.

ERKER, J.C.; DESAI, S.M.; MUSHAHWAR, I.K. Rapid detection of Hepatitis E virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction using universal oligonucleotide primers. *Journal of Virological Methods*. 1999, vol. 81, no. 1-2, s. 109-13.

PAVIO, N.; DOCEUL, V.; BAGDASSARIAN, E.; JOHNE, R. Recent knowledge on hepatitis E virus in Suidae reservoirs and transmission routes to human. *Veterinary Research*. 2017, vol. 48, no. 1, s. 78.

SCHIELKE, A.; SACHS, K.; LIERZ, M.; et al. Detection of hepatitis E virus in wild boars of rural and urban regions in Germany and whole genome characterisation of an endemic strain. *Virology Journal*. 2009, vol. 6, no. 58.

FORGÁCH, P.; NOWOTNY, N.; ERDÉLYI, K.; et al. Detection of hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary. *Veterinary Microbiology*. 2010, vol. 143, no. 2-4, s. 106-116.

MONTAGNARO, S.; DE MARTINIS, C.; SASSO, S.; et al. Viral and Antibody Prevalence of Hepatitis E in European Wild Boars (*Sus scrofa*) and Hunters at Zoonotic Risk in the Latium Region. *Journal of Comparative Pathology*. 2015, vol. 153, no. 1, s. 1-8.

LHOMME, S.; TOP, S.; BERTAGNOLI, S.; DUBOIS, M.; et al. Wildlife reservoir for Hepatitis E virus, Southwestern France. *Emerging Infectious Diseases*. 2015, vol. 21, no. 7, s. 1224-1226.

Kontaktná adresa: Katarína Dudášová, MVDr., Ústav epizootológie a preventívnej veterinárskej medicíny, UVLF Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika, katarina.grucova@student.uvlf.sk

Salt stress survival of persistent *Listeria monocytogenes* from food producing plant

^{1,2}Pospíšilová Lucie, ¹Gelbíčová Tereza, ^{1,2}Karpíšková Renáta

¹Department of Bacteriology, Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

²Dpt. of Animal Origin Food & Gastronomic Sciences, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

Summary

Listeria monocytogenes is an ubiquitous bacterium that may occur in food processing plants and some final products. Ability to grow in low temperature, tolerance to high NaCl concentrations together with the ability to persist in the processing plants for several years are important factors contributing to contamination of RTE (ready to eat) food. The aim of this study was to determine the salt tolerance of four persistent strains of *L. monocytogenes* obtained from one food producing plant. *L. monocytogenes* strains of ST204 were tested in three different concentrations of NaCl at temperature of 10 °C for 15 days. The number of *L. monocytogenes* CFU in nutrient broth containing 3.5% of NaCl increased after 6 days nearly by five logarithms. In concentration of 15% NaCl the number of *L. monocytogenes* decreased by 1-2 logarithms during 15 days. All tested strains showed high salt tolerance, helping them to survive in high salt brine used in cheese production.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; persistence; NaCl; stress conditions

Introduction

Listeria monocytogenes is an opportunistic foodborne pathogen ubiquitously present in various environments and tolerant to extreme environmental stresses. It is well known that *L. monocytogenes* are able to survive in the presence of high salt concentrations (up to 10% NaCl) (Ferreira et al., 2014). Together with the ability to persist in the processing plants for several years these important factors represent a continual risk of contamination within a manufacturing or processing environment contributing to contamination of RTE (ready to eat) food (Buchanan et al, 2017).

The salt in cheese processing has different functions, such as reduction of curd moisture, inhibition of undesirable microorganisms, modification in flavor and texture and contribution to cheese ripening. Common industry practice used in cheese producing plants is salting of cheeses by immersion in brine. Although storage in brine is thought to cause a decrease in the populations of undesirable microorganisms, there is great concern that the brine can also serve as a reservoir for certain salt-tolerant pathogens as is *L. monocytogenes* (Durmaz et al., 2009). The aim of this study was to determine the salt tolerance of four persistent strains of *L. monocytogenes* obtained from one cheeses producing plant.

Materials and Methods

Four persistent strains of *L. monocytogenes* sequence type ST204 of different isolation time and origin source (Table 1) obtained from one producing plant for ripened cheeses was selected for this study.

Table 1: Characteristics of tested strains of *Listeria monocytogenes*.

Strain ID	Year of isolation	Source of isolation	Serotype	Sequence type
LV544	2015	Cheese	1/2a	ST204
LV877	2008	Cheese	1/2a	ST204
LV1253	2019	Rinsing water	1/2a	ST204
LV1263	2019	Equipment	1/2a	ST204

From a 24-hour culture on blood agar (LabMediaServis, s.r.o., CZ) a default bacterial suspension of density of 1 Mc Farland and a series of ten-fold dilutions were prepared in saline solution. The initial concentration of the tested bacterial suspension was log 3-4 CFU/ml. Nutrient broth (BD, Difco™, USA) supplemented by 3.5%, 7.5% and 15% of NaCl were used as growth medium. These concentrations of NaCl were selected due to model experiments where 3.5% NaCl represents the salt concentration in cheeses at ripening and 15% NaCl is applied in salt brines. Incubation was performed in a RTS bioreactors (Biosan, LV) at temperature of 10 °C for 15 days. At the beginning of the experiment and at regular intervals for 15 days, detection and enumeration of *L. monocytogenes* was performed from inoculated tubes containing nutrient broth with different concentrations of NaCl (ČSN EN ISO 11290-1, 2, 2017).

Results and Discussion

Salt stress survival of all four tested persistent strains in nutrient broth with addition of 3.5%, 7.5% and 15% of NaCl at temperature of 10 °C for 15 days has been demonstrated. The survival of *L. monocytogenes* at different concentrations of NaCl are shown in Figure 1. The survival of *L. monocytogenes* in nutrient broth with content of 3.5% NaCl shows increasing number of *L. monocytogenes* nearly by five logarithms after six days and then they stay stable until the end of experiment. The number of *L. monocytogenes* in nutrient broth containing 7.5% of NaCl increased also nearly by five logarithms, but the increasing was slower compared to 3.5% NaCl and the number of *L. monocytogenes* was visibly increased after 4 days.

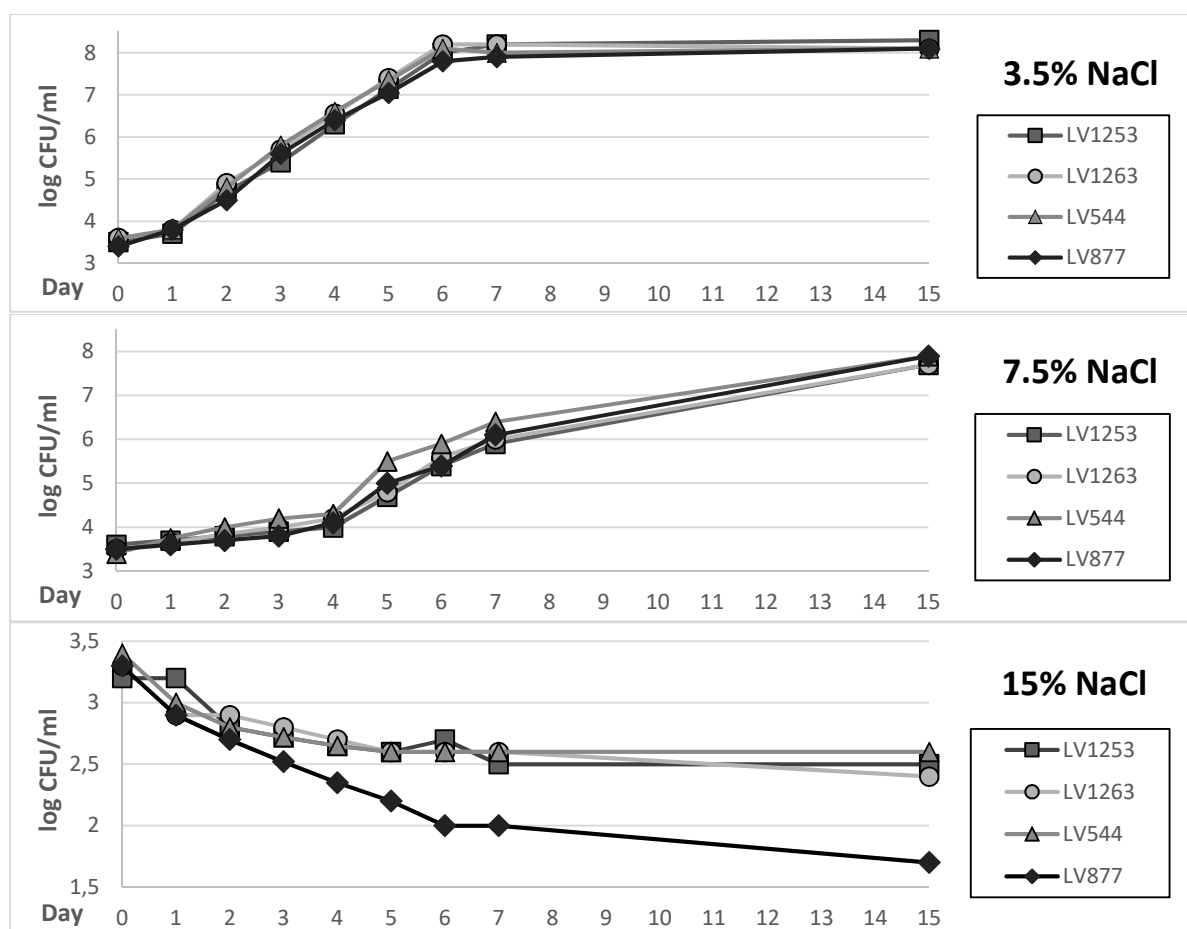


Figure 1. Survival of tested *L. monocytogenes* strains of ST204 at 3.5%; 7.5% and 15% of NaCl. Decreasing of number of *L. monocytogenes* in nutrient broth with content of 15% NaCl by one logarithm for three of tested strains was observed after seven days and then they stayed stable.

The counts of strain LV877 isolated from cheese (year of isolation 2008) after two days were decreasing faster than the others and decreased nearly by two logarithms. This strain shows lower resistance to high salt concentrations than other three ones. It could be due to better adaptation of strains (LV1253, LV1263, LV544) to salt stress conditions in the processing environment. The study of Durmaz et al. (2009) focusing on the growth of *L. monocytogenes* in model of cheese brines with 13%, 15% and 19% concentration of NaCl at temperature of 4 °C also confirmed the tolerance of *L. monocytogenes* to high salt concentrations. After 15 days the number of *L. monocytogenes* in brine with concentration 13% NaCl also decreased by one logarithmic order. In brine with concentration of 13% NaCl the number of *L. monocytogenes* decreased by two logarithmic order and in brine with the highest concentration of NaCl (19%) the number of *L. monocytogenes* after 7 days decreased by four logarithmic orders and then has become undetectable by plate counting (Durmaz et al., 2009). In other study focused on growth of *L. monocytogenes* in cheese during ripening three NaCl concentrations (8, 12, and 15%) were used and all significantly affected the inactivation of *L. monocytogenes* up to the detection limit by plate counting at the final stage of ripening (Shahbazi and Shavisi, 2018).

Conclusion

Model experiment showed the ability of tested persistent strains of *L. monocytogenes* ST204 to survive at high concentrations of NaCl used in cheese production technologies.

Acknowledgement

This study was funded by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (grant no. QK1910121).

References

- FERREIRA, V.; WIEDMANN, M.; TEIXEIRA, P.; STASIEWICZ, M. J. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of Food Protection*, 2014, vol. 77, no. 1, pp. 150–170. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-150>
- BUCHANAN, R. L.; GORRIS, L. G. M.; HAYMAN, M. H.; JACKSON, T. C.; WHITING, R. C. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 2017, vol. 75, pp. 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>
- DURMAZ, H.; AYGUN, O; ARDIC, M. The effect of cheese brine concentrations on survival of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 2009, vol. 7, no. 3–4, pp. 11–13.
- SHAHBAZI, Y. AND SHAVISI, N. Fate of *Listeria monocytogenes* during ripening of Iranian traditional Koozehcheese made from raw ewe's milk. *Journal of Food Quality and Hazards Control*. 2018, vol. 5, no. 3, pp. 109-115. DOI: 10.29252/jfqhc.5.3.109

Contact address: Lucie Pospíšilová, Ing., Veterinary Research Institute, Hudcova 296/70, 621 00 Brno, pospisilova.l@vri.cz

Avian pathogenic *Escherichia coli* from human urinary infection-their ability to cause chicken embryo lethality

^{1,2,3}Kučerová Dana, ¹Kubelová Michaela ¹Vacková Zdenka, ¹Kolářková Ivana,
^{1,2}Karpíšková Renáta

¹Department of Bacteriology, Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

²Dpt. of Animal Origin Food & Gastronomic Sciences, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

³Central Veterinary Administration of the State Veterinary Administration for South-Moravian region,
Czech Republic

Summary

Urethritis, ureteritis, cystitis, and pyelonephritis are serious diseases of the human urinary tract of bacterial origin. One of the most common causes of these infections are uropathogenic Escherichia coli (UPEC). Some UPEC strains are characterized by the presence of the same virulence factors as the strains of Escherichia coli pathogenic for poultry (APEC). The importance of sharing virulence factors between APEC and UPEC, including their mutual transmission, is discussed. The aim of the study was to characterize UPEC strains and determine if they are able to cause lethality of chicken embryos. Sixty one isolates from human uroinfections were selected for the study. The isolates were tested for selected genes encoding APEC virulence predilection factors, serogroup and phylogroups were also determined. Lethal tests on chicken embryos were performed on isolates with APEC characteristics. The results confirmed actual ability of UPEC isolates to cause chicken embryo lethality.

Keywords: APEC; UPEC; embryo lethality; serogroup; phylogroup

Introduction

Escherichia coli (*E. coli*) causes serious diseases of the urinary system in the human population such as cystitis, ureteritis, urethritis, or pyelonephritis. The source of these uropathogenic *E. coli* (UPEC) in humans is currently not well defined. However, UPEC isolates are strikingly similar in some virulence factors to isolates from poultry colibacillosis (Mellata et al., 2013). Previous studies have also demonstrated the ability of avian pathogenic *E. coli* (APEC) to cause urinary tract infections in a mouse experimental model (Mellata et al., 2018). In some outbreaks of urinary infections in Denmark, Canada and the USA, foodstuffs have been identified as a source of disease (Liu, 2018). Therefore, sharing of virulence factors between APEC and UPEC, their mutual transfer and possible origin of human UPEC in poultry meat is currently being discussed.

To be able to compare APEC and UPEC isolates with each other, we need to know the true ability of the isolates to cause disease in poultry. Lethality tests on one day-old chicks (Dho and Lanfond, 1984) can be used for this purpose, but a much better alternative to respect the principle 3 R (reduction, replacement, refinement) (Russell and Burch, 1959) is the use of lethality tests on chicken embryos (Trotter and Schouler, 2019).

The aim of this study was to detect genes typical for APEC in isolates from human uroinfections and subsequently to demonstrate the ability of UPEC isolates to cause lethal infection in chicken embryos.

Materials and Methods

A total of 61 *E. coli* isolated from urine samples of patients with uroinfection have been examined in this study. Isolates were obtained during 2019 in cooperation with clinical laboratory IFCOR Brno. Isolates were subjected to PCR detection of virulence predilection factors encoded by *iutA*, *hlyF*, *ompT*, *iss*, *iroN* genes (Johnson et al., 2008). Isolates carrying

all 5 genes simultaneously were determined as APEC and were selected for further characterisation. Using PCR, the detection of additional virulence factors, encoded by the genes *frzorf4*, *papC*, *felA*, *papGI*, *papGII*, *papGIII*, was performed (Schouler et al., 2012). Serogroups were determined by agglutination with a number of 70 somatic antisera (Salajka et al., 1992), serogroups O1-A and O11 were detected by BioMark HD Fuidigm (Low et al., 2016). Phylogroups were determined using method described by Clermont et al. (2013). The ability of isolates to cause infections in poultry was investigated using lethality tests on chicken embryos (Trotter and Schouler, 2019).

Results and discussion

Sixty one urine samples from patients suffering from UTIs have been collected. Age of the patients ranged between 1 to 88 years, the most patients (48/61; 79%) were female. The presence of the *iutA* gene was detected in a total of 11/61 (18%) isolates. However, all these isolates lacked the *iss* gene, most of them 9/11 (82%) did not carry *hlyF* and *ompT* and the *iroN* gene was detected in only 4/11 (36%) isolates. In a large part of human UPEC isolates 41/61 (67%) of the *iutA* gene have not been detected, so in these isolates the presence of genes *hlyF*, *iroN*, *iss*, *ompT* have not been tested. APEC predilection factors (*iutA*, *hlyF*, *iroN*, *iss*, *ompT*) (Johnson et al., 2008), were detected simultaneously in 9 of 61 (15%) UPEC isolates. Detailed strain characteristics are shown in Table 1.

A total of 6 genes encoding additional virulence factors have been tested in 9 selected strains. Presence of fimbriae P (F11), encoded by the genes *papC*, *felA*, *papGI*, *papGII*, *papGIII* (Schouler et al., 2012), was detected. Fimbriae P (F11), allowing adhesion to mucous membranes of infected organs, were found in 6 isolates (67%). Isolates with incomplete fimbria P (F11) (13658, 13665) show a lower ability to cause chicken embryo lethality. *FRZorf4* gene, involved in carbohydrate metabolism and enabling bacteria to survive under stress conditions, was detected in 2 isolates. Both isolates were highly pathogenic for chicken embryos. Most of isolates (6/9; 67%), assigned to phylogroup B2. All of them were pathogenic to chicken embryos. Lethality tests have clearly demonstrated the ability of UPEC strains with APEC characteristics to cause the lethality of chicken embryos.

Table 1: Characteristic of APEC isolates by serogroup, phylogroup, virulence factors and chicken embryo lethality.

Isolate number	Serogroup	Phylogroup	Additional virulence factors (encoded by the genes)	Chicken embryo lethality*
13658	O?	D/E	ND	6
13660	O2	B2	<i>papC</i> , <i>felA</i> , <i>papGII</i> <i>FRZorf4</i>	1
13665	O11	A	<i>papC</i> , <i>papGIII</i>	5
13667	O1-A	B2	<i>papC</i> , <i>felA</i> , <i>papGII</i>	2
13670	O1-A	B2	<i>papC</i> , <i>felA</i> , <i>papGII</i>	3
13671	O1-A	B2	<i>papC</i> , <i>felA</i> , <i>papGII</i>	1
13681	O2	B2	<i>papC</i> , <i>felA</i> , <i>papGII</i>	0
13697	O2	B2	<i>papC</i> , <i>felA</i> , <i>papGII</i>	2
13703	O114	F	<i>FRZorf4</i>	1

* number of surviving embryos out of 10.

O? the isolate does not belong to any of the 72 tested serogroups.

ND additional virulence factors were not detected

Conclusion

Based on these results, we can conclude that human UPEC isolates are not unique to humans. We can find isolates with APEC characteristic between isolates from human UTIs and also these UPEC isolates

are able to cause chicken embryo lethality. Mutual transmission of APEC and UPEC between human and poultry could be possible, but the transmission paths are still unknown and without this information APEC cannot be considered as zoonotic and a source of UPEC in human population.

Acknowledgements

Thanks the Clinical Laboratory IFCOR Brno for providing human *E. coli* isolates. Study was partly supported by the internal mobility agency IGA VFU Brno number 2019-FVHE-16. Lethality tests on chicken embryos were carried out in National Institute for Agricultural Research, INRA, Nouzilly, France.

References

- CLERMONT, O., CHRISTENSON J. K., DENAMUR, E.; et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep.* 2013, vol 5, p. 58-65.
- DHO, M., LAFONT, J. P. Adhesive properties and iron uptake ability in *Escherichia coli* lethal and nonlethal for chicks. *Avian Dis.* 1984, vol. 28, p. 1016–25.
- JOHNSON, T. J., WANNEMUEHLER, Y., DOETKOTT, C., JOHNSON, S. J., ROSENBERGER, S. C., NOLAN, L. K. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *J Clin Microbiol.* 2008, vol. 46, p. 3987–3996.
- LIU, C. M., STEGGER, M., AZIZ, M., et. Al. *Escherichia coli* ST131-H22 as a Foodborne Uropathogen. *Am Soc Mikrobiol.* 2018, vol. 9, p. 470–18.
- LOW, H., CHAN, S-J., SOO, G-H. et al. Clarity™ digital PCR system: a novel platform for absolute quantification of nucleic acids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2016, vol 409, p. 1869-1785.
- MELLATA, M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathog Dis.* 2013. vol. 10, p. 916-32.
- MELLATA, M., JOHNSON, J. R., CURTISS, R. *Escherichia coli* isolates from commercial chicken meat and eggs cause sepsis, meningitis and urinary tract infection in rodent models of human infections. *Zoonoses Public Health.* 2018, vol. 65, p. 103–113
- RUSSELL, W. M. S., BURCH, R. L. The principles of humane experimental technique, London: Methuen, 1959, p. 238
- SALAJKA, E., SALAJKOVA, Z., ALEXA, P.; HORNICH, M. Colonization factor different from K88, K99, F41 and 987P2 in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from postweaning diarrhea in pigs. *Veterinary Microbiology.* 1992, vol. 32, p. 163–175.
- SCHOULER, C., SCHEAFFER, B., BRÉE, A. et al. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. *J Clin Microbiol.* 2012, vol. 50, p. 1673–1678.
- TROTTEREAU, A., SCHOULER, C. Use of a Chicken Embryo Lethality Assay to Assess the Efficacy of Phage Therapy. In: Clokie M., Kropinski A., Lavigne R. (eds) Bacteriophages Methods in Molecular Biology. *Humana Press.* 2019, vol. 1898.

Contact address: Dana Kučerová, MVDr., Veterinary Research Institute, Brno, Hudcova 70, 621 00 Brno, H17010@vfu.cz

Obohacení sušenek polyfenoly prostřednictvím přidavku bylin a hroznové mouky

Biscuits polyphenol content fortification through herbs and grape seed flour addition

^{1,2}Král Ondřej, ²Fursová Ksenia, ²Javůrková Zdeňka, ²Dordevic Dani, ²Pospiech Matej, ²Jančíková Simona

¹Kerry Ingredients and Flavours, Praha, Česká republika

²Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Česká republika

Summary

Biscuits belonging to fine bakery are very popular with consumers. This is mainly due to their variability and variety of tastes, ease of consumption and long shelf life. Improving their nutritional profile may affect the diet of a large proportion of the population. The biscuit recipe usually contains 15 % or more fat. Its oxidative changes caused by the manufacturing process and subsequent storage may impair the nutritional profile and organoleptic properties of the product. The addition of suitable substances containing natural antioxidants may slow this process down. In the study, ground cloves, ground cinnamon, mint leaves and grape flour were gradually added to the product. The effect on polyphenol content, antioxidant capacity and sensory properties was investigated.

Key words: biscuits; oxidation; polyphenols; herbs; sensory; antioxidants

Úvod

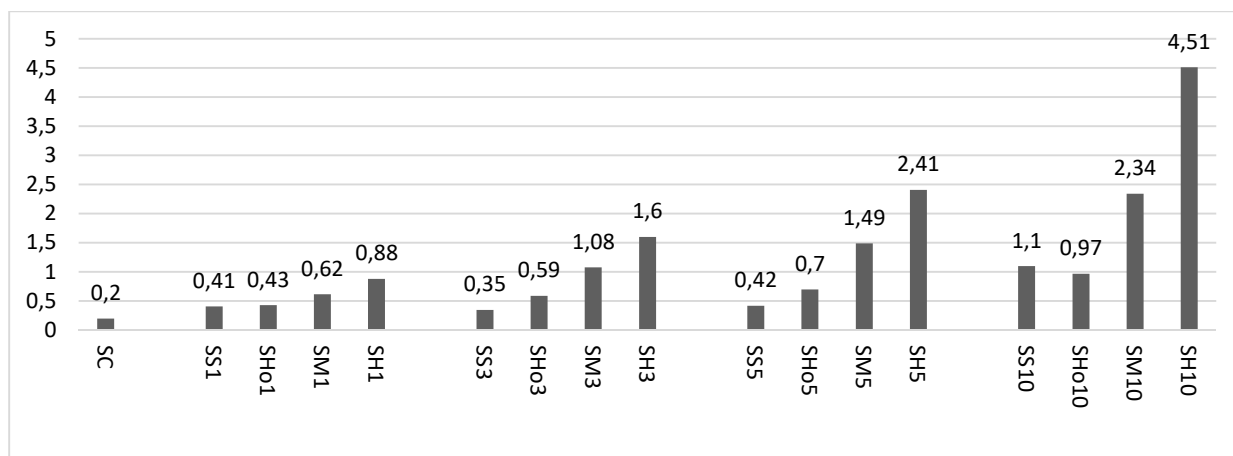
Sušenky jsou oblíbené pro jejich chutnost, variabilitu a snadnost konzumace. Vzhledem k tomu, že sušenky jsou jednou z nejčastěji konzumovaných sladkostí, úpravou jejich nutričního profilu je možné ovlivnit dietu širší lidské populace (Krystyjan et al., 2015). Z důvodu vyššího obsahu tuku a obvyklým podmínkám skladování jsou sušenky náchylné k oxidaci. Oxidace lipidů způsobuje oxidační stres, což má za následek rozvoj žluknutí, nepříjemné chutě a vůně. Dochází také ke změně barvy a ztrátě výživové hodnoty (Darughe et al., 2012). Potravininy často obsahují nenasycené mastné kyseliny, které jsou zvláště citlivé k oxidačnímu stresu (Brewer, 2011). Dříve byly ve světě hojně používané syntetické antioxidanty, jako je butylovaný hydroxytoluen (BHT) a butylovaný hydroxyanisol (BHA), ale kvůli obavám o jejich bezpečnost se jejich používání omezuje. (Sati et al., 2011). Z tohoto důvodu je nyní příklon k používání přírodních antioxidantů. V poslední době proto používání těchto látek v potravinách rychle roste a bylo publikováno mnoho studií na toto téma (Kapadiya et al, 2016). Cílem této studie je zjistit, jaký vliv má rozdílná koncentrace vybraných přírodních látek na obsah polyfenolů a antioxidační kapacitu sušenek.

Materiál a metody

Sušenky byly připraveny z následujících surovin: pšeničná hladká mouka (150 g), tuk na pečení (45 g; Hera), cukr moučka (150 g), vaječný žloutek (15 g). Kontrolní vzorek byl označen SC. Do vzorků dále byl přidán hřebíček mletý (*Eugenia caryophyllata*) – SH, skořice mletá (*Cinnamomum verum*) – SS, máta nať (*Mentha piperita L.*) a hroznová mouka (*Vitis vinifera*). Přidávky byly v koncentracích 1 %, 3 %, 5 % a 10 %. Stanovení celkového obsahu polyfenolů bylo provedeno Folin-Ciocalteu roztokem metodou podle Sarker and Oba, 2019 s určitými změnami. Antioxidační kapacita byla měřena metodou DPPH. Statistické zpracování bylo testem 95 % Dunn interval v software Unistat 6.0 (Unistat Ltd, GB).

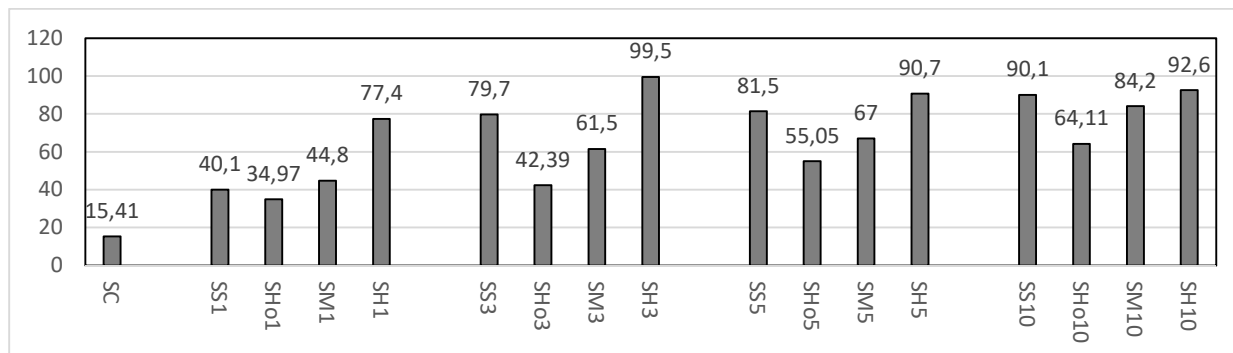
Výsledky a diskuse

Celkový obsah polyfenolů narostl v každém vzorku po přidavku koření ve srovnání s kontrolou. Nejvyšší nárůst vykazují vzorky s přidavkem hřebíčku. Statisticky významný rozdíl mezi kontrolou a přidavkem byl prokázán u vzorků SM5, SM10, SH3, SH5, SH10.



Graf 1: Obsah polyfenolů ve vzorcích (mg/g gallic acid).

Ne tak zřejmá je již situace s antioxidační kapacitou stanovenou metodou DPPH. U všech vzorků je parný nárůst ve srovnání s kontrolou, vzorek s hřebíčkem vykazuje nejvyšší hodnoty, což odpovídá nejvyšší hodnotě polyfenolů, ale na dalších pozicích již tato závislost neplatí. Statistický významný rozdíl byl prokázán mezi kontrolou a SS10, SH3, SH5, SH10. Ostatní vzorky vykazují rovněž nárůst oproti kontrole, řádové ale nižší.



Graf 2: Antioxidační kapacita vzorků stanovená metodou DPPH (%).

Závěr

Jedním z indikátorů antioxidační kapacity je obsah polyfenolických látek. Bylo prokázáno, že přidavkem vybraného koření a hroznové mouky do sušenek došlo k navýšení těchto látek a tím následně i k nárůstu antioxidační kapacity. Statisticky významný nárůst antioxidační kapacity vykazovaly vzorky s hřebíčkem v koncentraci od 3 %, a nejvyšší koncentrace máty. Ale i ostatní vzorky vykazovaly zvýšení oproti kontrole. Přidavek těchto látek může tedy v sušenkách působit preventivně a omezit oxidaci tuků.

Literatura

Brewer, M. (2011), Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10: 221-247.

Darughe, F., Barzegar, M., Sahari, M.A. 2012. Antioxidant and antifungal activity of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil in cake. *Int. Food Res. J.*, 19: 1253-1260.

Kapadiya, D.B., Dabhi, B.K. and Aparnathi, K.D. 2016. Spices and Herbs as a Source of Natural Antioxidants for Food. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 5(7): 280-288.

Krystyjan, M., Gumul, D., Ziobro, R. and Korus, A., 2015. The fortification of biscuits with bee pollen and its effect on physicochemical and antioxidant properties in biscuits. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), pp.640-646.

Sarker, U., Oba, S., 2019. Salinity stress enhances color parameters, bioactive leaf pigments, vitamins, polyphenols, flavonoids and antioxidant activity in selected *Amaranthus* leafy vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(5), 2275-2284.

Sati, Y.A. Al-Dalain, A.H., Al-Fraihat, E.T. 2011. Effect of Aromatic Plant Essential Oils on Oxidative Stability of Sunflower Oil During Heating and Storage. *Pakistan J. Nutr.*, 10: 864-870.

Kontaktní adresa: Ondřej Král, Ing., Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, 18006@vfu.cz

Determination of antioxidants in coloured wheat biscuits (Oxana, Jumiko and Vanessa)

Doleželová Jana, Král Martin, Tremlová Bohuslava

*Dpt. of Plant Origin Foodstuffs Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic*

Summary

Currently there is a growing interest in the functional properties of food and also in the role of antioxidants which promote health and reduces the risk of chronic diseases. The aim of this work was to determine and compare the amount of polyphenols and antioxidant activity in biscuits made from coloured wheat varieties. The results of the coloured varieties (AF Oxana, AF Jumiko) were compared to the results of the standard no colour wheat variety Vanessa. Biscuits from coloured wheat showed higher amount of polyphenols compared to standard wheat biscuits. The highest amount of polyphenols was found in sample no. 1 wheat AF Oxana (13.2 mg GAE.kg⁻¹). Significant differences ($p < 0.05$) were found between AF Oxana and AF Jumiko and between AF Oxana and Vanessa. Results in the antioxidant activity determined the highest amount in the sample of no colour whole cereal wheat variety – Vanessa (1001 mg TE.100 g⁻¹). A statistically significant difference ($p < 0.05$) was observed between Vanessa and AF Oxana and between Vanessa and AF Jumiko.

Keywords: Oxana; Jumiko; Vanessa; gallic acid; polyphenols; biscuits

Summary

Wheat is a leading cereal that is mainly used for human consumption. The physical properties biscuits are mainly influenced by the raw materials and the technological process of production. Most biscuits are made from standard non-grain Triticum aestivum, which contains a minimum of minerals and antioxidants that are stored in the bran (Pasqualone *et al.*, 2015). The presence of these substances in wheat, especially in its colour varieties could significantly affect the nutritional value of the final food product (Knievel *et al.*, 2009; Chabinová *et al.*, 2011). The aim of this work was to determine and compare the level of polyphenols and antioxidant activity in the biscuits made from coloured and no coloured wheat varieties.

Materials and Methods

Cereal grains

In experiment we used two types of colour grains of wheats: blue – AF Jumiko and purple – AF Oxana and one type no colour wheat Vanessa – control. All wheat varieties were winter wheats.

Antioxidant activity determination

In the FRAP assay, reductants (antioxidants) in the sample reduce Fe (III)/tripirydyltriazine complex, present in stoichiometric excess, to the blue ferrous form. The final results were expressed as milligrams Trolox equivalents (TE) per gram on dried basis (mg TE.100 g⁻¹) (Ou *et al.*, 2002).

Polyphenols determination

Total phenolic content was measured using the Folin-Ciocalteu assay and quantified as gallic acid equivalents (GAE) in mg.ml⁻¹ (Talcott *et al.*, 2000).

Dough preparation

Doughs were made by using three different wheat varieties: control, blue and purple (described in the subchapter – Cereal Grains). All wheat cultivars were procured by Mendel University in

Brno. Whole grains were milled to wholemeal flour using laboratory mill LM 3100 (Perten Instruments AB, Sweden) on the smooth flour.

The doughs were made by mixed ingredients: flour Oxana, Jumiko, Vanessa, 100 % vegetable fat Hera (UNILEVER CZ, Ltd.), egg (Česká vejce CZ, Ltd.), Cane sugar (Cassonade CZ, Ltd.), baking powder (Vitana, Inc., Czech Republic), salt (K+S, Inc., Czech Republic). Doughs were divided to squares of size 4x4 cm, put on baking tray lined with baking paper and baked 10 min. in the oven for 180 °C.

Statistical analysis

Statistical analysis of data was performed using Unistat 6.1, Ltd., 2012, Czech Republic. Data were statistically expressed using analysis of variance ANOVA and Kruskal-Wallis test (Tukey-HSD) was used for determine a statistically significant difference in polyphenolic content and antioxidant activity in the biscuits.

Results and Discussion

Polyphenols are the main bioactive compounds present in coloured wheat varieties that could potentially lead to health benefits in humans (Luís *et al.*, 2018). In the present work, the antioxidant activity and amount polyphenols in biscuits from coloured wheat are shown in Table 1 and 2.

Antioxidant activity results were in the range from 748. 6 to 1001 mg equivalent Trolox.100 g⁻¹. The highest value was in wheat control (1001 mg.100 g⁻¹). The lowest value was in Jumiko (740. 5 mg.100 g⁻¹). A statistically significant difference (P < 0.05) was observed between Vanessa and AF Oxana and between Vanessa and AFJumiko. In our experiment, there were some disagreements about the relationship between total phenol content, antioxidant activity, and colour grain.

Table 1. Amount antioxidant activity in wheat - FRAP (equivalent Trolox (mg TE.100 g⁻¹).

Sample	Mean	SD	Min	Max	ANOVA
AF Oxana	748.5	2.7	743	752	B
AF Jumiko	740.3	57.6	683	798	A
Control - Vanessa	1001	66.9	904	1086	AB

SD - standard deviation, Min. – minimum, Max. – maximum, ANOVA - same letter in column = statistically significant difference (P < 0.05).

The highest amount of polyphenols were found in the sample of AF Oxana (13.2 mg GAE.kg⁻¹) and the lowest amount was in the sample of control (11 mg GAE.kg⁻¹), and it is consistent with results of Gumul *et al.* (2018). Abdel-Aal *et al.* also reported that coloured wheats contain higher levels of anthocyanins, which are polyphenols than conventional wheat varieties. Significant differences (p < 0.05) were found between AF Oxana and AF Jumiko and between AF Oxana and Vanessa.

Table 2. Amount polyphenols in wheat (mg GAE.kg⁻¹).

Sample	Mean	SD	Min.	Max.	ANOVA
AF Oxana	13. 2	0.802	12.07	13.8	AB
AF Jumiko	11	0.036	10.96	11.05	A
Control - Vanessa	11	0.220	10.81	11.23	B

SD - standard deviation, Min. – minimum, Max. – maximum, ANOVA - same letter in column = statistically significant difference (P < 0.05).

Conclusion

The results of our study determined higher content of polyphenolic substances in biscuits from coloured variety of wheat AF Oxana. The same amount polyphenols were in the colour wheat AF Jumiko and standard (no colour) wheat Vanessa. The both variety was whole grain and it is known that polyphenolic substances occur in grain. The results also showed that biscuits baked from control wheat - Vanessa had a higher antioxidant activity than coloured wheat variety. The results of this work are the basis for the preparation of repetition of experiments and other analyzes dealing with the evaluation of antioxidants in products of colored wheat varieties.

References

- Abdel-Aal ES, Hucl P, Rabalski I. (2018). Compositional and antioxidant properties of anthocyanin-rich products prepared from purple wheat. *Food Chemistry*, vol. 254, pp. 13–19.
- Gumul D., Ziobro R., Korus J., Kruczek M., Árvay J. 2018. Characteristics of extruded cereal snacks enriched by an addition of freeze-dried red and purple potatoes. *Journal of Food Process Engineering*, Vol. 41, Issue 8.
- Chabinová, J., Zítka, O., Húska, D., Klejdus, B. Kizek, R. 2011. Optimization chromatographic isolation of anthocyanins. In *MendelNet 2011 – Proceedings of International Ph.D. Students Conference*. Brno, Mendel University in Brno, pp. 1003–1010.
- Kniewel, D. C., Abdel-Aal E. S. M., Rabalski I., Nakamura T., Hucl P. 2009. Grain color development and the inheritance of high anthocyanin blue aleurone and purple pericarp in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science*, 50(1): 113–120.
- Luís Â., Duarte A.P., Pereira L. Domingues F. 2018. Interactions between the major bioactive polyphenols of berries: effects on antioxidant properties. *Eur Food Res Technol*, 244:175–185.
- Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. A., and Deemer E. K. 2002. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *J. Agric. Food Chem.* 50(11), 3122–3128.
- Pasqualone, A., Bianco A. M., Paradiso V. M., Summo C., Gambacorta G., Caponio F. Blanco A. 2015. Production and characterization of functional biscuits obtained from purple wheat. *Food Chemistry*, 180: 64–70.
- Talcott ST, Howard LR, Brenes CH. 2000. Antioxidant changes and sensory properties of carrot puree processed with and without periderm tissue. *J. Agric Food Chem.* 48:1315–1321.

Contact address: Doleželová Jana, Mgr., Dpt. of Plant Origin Foodstuffs Hygiene and Technology, FVHE UVPS Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42, Brno, Czech Republic, dolezelovaja@vfu.cz

Prepojenie kvalitatívneho screeningu a ELISA metódy pri stanovení kokcidiostatík v krmivách

Connection of qualitative screening and ELISA method in the analysis of coccidiostats in feed

Juščáková Daniela, Kožárová Ivona

Ústav hygieny a technológie mäsa, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Slovenská republika

Summary

The work presents the results of microbial screening and ELISA method used for the determination of coccidiostats in poultry feed. The aim of this work was: 1) perform a qualitative screening for the presence of coccidiostat in commercial complete feed mixtures used for poultry, 2) to confirm the results of the qualitative screening by ELISA method. For qualitative screening, Premi[®]Test, Explorer 2.0 test and screening test for antibiotic residues (STAR) were used, and for quantitative confirmatory post-screening, Ionophore EIA was used.

Keywords: qualitative screening; ELISA; coccidiostats; residues

Úvod

Krmivá znamenajú akékoľvek látky alebo výrobky, vrátane prídavných látok, spracované, čiastočne spracované alebo nespracované, určené na používanie na kŕmenie zvierat orálnou cestou. Krmivo sa nesmie umiestňovať na trhu ani skrmovať žiadnym zvieratám určeným na výrobu potravín, ak je nebezpečné. Krmivo sa bude považovať za nebezpečné, ak sa predpokladá, že má nepriaznivý účinok na zdravie ľudí alebo zvierat, teda, spôsobuje, že potravinu pochádzajúca zo zvierat určených na produkciu potravín je nebezpečná pre ľudské zdravie (Nariadenie (ES) č.178/2002).

Kŕmne doplnkové látky (KDL) sú látky, mikroorganizmy, alebo prípravky odlišné od kŕmnych surovín a premixov, ktoré sa zámerne pridávajú do krmiva alebo do vody. Tieto látky musia priaznivo ovplyvňovať vlastnosti krmiva, vlastnosti živočíšnych produktov, uspokojovať nutričné potreby zvierat a priaznivo ovplyvňovať živočíšnu výrobu a úžitkovosť zvierat. Používanie antibiotík, ako stimulátorov rastu, je zakázané s výnimkou kokcidiostatík určených na ničenie alebo brzdenie rastu prvkov (Nariadenie (ES) č. 1831/2003).

Zaradenie kokcidiostatík medzi KDL má veľký význam v dôsledku toho, že bez ich kontinuálneho podávania v krmive by nebol možný ekonomický odchov cieľových druhov zvierat, predovšetkým hydiny. Ich bezpečnosť pre zvieratá, používateľov, spotrebiteľov a životné prostredie sa posudzuje Európskym úradom pre bezpečnosť potravín (EFSA). Súčasťou hodnotenia bezpečnosti je aj stanovenie maximálnych limitov rezíduí pre kokcidiostatiká, ktoré sa môžu nachádzať v živočíšnych produktoch cieľových i necieľových druhov zvierat po ich pridaní do krmiva (http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/docs/Report-Coccs-233-20_08-SK.pdf).

Kokcidiostatiká a ich rezíduá sú v krmivách povinne kontrolované (Smernica Rady 96/23/ES). Kokcidiostatiká patria medzi antimikrobiálne látky (AML) a pre prvotný screening rezíduí antimikrobiálnych látok v tkanivách potravinových zvierat je sú príslušným orgánom Slovenskej republiky schválené ako úradné metódy laboratórnej diagnostiky potravín: screeningový test na stanovenie rezíduí antibiotík s použitím piatich bakteriálnych kmeňov (metóda STAR, R – 25, 2006) a liekovková metóda Premi[®]Test (R – 26, 2006). Medzi ďalšie testy odporúčané na účely kontroly rezíduí vo svete patrí Explorer 2.0 test.

Kvalitatívne mikrobiologické metódy screeningu rezíduí AML ponúkajú obmedzené informácie o identifikácii a koncentrácii látky vo vyšetrovanej vzorke. S enzýmom-spojené imunosorpčné stanovenie (ELISA) je rýchla, jednoduchá, vysoko špecifická a ekonomicky výhodná screeningová metóda, ktorá ponúka riešenia pre relevantné a presné stanovenie rezíduí mnohých antimikrobiálnych látok v potravinách. Súčasná ELISA umožňuje screening kokcidiostatík a ich rezíduí v rôznych potravinových matriciach a v krmive, a preto je aj predmetom riešenia našej práce pri post-screeningu rezíduí kokcidiostatík v krmivách.

Materiál a metódy

V experimente sme ako vyšetrovaný materiál použili 7 vzoriek komerčných kompletných kŕmnych zmesí (KKZ) určených pre hydinu.

Rok 2016: BR1- KKZ s prídavkom nikarbazínu 101 mg.kg⁻¹; BR2- KKZ s prídavkom salinomycinátu sodného 70 mg.kg⁻¹; BR3 –KKZ bez prídavku kokcidiostatiká.

Rok 2017: BR1- KKZ s prídavkom nikarbazínu 101 mg.kg⁻¹; BR2- KKZ s prídavkom salinomycinátu sodného 70 mg.kg⁻¹; BR3– KKZ bez prídavku kokcidiostatiká.

Rok 2018: KKZ pre nosnice.

K prvotnému screeningu kokcidiostatík v krmivách sme použili kvalitatívne tubové mikrobiálne inhibičné testy Premi[®]Test (R–Biopharm AG, Darmstadt, Nemecko) a Explorer[®] 2.0 test (ZEULAB S.L., Zaragoza, Španielsko) a platňový screeningový test na stanovenie rezíduí antibiotík s použitím piatich bakteriálnych kmeňov (STAR). Na prípravu vzoriek kŕmív na analýzu bol použitý jednotný postup pre všetky tri mikrobiologické screeningové metódy. Na analýzu bol použitý supernatant získaný podľa Premi[®]Testu a Explorer 2.0 testu centrifugáciou 10 g kŕmiva rozpusteného v 30 ml sterilnej demineralizovanej vody.

Premi[®]Test a Explorer 2.0: Princípom oboch testov je agarový difúzny test v liekovkách s testovacím kmeňom *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* umožňujúce širokospektrálnu detekciu bez identifikácie príslušnej látky. Pomocou mikropipety sme aplikovali 100 µl supernatantu získaného z kŕmiva do testovacích liekoviek. Liekovky boli najskôr preinkubované pri teplote 80 °C po dobu 10 min. a následne inkubované pri teplote 65°C po dobu 3 hod. podľa pokynov uvedených výrobcami oboch testov.

STAR: Princípom metódy je agarový difúzny test, umožňujúci predbežnú identifikáciu látky/skupiny látok prítomných v pozitívnej vzorke, pri ktorom sa na piatich Petriho miskách používajú testovacie kmene s citlivosťou: agar s pH 7,2 s *Bacillus subtilis* na aminoglykozidy, agar s pH 8 s *Kocuria varians* na makrolidy a beta-laktámy, agar s pH 6 s *Bacillus cereus* na tetracyklíny, agar s pH 8 s *Escherichia coli* na chinolóny, agar s pH 7,4 s *Bacillus stearothermophilus* na beta-laktámy a sulfónamidy. Testovacie platne boli pripravené podľa postupu metódy. Získaný supernatant bol aplikovaný na povrch testovacích platní pomocou papierových diskov (Ø 9 mm, Albet Lab Science, Nemecko, 30 µl). Inkubácia prebiehala pri podmienkach stanovených metódou.

Ionophore EIA (EuroProxima, R-Biopharm NL, B.V.) je mikrotitračný kit pozostávajúci z 12 prúžkov, z ktorých každý obsahuje 8 jamiek, ktoré pasívne viažu protilátky a proteíny. Na prípravu vzoriek na ELISA analýzu bol použitý postup deklarovaný výrobcom testu. Supernatant získaný centrifugáciou vzorky rozpustenej v metanole sme odparili do sucha použitím mierneho prúdu dusíka pri teplote 50 °C. Získaný odparok bol najskôr rozpustený v metanole, následne sme pridali PBS roztok a centrifugovali. Získaný supernatant bol použitý na analýzu.

Výsledky a diskusia

Premi®Test a Explorer 2.0: Výsledky boli stanovené posúdením farby dolných dvoch tretín agarového média. Fialové, resp. žlté/fialové sfarbenie pevného média poukazuje na prítomnosť rezíduí antimikrobiálnych látok vo vyšetrovanej vzorke, ktorých množstvo je nad úrovňou (pozitívna vzorka), resp. na úrovni (dubiózna vzorka) detegovateľnosti testov. Výsledky stanovenia screeningu rezíduí kokcidiostatík vo vyšetrovaných krmivách pomocou metódy Premi®Test a Explorer 2.0 test sú prezentované v Tabuľke 1.

Metóda STAR: Výsledky boli stanovené meraním veľkostí inhibičných zón (IZ) od okraja papierových diskov po vonkajší okraj IZ pomocou digitálneho posuvného meradla s presnosťou na 0,01 mm (Mitutoyo, Japonsko). Za pozitívne vzorky pre živočíšne matrice sú považované platne *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, *K. rhizophila* ak IZ bola ≥ 2 mm a platňa *B. stearothermophilus* ak IZ bola ≥ 4 mm. Vzhľadom na to, že uvedená metóda nestanovuje veľkosť IZ pri pozitívnom výsledku pre krmivá, považovali sme za pozitívnu každú vzorku, pri ktorej sa vytvorila IZ, pretože prítomnosť akejkoľvek AML sa prejaví IZ. Výsledky stanovenia screeningu rezíduí AML vo vyšetrovaných krmivách pomocou metódy STAR sú prezentované v Tabuľke 2.

Ionophore EIA: Výsledky boli stanovené na základe intenzity farby reakčného produktu. Vývoj farby sa zastaví pridaním konečného roztoku. Ihneď po jeho pridaní sa fotometrickým meraním pri 450 nm odčítajú výsledky. Výsledky post-screeningu kokcidiostatík vo vyšetrovaných krmivách stanovené pomocou ELISA metódy sú prezentované v Tabuľke 3.

Tabuľka 3. Výsledky stanovenia screeningu rezíduí antimikrobiálnych látok vo vyšetrovaných maticiach krmív detegované Premi®Testom a Explorer 2.0 testom.

Vzorka	1	2	3	4	5	6	7
Rok	2016			2017			2018
Krmivo	BR1	BR2	BR3	BR1	BR2	BR3	KKZ nosnice
Premi®Test	+	+	-	+	+	-	-
Explorer	-	+	-	-	+	-	±

Legenda 1, + pozitívna vzorka; - negatívna vzorka, ± dubiózna vzorka

Tabuľka 4, Výsledky stanovenia screeningu rezíduí antimikrobiálnych látok vo vyšetrovaných maticiach krmív pomocou metódy STAR (priemer IZ \pm smerodajná odchýlka).

Vzorka	1	2	3	4	5	6	7		
Rok	2016			2017			2018		
Krmivo	BR1	BR2	BR3	BR1	BR2	BR3	KKZ nosnice		
STAR	IZ (mm + SD)	<i>B. stearothermophilus</i>	2,47 \pm 0,30	6,15 \pm 0,09	/	2,47 \pm 0,30	4,75 \pm 0,31	/	1,38 \pm 0,78
		<i>B. cereus</i>	/	1,00 \pm 0,17	/	/	0,22 \pm 0,16	/	/
		<i>B. subtilis</i>	/	/	/	/	/	/	/
		<i>E. coli</i>	/	/	/	/	/	/	/
		<i>K. rhizophila</i>	/	/	/	/	/	/	/

Legenda 2, Zvýraznené veľkosti IZ predstavujú pozitívne výsledky; mm – milimeter; SD – smerodajná odchýlka

Tabuľka 5, Výsledky stanovenia post-screeningu rezíduí kokcidiostatík vo vyšetrovaných maticiach krmív pomocou ELISA metódy.

Vzorka	1	2	3	4	5	6	7
Rok	2016			2017			2018
Krmivo	BR1	BR2	BR3	BR1	BR2	BR3	KKZ nosnice
ELISA (mg.kg ⁻¹)	0,2308	0,2440	0,0709	0,1588	0,2174	0,0709	0,0407

Prezentované výsledky v Tabuľke 1 poukazujú na pozitívne výsledky pri stanovení Premi® Testom pri všetkých vzorkách krmív BR1 a BR2, ktorý bol spôsobený prítomnosťou kokcidiostatík nikarbazínu a salinomycínu v KKZ, zatiaľ čo Explorer 2.0 test poukázal len na pozitívny výsledok pri vzorkách krmív BR2 a dubiózny výsledok pri vzorke KKZ nosnice. Porovnateľné výsledky, ktoré sú prezentované v Tabuľke 2, boli detegované aj platňovou metódou STAR. Vyšetrené krmivá vykazovali pozitívny výsledok na platniach s testovacím kmeňom *B. stearothermophilus* (BR1, BR2 a KKZ nosnice) a *B. cereus* (BR2).

Pri kvantitatívnom stanovovaní koncentrácií kokcidiostatík v krmivách použitím postupu stanoveného metódou ELISA sme síce získali nejaké výsledky poukazujúce na prítomnosť kokcidiostatík v krmive (Tabuľka 3), ale detegované koncentrácie nekorešpondovali s koncentráciami kokcidiostatík deklarovanými výrobcami KKZ na obale. Uvedený postup nemôžeme považovať pri tak vysokých koncentráciách kokcidiostatík v krmive za vhodný na analýzu. Postup a metódu výpočtu je potrebné modifikovať úpravou návazky vzorky, resp. vyššieho riedenia vzorky. Uvedená metóda je však vysoko citlivá na stanovenie stopových množstiev kokcidiostatík, t.j. krížovej kontaminácie-necieľového krmiva kokcidiostatikom.

Záver

Screening rezíduí antimikrobiálnych látok v krmivách určených pre potravinové zvieratá je veľmi dôležitý pre ochranu verejného zdravia a garanciu bezpečnosti potravín. Všetky tri screeningové metódy detegovali pozitívne, resp. dubiózne výsledky a poukázali na prítomnosť kokcidiostatík vo vyšetrovaných krmivách. Výsledky stanovené ELISA testom sú pre nás základom pre ďalšie prehodnotenie postupu za účelom využitia tohto testu pre stanovenie kokcidiostatík v hladinách vyšších, ako je detekčný limit metódy.

Podakovanie

Spracovanie príspevku bolo podporené grantom VEGA MŠVVaŠ SR a SAV č. 1/0576/17.

Literatúra

<http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/docs/Report-Coccs-233-2008-SK.pdf>

<http://europroxima.com/wp-content/uploads/51111IONO511.16.pdf>

http://www.svssr.sk/dokumenty/zakladne_info/Diagnostika/R%2026%20PREMi%20test.pdf

https://www.svps.sk/dokumenty/zakladne_info/R_25.pdf

NARIADENIE EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1831/2003 o doplnkových látkach určených na používanie vo výžive zvierat. Úradný vestník Európskej únie L 268, 2003, s. 29 – 43.

Dostupné na internete: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SK/TXT/PDF/?uri=CELEX:02003R1831-20151230&from=EN>

NARIADENIE EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 178/2002 NARIADENIE (ES) č. 178/2002 EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADY z 28. januára 2002, ktorým sa ustanovujú všeobecné zásady a požiadavky potravinového práva, zriaďuje Európsky úrad pre bezpečnosť potravín a stanovujú postupy v záležitostiach bezpečnosti potravín. In Úradný vestník Európskej únie L 31, 1.2.2002, s. 463-486.

Kontaktná adresa: Daniela Juščáková, MVDr., Katedra hygieny a technológie potravín, UVLF Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika, daniela.juscakova@student.uvlf.sk

SEKCE 2

Chov zvířat, výživa zvířat a biochemie

Hodnocení vztahu ukazatelů welfare a stresu u koní – pilotní studie

Evaluation of relationship between welfare and stress indicators in horse breeding – a pilot study

Pešková Lucie, Hostovský Martin

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

Summary

Disruption of animal welfare during stress and overload occurs already at the level of damage to cellular proteins, lipids and nucleic acids, as a result of the effects of free radicals, which leads to the oxidative stress. In addition to traditional indicators of blood parameters, current studies prefer non-invasive samples, such as saliva. Oxidative damage and non-invasive sampling provide us the opportunity to evaluate the individual more accurately with stress and disturbance of welfare. In this pilot study, 5 healthy horses of different age and breeds were used. Saliva samples were used to evaluate oxidative stress, i.e. the determination of lipid peroxidation (TBARS), carbonylated proteins (CP) and antioxidant capacity (AOC). The result were significant positive correlations ($p < 0,01$) of individual parameters. The positive linear correlation between lipid peroxidation and carbonyl proteins is commonly known in various animal species linked to the oxidative stress. Findings of positive linear correlation linked to the oxidative damage with the total antioxidant capacity is a relatively interesting fact, which may be a reflection of the response to higher demands of the organism. In addition, the results provide great opportunities for further studies to assess oxidative stress in relation to the welfare.

Keywords: equine; oxidative stress; antioxidant; non-invasive; welfare

Úvod

Hodnocení stresu u zvířat a zlepšováním welfare jejich chovu je v současnou dobu na vzestupu, snaha je převážně rozvíjet metodiky pro hodnocení stresu neinvazivními technikami odběru. Při narušení podmínek chovu koní, a tím může být bolest, ale také nevhodný management, sociální stres a narušení etologických potřeb, dochází ke krátkodobému, popřípadě dlouhodobému stresu, který spouští kaskádu fyziologických změn v organismu. Se stresem se organismus vypořádává pomocí dvou hlavních fyziologických drah a tyto změny pomáhají organismu vypořádat se s danou situací (Sapolsky et al. 2000; Sheriff et al. 2011; Cock 2012) a jsou měřeny pomocí katecholaminů a glukokortikoidů (Sheriff et al. 2011). V případě dlouhodobého stresu dochází k narušení antioxidační kapacity organismu (Young et al. 2002; Kirschvink et al. 2008) a dochází taktéž k narušení redoxního potenciálu u koní, například při dlouhodobém transportu (Kirschvink et al. 2008) a také v případě nepřiměřené zátěže (Mills et al. 1996; Young et al. 2002; Williams et al. 2004). Produkty oxidativního stresu jsou běžně stanovovány v plazmě nebo séru. Sliny, stejně jako plazma, obsahují mnoho antioxidantů (Miricescu et al. 2011) a taktéž reflektují fyziologickou odpověď organismu v poměrně krátkém časovém intervalu (Lima et al. 2010; Yoshizawa et al. 2013). Pro zahrnutí slin jako biologického vzorku mezi rutinní analýzy je nezbytné testování dostupných metod stanovení, které mohou interferovat s již známými tradičními analýzami.

Materiál a metodika

V této pilotní studii bylo využito 5 koní (1 klisna, 1 hřebec a 3 valaši), ve věkovém rozmezí 2-15 let, rozdílných plemen. Vybraní koně jsou ustájeni ve shodných podmínkách, tj. boxové ustájení s velikostí boxů 3x4m s možností výběhu, kde tráví 8 hodin denně, v těchto výbězích jsou drženi individuálně nebo v páru. Koně jsou krmeni 2x denně speciální krmnou směsí (Base Standard, Energys), seno a voda je jim podávána ad libitum. Odběr slin koní byl proveden

v odpoledních hodinách (ve dnech 13.3. a 15.3.2020). Sliny byly neinvazivně odebrány pomocí odběrového materiálu Salivette (Salivette, Sarstedt, Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht, Germany) v interdentalním prostoru těsně před premoláry. Sliny byly následně odstředěny (10.000 g / 10 min) a zamrazeny při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ k dalším analýzám. Analýzy byly provedeny na Ústavu chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie Veterinární a farmaceutické univerzity Brno.

Metoda stanovení antioxidační kapacity ve slinách byla upravena a stanovena podle Re et al. (1999), která je běžně využívána pro plazmu. Hodnoty antioxidační kapacity jsou vyjádřeny jako mikromol ekvivalentů Troloxu na ml ($0,02\text{--}0,2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$). Lipoperoxidace ve slinách byla měřena dle Ohkawa et al. (1979) kvantifikací koncentrace látek reagujících s kyselinou 2-thiobarbiturovou (TBARS) a metoda byla modifikována dle metody měření v plazmě podle Lushchak et al. (2005). Výsledné hodnoty TBARS jsou vyjádřeny v $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ vzorku slin. Míra oxidačního poškození proteinů byla měřena pomocí karbonylových derivátů aminokyselin s DNPH (2,4-dinitrofenylhydrazin) podle Levine et al. (1990) a Castegna et al. (2003) s přepočtem na mg proteinu (Smith et al., 1985). Výsledné hodnoty CP jsou vyjádřeny v $\text{nmol}\cdot\text{mg}\text{ proteinu}^{-1}$. Metody byly přizpůsobeny pro mikrotitrační destičky a měřeny spektrofotometricky pomocí přístroje Varioskan™ Flash Multimode Reader (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Výsledky

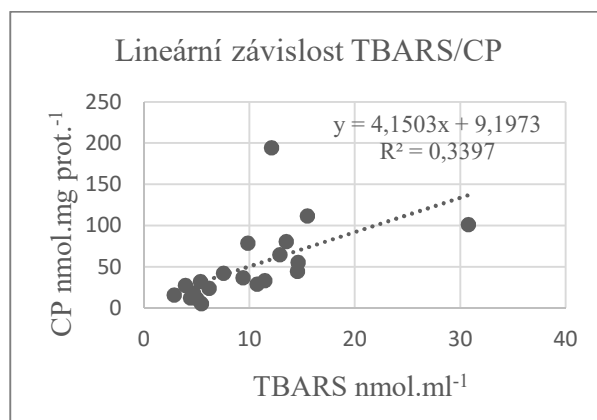
Ze vzorků slin koní byly stanoveny výše zmíněné parametry a dále byly pomocí korelační analýzy testovány závislosti jednotlivých testovaných proměnných na hladině významnosti 0,01. Tabulka 1 ukazuje hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu mezi jednotlivými testovanými parametry.

Tabulka 6. Hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu.

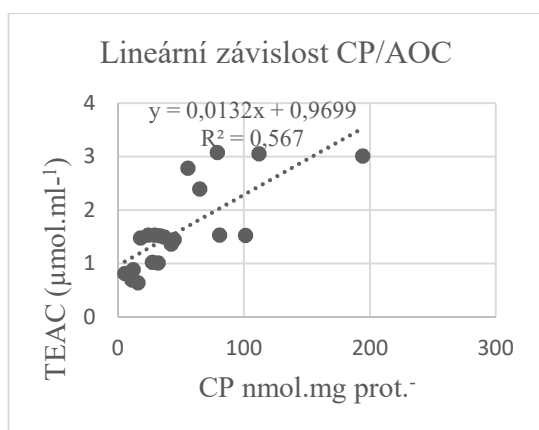
	CP	TBARS	AOC
CP		0,5828**	0,7530**
TBARS	0,5828**		0,4446**
AOC	0,7530**	0,4446**	

Vysvětlivky: ** $p < 0,01$, CP – karbonylované proteiny, TBARS – lipidní peroxidace, AOC – antioxidační kapacita

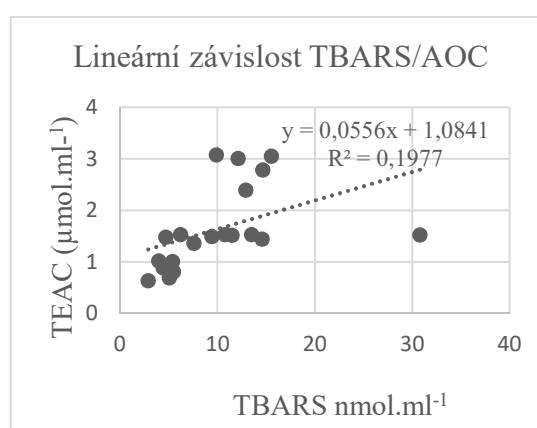
Statistická analýza ukázala pozitivní korelaci (významnost $p < 0,01$) mezi testovanými parametry, v případě pozitivní korelace také mezi CP a TBARS vůči AOC, což je neobvyklé vzhledem ke standartním měřením těchto parametrů v krevní plazmě. Lineární závislosti jsou uvedeny v grafech 1-3.



Graf 1. Lineární závislost lipidní peroxidace (TBARS) a karbonylovaných proteinů (CP).



Graf 2. Lineární závislost karbonylovaných proteinů (CP) a antioxidační kapacity (AOC).



Graf 3. Lineární závislost lipidní peroxidace (TBARS) a antioxidační kapacity (AOC).

Diskuze

Výše uvedené metodiky bylo nezbytné upravit pro využití stanovení parametrů ze slin, které se významně liší ve svém složení, funkcí antioxidantu a projevy oxidativního stresu oproti běžněji využívané krevní plazmě (Yan et al. 2009) a dle výsledků je patrné, že dané metodiky je možné využít i pro hodnocení slin jako biologického vzorku. V této studii byla dále zkoumána závislost lipidní peroxidace v porovnání s poškozením proteinů na úrovni karbonylovaných proteinů, dle zjištěných výsledků se potvrdila signifikantní pozitivní korelace ($p < 0,01$), což potvrzuje studii Andriichuk et al. (2015). Oxidativní stres je často spojován s narušením fyziologických procesů (Maes et al., 2011; Avellini et al. 1999; Kirschwink et al. 2008; Omidí et al. 2017), ale také i v případě březosti (El-Bahr and El-Deeb 2016). Pod pojmem oxidativní stres je vyjádřeno převážně zvýšení lipidní peroxidace a poměru karbonylovaných proteinů, toto zvýšení potvrzují i naše výsledky, avšak díky zaměření této pilotní studie nemůžeme potvrdit ani vyvrátit závislost na narušení fyziologie organismu. Tato studie však také ukazuje pozitivní signifikantní korelaci se zvýšenou antioxidační kapacitou ve slinách, která se však ve výše uvedených studiích neobjevuje. Se zvýšenou antioxidační kapacitou krevní plazmy v závislosti s oxidativním stresem je často spojováno dočasné zvýšení zátěže a nároků na organismus, s kterým se daný jedinec snaží vypořádat a tyto nároky nepřevyšují kompenzační možnosti (Banse et al. 2015; Puzio et al. 2017). Míra schopnosti organismu vyrovnávat se se zvýšenými požadavky je individuální a vyžaduje další studie, pro potvrzení či vyvrácení negativní korelace antioxidační kapacity s oxidativním poškozením, které je pozorováno (Avellini et al. 1999; Kirschwink et al. 2008; El-Bahr and El-Deeb 2016; Puzio et al. 2017).

Závěr

Na základě zjištěných výsledků předpokládáme, že hodnocení oxidativního stresu pomocí neinvazivně získaných biologických materiálů, resp. slin, má velký potenciál pro budoucí hodnocení dobrých životních podmínek v chovech zvířat. Zvolené parametry ve slinách lze spolu s tradičními ukazateli stresu použít pro hodnocení welfare koní, nezbytné je však posoudit také další faktory, které se podílejí na ovlivnění odpovědi organismu.

Poděkování

Tato práce byla podpořena projektem IGA 205/2020/FVHE VFU Brno.

Literatura

ANDRIICHUK, A., TKACHENKO, H., KURHALUK, N. Oxidative Stress Biomarkers and Erythrocytes Hemolysis in Well-Trained Equine Athletes Before and After Exercise. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2015, vol. 36, s. 32-43.

- AVELLINI, L., CHIARADIA, E., GAITI, A. Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some free radical scavengers in horses (*Equus caballus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, vol. 123, no: 2, s. 147–154.
- BANSE, H.E., FRANK, N., KWONG, G.P., McFARLANE, D. Relationship of oxidative stress in skeletal muscle with obesity and obesity-associated hyperinsulinemia in horses. *Can J Vet Res*, 2015, vol. 79, no. 4, s. 329-338.
- CASTEGNA, A., THONGBOONKERD, V., KLEIN, J.B., LYNN, B., MARKESBERY, W.R., BUTTERFIELD, D.A. Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *Journal of Neurochemistry*. 2003, vol. 85, s. 1394–1401.
- COCK, N.J. Review: Minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals. *Can. J. Anim. Sci.* 2012, vol. 92, s. 227-259.
- EL-DEEB, W.M., EL-BAHR, S.M. Selected biochemical indicators of equine rhabdomyolysis in Arabian horses: acute phase proteins and trace elements. *J Equine Vet Sci*, 2014, vol. 34, s. 484-488.
- KIRSCHWINK, N., DE MOFFARTS, B., LEKEUX, P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horse. *Vet J*. 2008, vol. 177, s. 178–91.
- LEVINE, R.L., GARLAND, D., OLIVER, C.N., AMICI, A., CLIMENT, I., LENZ, A.G., AHN, B. SHALTIE, S., STADTMAN, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990, vol. 186, s. 464–478.
- LIMA, D.P., DINIZ, D.G., MOIMAZ, S.A., SUMIDA, D.H., OKAMOTO, A.C. Saliva: reflection of the body. *Int J Infect Dis*, 2010, vol. 14, s. 184-188.
- MAES, M., GALECKI, P., CHANG, Y.S., BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 2011. vol. 35, s. 676-692.
- MILLS, P.C., SMITH, N.C., CASSAS, I., HARRIS, P., HARRIS, R.C., MARLIN, D.J. Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse. *Eur J Appl Physiol*. 1996, vol. 74, s. 60-66.
- OHKAWA, H., ORISHI, N., YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979, vol 92, s. 337-342.
- OMIDI, A., VAKILI, S., NAZIFI, S., PARKER, M.O. Acute-phase proteins, oxidative stress, and antioxidant defense in crib-biting horses. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*, 2017, vol. 20, s. 31–36.
- PUZIO, W., CHROBAK, L., RUTKOWSKI, M., FRANCZYK, M., KANKOFER, M. Antioxidative and oxidative profiles in plasma and saliva of cows in different ages and hormonal status. *Veterinaria Italiana*. 2019, vol. 55, no: 4, s. 319-326.
- RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999, vol. 26, no. 9-10, s. 1231–1237.
- SAPOLSKY, R.M., ROMERO, L.M., MUNCK, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*. 2000, vol. 21, s.55-89.
- SHERIFF, J.M., DANTZER, B., DELEHANTY, B., PALME, R., BOONSTRA, R. Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*. 2011, vol. 166, s. 869-887.
- SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLJA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M., FUJOMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSON, B.J., KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. 1985, vol. 150, no. 1, s. 76–85.
- WILLIAMS, C.A., KRONFELD, D.D.S., HESS, T.M., SAKER, K.E. WALDRON, J.N., CRANDELL, K.M., HOFFMAN, R.M., HARRIS, P.A. Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race. *J Anim Sci*. 2004, vol. 82, s. 588-594.
- YOSHIZAWA, J.M., SCHAFFER, C.A., SCHAFFER, J.J., FARRELL, J.J., PASTER, B.J., WONG, D.T.W. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin. Microbiol. Rev*. 2013, vol. 26, s. 781–791.
- YOUNG, L.E., MARLIN, D.J., DEATON, C., BROWN-FLETNER, H., ROBERTS, C.A., WOOD, J.L.N. Heart size estimated by echocardiography correlates with maximal oxygen uptake. *Equine Vet J*. 2002, vol. 34, s. 467–71.

Kontaktní adresa: Lucie Pešková, Mgr., Ústav výživy zvířat, chovu zvířat a biochemie, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H18013@vfu.cz

Digitálna dermatitída hovädzieho dobytku: Izolácia *Treponema spp.* z kožných lézií

Dermatitis digitalis in cattle: Isolation of *Treponema spp.* from skin lesions

¹Marčeková Paulína, ²Maďar Marián, ¹Mudroň Pavol, ³Styková Eva

¹Klinika prežúvavcov, ²Katedra mikrobiológie a imunológie, Laboratórium gnotobiológie, ³Klinika koní, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Slovenská republika

Summary

Digital dermatitis is highly infectious bacterial disease of hooves in cattle. Multiple bacterial agents have been routinely identified and cultured from active lesions, but the most common bacteria associated with digital dermatitis are multiple phylotypes from the genus *Treponema*. Aim of this study was to detect species of *Treponema spp.* genus frequently associated with digital dermatitis in cattle and evaluate chosen technique of isolation and detection of *Treponema spp.* Samples ($n=24$) were collected from cows showing clinical signs of digital dermatitis in herds in Eastern Slovakia. Affected part of skin was excised after mechanical cleaning of hoof and assessed, using PCR technique for the presence of *Treponema denticola* group (including *Treponema vincentii*, *Treponema medium spp. bovis*, *Treponema phagedenis ssp. vaccae*, *Treponema denticola*), *Treponema pedis* and *Treponema brennaborensis*. 10 samples contained DNA of group *Treponema denticola*, however another 6 were suspected as positive but reaction in agarose gel was not so strong. *Treponema pedis* was detected in 4 samples, 1 sample was suspectly positive. *Treponema brennaborensis* was detected in 1 sample. Therefore, *Treponema* DNA was demonstrated in 50 % of samples, if we count also suspectly positive 75 %. Chosen method of isolation and identification was proven effective even in samples stored in temperature $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 6 months. *Fusobacterium necrophorum* wasn't detected.

Keywords: *Treponema spp.*; digital dermatitis; isolation; PCR

Úvod

Digitálna dermatitída je infekčné, zápalové ochorenie paznechtov prezentované bolestivými ulceratívnymi alebo proliferatívnymi zmenami. Tieto patologické zmeny vedú ku krívaniu a narúšajú tým welfare zvierat, ale aj ekonomickú efektivitu chovu. Etiologický agens nebol doposiaľ s istotou potvrdený, avšak je všeobecne akceptovaný multifaktoriálny vplyv so významným zastúpením baktérií rodu *Treponema*. Niektoré zdroje uvádzajú aj možnosť spolupôsobenie *Fusobacterium necrophorum*. Cieľom našej práce bolo detegovať prítomnosť týchto baktérií v léziách paznechtov u hovädzieho dobytku postihnutého digitálnou dermatitídou pomocou PCR.

Materiál a metodika

Celkovo bolo odobratých 24 vzoriek z kožných lézií hovädzieho dobytku z fariem na Východnom Slovensku. Odoberaná bola časť postihnutého kožného tkaniva a to po mechanickom odstránení nečistôt, aby sa zabránilo novej kontaminácii treponémami nachádzajúcimi sa v prostredí. Vzorky boli do vyšetrenia metódou PCR uskladnené pri teplote $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na izoláciu DNA bola vybraná metóda s použitím prípravku DNAzol direct.

Tabuľka 1. Podmienky detekcie treponém.

Detekovaný druh, marker	Primery	PCR protokol	Očakávaný produkt
<i>Treponema pedis</i> , <i>flaB2</i>	TPed32f: 50 - cttacttacaggaactacggac-3'; Tped-500r: 50 - gcaatgtaattcctacaaccgtaag-3'	94°C 5min 35x [94°C 30sec, 61°C 30sec, 72°C 40sec] 72°C 5min	424bp
<i>Treponema brennaborensis</i> , 16SrRNA	TBrenn-418f: 50 - gacagcgtggtgacagtagg-3'; TBrenn-1080r: 50 - cttgctgtaactggcagtagg-3'	94°C 5min 35x [94°C 30sec, 61°C 30sec, 72°C 40sec] 72°C 5min	663bp
Skupina <i>Treponema denticola</i> , <i>flaB2</i>	TMult-2f: 5- acggyatttcyatttcaagttgc-3; TMult-472r: 5- cgagtctgttytgatgcacc-3	94°C 5min, 45x [94 °C 30sec, 63°C 30sec, 72°C, 40sec] 72 °C 40sec	470bp

Výsledky

Najčastejšie detegovanými boli treponémy skupiny *Treponema denticola*. Ich prítomnosť sa potvrdila v 10 vzorkách a suspektne pozitívnych bolo ďalších 6 vzoriek. U týchto suspektne pozitívnych vzoriek bol síce pozorovaný produkt v očakávanej oblasti agarózového gélu, avšak bol signifikantne slabší ako u vzoriek, ktoré sme označili ako jednoznačne pozitívne. Vzhľadom na to, že išlo o skrining v rôznych chovoch, v prípade, že sa v jednom chove preukázal určitý druh treponém, bolo možné predpokladať jeho prítomnosť aj v ostatných vzorkách z rovnakého chovu a teda vzorky suspektne pozitívne nebolo nutné podrobovať opätovnému vyšetreniu.

Treponema pedis bola detegovaná v 4 vzorkách-skontrolovať a suspektne v ďalšej jednej. Na *Treponema brennaborensis* bola pozitívna jedna vzorka.

Celkovo sa DNA baktérií rodu *Treponema spp.* jednoznačne potvrdila v 12 vzorkách čo predstavuje 50 %, v prípade, že sa zohľadnia aj suspektne pozitívne tak bolo pozitívnych až 18 vzoriek (75 %).

Diskusia

Napriek tomu, že digitálna dermatitída je vnímaná ako multifaktoriálne ochorenie, treponémy sú už dlhšie akceptované ako predominantný bakteriálny druh nachádzajúci sa v aktívnych dermatitídnych léziách (Demirkan a kol.2018). Vzhľadom na ich veľmi náročnú kultiváciu je PCR spolu s histologickým vyšetrením považovaná za najlepšiu metódu ich diagnostiky. Rovnako ako Brandt a kol.(2010) sme v našej štúdií amplifikovali špecifický fragment génu 16S rRNA pre detekciu *Treponema brennaborensis* a gén kódujúci flagelín *flaB2* pre detekciu *Treponema denticola* a *Treponema pedis*. V ich štúdií sa pozitívny nález treponém objavil až v 38 vzorkách zo 45 a po použití citlivejšej kvalitatívnej PCR až v 42 vzorkách, čo predstavuje 93,3%. 2 z 3 lézií s negatívnym nálezom predstavovali chronickú formu digitálnej dermatitídy. Najčastejšie sa vyskytujúcou bola v tejto štúdií *Treponema pedis* objavená v 51% vzoriek, naproti tomu u nás najčastejšie sa vyskytujúcou bola skupina treponém *Treponema denticola* (41,7% /66,7%). Beninger a kol.(2018) popisujú signifikantne vyššie množstvo prítomných treponém v aktívnych, ulceratívnych léziách ako v hojacich sa a chronických. Z tohto dôvodu by bolo vhodné pri ďalšej diagnostike venovať pozornosť aj rozdeleniu lézií do štádií podľa zaužívaného M systému (Döpfer, 2009). Ďalším rozdielom v našich nálezoch bolo objavenie 1 pozitívnej vzorky na *Treponema brennaborensis*, ktorú v tejto štúdií nedetegovali v žiadnej vzorke. Wilson-Welder a kol.(2015) taktiež udávajú jej menej častý výskyt v léziách. Rasmussen a kol. (2012) uvádza vo svojej štúdií možnosť spolupôsobenia *F. necrophorum* pri vzniku digitálnej dermatitídy, nakoľko bol tento anaerób zachytený v biopťátov z dvoch lézií

tohto ochorenia. Taktiež Staton a kol. (2020) detegoval *F. necrophorum* v léziách paznechtov postihnutých nekomplikovanou digitálnou dermatitídou, avšak len v 33% vzoriek (3/10) pričom v nehojacich sa ranách na paznechtach bol tento agens nachádzaný až v 70 %. *F. necrophorum* teda pravdepodobne nepatrí medzi agensy vyvolávajúce digitálnu dermatitídu, avšak v prípade sekundárnej infekcie môže viesť ku komplikáciám hojenia. Ďalším často nachádzaným agensom v nehojacich sa ranách v Statonovej štúdií (2020) bol *Porphyromonas endodontalis*, ktorý však v nekomplikovaných léziách detegovaný nebol.

Záverom je možné konštatovať, že pomocou metódy PCR sa podarilo zistiť prítomnosť *Treponema spp.* v léziách u hovädzieho dobytku postihnutého digitálnou.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla za podpory Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV - 16-0203

Literatúra

BRANDT, S.: a kol. Prevalence of bovine papillomavirus and *Treponema* DNA in bovine digital dermatitis lesions. *Vet Microbiol.* 2011;148(2-4):161-7

RASMUSSEN, M. a kol.: Bovine digital dermatitis: Possible pathogenic consortium consisting of *Dichelobacter nodosus* and multiple *Treponema* species. *Vet Microbiology* 2012; 160:151–161.

BENINGER, C. a kol.: Associations between digital dermatitis lesion grades in dairy cattle and the quantities of four *Treponema* species. *Veterinary Research.* 2018;49:111.

DEMIRKAN, I. a kol.: Isolation and identification of *Treponema pedis* and *Treponema phagedenis*-like organisms from bovine digital dermatitis lesions found in dairy cattle in Turkey. *J dairy Sci.* 2018;101(11):10317-10326.

WILSON-WELDER, J. a kol.: Digital Dermatitis in Cattle: Current Bacterial and Immunological Findings. 2015;5(4):1114-1135.

DÖPFER, D. Digital Dermatitis. The dynamics of digital dermatitis in dairy cattle and the manageable state of disease. *CanWest Veterinary Conference.* 2009.

STATON, Gareth James, et al. Surveying bovine digital dermatitis and non-healing bovine foot lesions for the presence of *Fusobacterium necrophorum*, *Porphyromonas endodontalis* and *Treponema pallidum*. *Veterinary Record*, 2020.

Kontaktná adresa: Paulína Marčeková, MVDr., Klinika prežúvavcov, UVLF Košice, Komenského 73, 04181, Košice, Slovenská republika, paulina.marcekova@student.uvlf.sk

Současný stav řešení problematiky selenu ve výživě psů – review

Current state of research about selenium in nutrition of dogs – a review

Zentrichová Viola

*Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická universita Brno, Česká republika*

Summary

The objective of this review was to gather available information about selenium in nutrition of dogs and its impact on their health. Even though in farm animals the problematic of selenium is well explored, in dogs, there is still a lot of room for research. While nutritional recommendations for levels of selenium in commercial diets for dogs exists, for puppies they are based solemnly on one study and for adult dogs on known information from cat research. Also, there is some doubt about what are the maximal safe limits. New studies also take interest in relationship of peroral supplementation and some disease conditions, mainly focusing on cancer diseases.

Keywords: selenium; dog; nutrition, health

Úvod

Selen je polokov, který roku 1817 objevil Jöns Jacob Berzelius. Mnohem dříve, než začal být zkoumán jakožto stopový prvek, přitáhl na sebe pozornost svou toxicitou, a to už ve třicátých letech minulého století s objevením „alkalické choroby“ – chronické otravy selenem, která postihovala především dobytek a koně. O třicet let později bylo do souvislosti s otravou selenem dáno endemické onemocnění lidí, objevující se v některých oblastech Číny. Není se proto čemu divit, že na selen bylo dlouho nahlíženo čistě jako na nebezpečný a toxický prvek. První objev, naznačující biologickou důležitost selenu, učinili v roce 1957 Schwartz a Foltz, když zjistili, že jeho nedostatek u potkanů způsobuje nekrózu jater. Následně bylo zjištěno, že potomci seleno-deficientních potkanů jsou neosrstění, zaostávají v růstu a nerozmnožují se (McCoy, Weswig, 1969). Rotruck et al. (1973) prokázal, že selen je součástí enzymu glutathion peroxidázy a následovalo celé množství studií zabývajících se tímto polokovem.

Zatím co u hospodářských zvířat je doporučený příjem selenu prozkoumaný a na jeho vliv ve výživě vyšlo velké množství studií, u psů se stále jedná o problematiku poměrně novou a s velkým prostorem pro další bádání.

Selen ve výživě psů

Selen je pro psy prvkem esenciálním – jeho příjem je tedy nezbytný pro správné fungování organismu. Jeho nedostatek se projevuje svalovou slabostí, podkožními edémy, anorexií, skleslostí a případně upadnutím do kómatu (van Vleet, 1975). U štěňat i dospělých psů s nedostatečným příjmem selenu bylo dále popsáno rozvinutí kardiomyopatie (van Rensburg, Vening, 1979; Manktelow, 1963). Obecně se ale jedná o uměle vyvolané, nebo ojedinělé případy. V novějších studiích nebyly u dospělých psů ani štěňat krmených dietou s nízkým obsahem selenu zaznamenány žádné klinické příznaky (Wedekind et al., 2004; Yu et al., 2006). Wedekind et al. (2004) určil potřebu pro štěňata biglů pomocí sledování hodnoty selenu v séru na 0,21 mg/kg DM (dry matter – sušiny krmiva). O tuto hodnotu se také opírá doporučení FEDIAF (The European Pet Food Industry), kterým se řídí výrobci komerčních diet pro psy v Evropě, která ovšem spodní limit zvýšila (s ohledem na možnost špatného vstřebávání selenu z komerčního krmiva) pro štěňata a rostoucí psy na 0,40 mg/kg DM. Co se spodního limitu pro dospělé psy týče, žádná přesná data nejsou dostupná. Z toho důvodu je prozatím použita hodnota zjištěná pro dospělé kočky, tedy 0,35 mg/kg DM při příjmu 95 kcal/kg^{0,75} denně, nebo 0,30 mg/kg DM při příjmu 110 kcal/kg^{0,75} denně (FEDIAF, 2019). Yu et al. (2006) zjistili, že

při krmení krmivem obsahujícím méně selenu než 0,12 mg/kg DM dochází ke zpomalení růstu srsti, což naznačuje subklinický nedostatek. Maximální limit je dle FEDIAF (2019) stanoven na 0,568 mg/kg DM. U psů krmených 8 až 9 mg/kg DM (organického i anorganického zdroje selenu) se ale neprojeví žádné klinické příznaky toxicity (Todd et al., 2012), při přesáhnutí 5,04 mg/kg DM selenu se ovšem zpomaluje růst srsti (Yu et al. 2006).

Velmi skloňovanou otázkou je dostupnost selenu z krmiv. Do komerčních diet bývá selen uměle dodáván, a to většinou ve formě seleničitanu sodného (NRC, 2006). Také ovšem může být použit ve své organické formě – jakožto selenomethionin nebo o selen obohacené droždí. U těchto dvou forem fungují jiné cesty vstřebávání – zatímco anorganická forma se ze střeva vstřebává prostou difuzí, organický selen je vstřebáván aktivně pomocí specifických přenašečů (Reasbeck et al., 1985). Obecně se organická forma považuje z krmiva pro zvířata za dostupnější, u psů však nebylo prokázáno, že by se vstřebávala lépe (Todd et al., 2012).

Vztah selenu k patologickým stavům u psů

V poslední době je ve veterinární medicíně psů snaha objasnit souvislost mezi zásobením organismu selenem a výskytem různých patologických stavů. Jedním z oborů je reprodukce. Bylo zjištěno, že suplementace selenu a vitamínu E samcům se sníženou fertilitou vede ke zlepšení kvality semene (Domosławska et al., 2018), na reprodukční ukazatele zdravých samců ovšem nemá vliv (Kirchhoff et al., 2017). Zdá se také, že psi trpící alergiemi mají nižší hladinu selenu v séru než zdraví psi (Pilarczyk et al., 2013) a dále, že se u psů snižuje v průběhu stárnutí (Stowe et al., 2006).

Oborem, který v souvislosti se selenem přitahuje nejvíce pozornosti je onkologie. Waters a Chiang (2018) ve své práci došli k závěru, že suplementace selenem by mohla snižovat riziko rozvinutí rakoviny prostaty. Stejně tak při pokusu na laboratorních myších zpomaluje perorální příjem růst nádorů vycházejících z buněk psí mléčné žlázy (Li et al., 2016). Pilarczyk et al. (2013) potom ve své studii zjistili, že psi s maligními neoplastickými onemocněními mají obecně nižší hladiny selenu v séru. Bude ovšem ještě za potřebí tématice mnohem hlouběji porozumět, abychom mohli pochopit souvislost mezi zásobením selenem a rozvojem neoplazií.

Závěr

Otázka výživy psů a selenu stále není plně objasněna. Bylo by vhodné zpřesnit minimální a maximální limity pro obsah v krmivech. Z tohoto hlediska by bylo také potřeba objasnit vstřebávání jednotlivých forem selenu z různých druhů krmiv. Dále by bylo vhodné stanovit referenční hodnoty selenu v plné krvi a séru, které do dnes nejsou známé, a které by umožnili lepší posouzení dostatečného zásobení selenem z potravy. Velmi zajímavá je oblast dopadu perorální suplementace na zdravotní stav psů, především v oblasti reprodukce a vzniku a rychlosti rozvoje nádorových bujení. Obecně se jedná o problematiku s velkým prostorem pro další výzkum.

Literatura

DOMOSŁAWSKA A.; ZDUNCZYK S.; FRANCZYK M.; KANKOFER M.; JANOWSKI T.; Selenium and vitamin E supplementation enhances the antioxidant status of spermatozoa and improves semen quality in male dogs with lowered fertility. *Andrologia*. 2018, vol. 50, no. 6, e13023

FEDIAF; Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs. 2019, Dostupné z: www.fediaf.org/images/FEDIAF_Nutritional_Guidelines_2019_Update_030519.pdf

KIRCHHOFF K. T.; FAILING K.; GEORICKE-PESCH S.; Effect of dietary vitamin E and selenium supplementation on semen quality in Cairn Terriers with normospermia. *Reproduction in Domestic Animals*. 2017, vol. 52, no. 6, s. 945–952

LI W.; GUO M.; LIU Y.; MU W.; DENG G.; LI C.; QUI C.; selenium induces an anti-tumor effect via inhibiting intratumoral angiogenesis in a mouse model of transplanted canine mammary tumor cells. *Biological trace element research*, 2016, vol. 171, no. 2, s. 371–379

MANKTELOW B. W.; Myopathy of dogs resembling white muscle disease of sheep. *New Zealand Veterinary Journal*. 1963, vol. 11, no. 3, s. 52–55

MCCOY K. E. M.; WESWIG P. H.; Some selenium responses in the rat not related to vitamin E. *The Journal of Nutrition*. 1969, vol. 98, no. 4, s. 383–389

NATIONAL RESEARCH COUNCIL; Nutrient Requirements of dogs and cats, rev. ed. animal nutrition series. 2006, Washington, DC: National academic press. ISBN 978-0-309-48892-1, s. 179–181

PILARCZYK B.; TOMZA-MARCINIAK A., PILARCZYK R., BAKOWSKA m.; GAIK M.; WILK M.; KUBA J.; Relationship between serum Se concentration in dogs and incidence of some disease conditions. *Central European Journal of Biology*. 2013, vol. 8. no. 6, s. 527–533

REASBECK P. G.; BARBEZAT G. O.; F L. Jr.; ROBINSON M. F.; THOMSON C. D.; Selenium absorption by canine jejunum. *Digestive diseases and sciences*. 1985, vol. 30, no. 5, s. 489–494

ROTRUCK J. T.; POPE A. L.; GANTHER H. E.; SWANSON A. B.; HAFEMAN D. G.; HOEKSTRA W. G.; Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. 1973, vol. 179, no. 4073, s. 588–590

SCHWARZ K.; FOLTZ C. M.; Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of the American chemical society*. 1957, vol. 79, no. 12, s. 3292–3293

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, s. 1844–1848

TODD S. E.; BOSCH G.; HENDRIKS W. H.; Selenium status in adult cats and dogs fed high levels of dietary inorganic and organic selenium. *Journal of animal science*. 2012, vol. 90, no. 8, s. 2549–2555

VAN RENSBURG I. B.; VENNING W. J.; Nutritional myopathy in a dog. *Journal of the South African veterinary association*. 1979, vol. 50, no. 2, s. 119–121

VAN VLEET J. F.; Experimentally induced vitamin E-selenium deficiency in the growing dog. *Journal of the American veterinary medical association*. 1975, vol. 166, no. 8, s. 769–774

WATERS D. J.; CHIANG E. C.; Five threads: how U-shaped thinking weaves together dogs, men, selenium, and prostate cancer risk. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018, vol. 127, s. 36–45

WEDEKIND K. J.; YU S.; COMBS G. F.; The selenium requirement of the puppy. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. 2004, vol. 88, no. 9–10, s. 340–347

YU S.; WEDEKIND K. J.; KIRK C. A.; NACHREINER R. F.; Primary hair growth in dogs depends on dietary selenium concentrations. *Journal of animal physiology and Animal nutrition*. 2006, vol. 90, no. 3–4, s. 146–151

Kontaktní adresa: Viola Zentrichová, MVDr., Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42, Brno, H18001@vfu.cz

SEKCE 3

Ochrana zvířat, welfare a etologie

Posouzení příčin brakace telat dle jejich patologických nálezů detekovaných při veterinární prohlídce na jatkách

Assessment of causes of culling calves based on pathological findings detected in post mortem inspection in slaughterhouses

¹Kaluža Michal, ¹Večerek Vladimír, ¹Voslářová Eva, ²Semerád Zbyněk

¹Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Česká republika

²Státní veterinární správa České republiky

Summary

A good level of calf health is a prerequisite for successful cattle breeding. The most common health problems affecting calves are diarrhea and respiratory diseases. The spectrum of characteristic findings detected during the veterinary inspection in the slaughterhouse confirms this fact. Among the possible causes of culling of calves can be considered chronic respiratory diseases, emaciation and reduced weight gain.

Keywords: calf health; diarrhea and respiratory diseases; veterinary inspection; culling reasons

Úvod

Odchov telat je pro chovy mléčného i masného skotu naprosto klíčovým odvětvím. Prosperující a zdravá telata zajišťují generační obměnu stáda. Pro chovatele by tak měla být dobrá úroveň zdraví u telat základní prioritou. Mezi nejvýznamnější zdravotní problémy, které se u telat vyskytují, patří průjmová a respirační onemocnění. Zhang et al. (2019) upozorňují, že tato onemocnění jsou také hlavní příčinou úhynů této kategorie skotu.

Příčinou neplánovaného vyřazování telat z chovu mohou být zdravotní, ale i ekonomické důvody. Posoudit možné příčiny brakace lze nejen dle zdravotních záznamů a konzultace s chovateli, ale také dle samotných výsledků veterinární prohlídky. Ke zhodnocení a praktickému využití jejich poznatků je však nezbytná zpětná vazba z jatek a vzájemná spolupráce chovatelů a veterinárních lékařů (Klink et al. 2015). Zjištěné výsledky pak mohou být podkladem pro plánování preventivních opatření, kterými lze předcházet nuceným brakacím a také ekonomickým ztrátám chovu. Za hlavní příčiny brakace telat zahrnující i utracení a úhyn, uvádějí mnozí autoři průjmová, respirační a kardiovaskulární onemocnění. Cílem této práce je posoudit, do jaké míry souvisejí nejčastější onemocnění a patologické nálezy na jatkách s příčinami brakace telat z chovu.

Materiál a metody

Pro účely této studie byly použity údaje o výsledcích veterinární prohlídky telat poražených na všech jatkách v České republice během období let 2010-2017. Data pro zhodnocení byla získána z odborného informačního systému Státní veterinární správy ČR. V rámci studie byl zhodnocen celkový počet patologických nálezů za sledované období. Následně byly jednotlivé patologické nálezy rozděleny dle charakteru poškození na nálezy akutní, chronické, traumatické, parazitární a jiné. Souvislost nejčastějších onemocnění s výsledky veterinární prohlídky byla dále sledována u nálezů, které byly tříděny dle lokalizace a charakteru poškození. V závěru byly příčiny brakací telat posouzeny dle četností a spektra nejčastějších patologických změn a dle aktuální zdravotní problematiky telat. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí programu Unistat 6.5 for Excel. Pro statistické porovnání četností nálezů byl využit Chí kvadrát test pro hodnocení statistické významnosti v kontingenční tabulce 2x2.

Pro posouzení trendu vývoje v počtu nálezů v rámci sledovaného období byl využit Spearmanův pořadový test.

Výsledky a diskuze

V letech 2010-2017 bylo na jatkách v České republice poraženo 86 049 telat, u kterých se zaznamenalo celkem 139 200 intravitálních patologických změn. Na základě takto vysokého počtu nálezů lze hovořit o zhoršené úrovni zdraví u této kategorie skotu, kdy u každého telete poraženého na jatkách byly detekovány při veterinární prohlídce v průměru jeden až dva nálezy. Při hodnocení trendu vývoje nebyl u telat zjištěn sestupný trend poměru počtu intravitálních nálezů k počtu poražených zvířat ($r_{sp} = -0,191$, $p > 0,05$). Zdravotní problematika telat je tak v České republice z pohledu nálezů na jatkách dlouhodobě nepříznivá. Pro posouzení příčin brakací u telat byly patologické nálezy rozděleny dle charakteru poškození. Z výsledků je patrné, že u poražených telat převažuje chronický charakter nálezů (94,63 %), který poukazuje na vznik onemocnění již v chovech, kdy jsou přítomny po delší dobu klinické příznaky, které mohou vést chovatele k rozhodnutí takového jedince z chovu vyřadit. V souvislosti s možnými příčinami brakací u telat je významná i skupina jiných nálezů (39,07 %), kde se řadí celkové změny, které se rozvíjejí v důsledku přítomných onemocnění, a lze předpokládat, že na rozhodování o vyřazení zvířat mají vliv. Rozvoj prvotních klinických příznaků je spojen s poskytnutím adekvátní terapie a péče. V případě neúspěchu mohou telata při těžkém průběhu onemocnění uhynout nebo jsou utracena. Z tohoto důvodu akutní průběh onemocnění nelze považovat za důvod k brakaci telat na jatka, což potvrzují i výsledky této studie. Nálezy akutního charakteru (27,42 %) nebyly v tak vysokých četnostech zaznamenány. Určitou míru výskytu akutních nálezů na jatkách je možné interpretovat přítomností mírného průběhu onemocnění v chovu nebo rozvojem příznaků až při samotném transportu na jatky.

V rámci této studie bylo dále posuzováno, zda lokalizace a charakter nálezů odpovídá hlavním příčinám onemocnění u telat. Za rizikové je považováno období mléčné výživy telat, kdy se formuje imunitní systém. V průběhu prvního měsíce života jsou telata nejvíce ohrožena rozvojem diarrhoického syndromu. Respirační syndrom se rozvíjí v návaznosti nebo současně s průjmovým onemocněním, a to zpravidla při přechodu telat z mléčné na rostlinnou výživu. Ke klinickým projevům patří mírné příznaky zahrnující rinitidu a laryngeotracheitidu. Mohou se ale rozvinout i těžké pneumonie. Z výsledků této studie je patrné, že z pohledu nálezů představují respirační onemocnění v řadě chovu pro telata nejzávažnější zdravotní problémy. Potvrdilo se, že nejčastěji byly zaznamenány právě nálezy na plicích (46,25 %) a to chronického charakteru (37,91 %). Je nutné uvést, že k úplné rekonvalescenci při chronickém respiračním postižení nedochází, což se projevuje na vitalitě i užitkovosti odchovávaných telat (Bojkovski et al. 2014). S vysokou četností byly rovněž zjišťovány jiné intravitální změny (24,30 %) a celkové změny (21,19 %), mezi které lze zařadit např. vyhublost (17,27 %) nebo zakrslost (2,86 %). Četné nálezy byly detekovány rovněž na ledvinách (17,44 % zvířat) a na játrech (16,43). Je prokázáno, že telata mají po narození citlivější kardiorepirační systém a také metabolismus (Bojkovski et al. 2014), s čímž mohou souviset i patologické změny pozorované také na srdci (9,35 %). Pouze v nízkých četnostech byly ale u telat zaznamenány nálezy na žaludcích a střevech (3,64 % zvířat). K obdobným závěrům dospěli i Blanco-Penedo et al. (2012), kteří zaznamenali nejčastěji léze na plicích (25,71 %), játrech (14,09 %) a ledvinách (11,31 %). Autoři rovněž uvádějí, že nálezy v trávicím traktu nejsou zcela běžné (5,75 %).

Největší riziko představují pro telata ve věku do dvou týdnů akutní střevní infekce. Profuzní vodnatý průjem může vést k výrazným ztrátám tekutin a k metabolickým poruchám. Bez časné rehydratace hrozí selhávání orgánů. Pro telata s takovouto diagnózou tak brakace na jatka nepřipadá v úvahu. Zhang et al. (2019), ale i další autoři uvádějí, že průjmová onemocnění představují hlavní příčinu úhynů telat před odstavem. Chronický průběh průjmových, ale

i respiračních onemocnění se negativně projevuje na metabolických orgánech, což potvrzují i výsledky této studie. Kromě nálezů na játrech a ledvinách doprovází specifické klinické příznaky těchto onemocnění i nechutenství, slabost nebo apatie. Telata neprospívají, zpomaluje se u nich růst a trpí kachexií. To vyplývá i z této studie, kdy vyhublost nebyla u telat nálezem ojedinělým. U respiračních onemocnění je nutné zvažovat i subklinický průběh, kdy příčiny sníženého přírůstku nemusí být v chovu vůbec zjištěny. Často se tak skutečná příčina potvrdí po brakaci telat, a to až na jatkách při odhalení plicních lézí.

Závěr

V České republice je zdravotní problematika telat z pohledu trendu celkového počtu nálezů dlouhodobě nepříznivá. Závažný zdravotní, ale i ekonomický problém představují v chovech diarrhoický a respirační syndrom, což potvrzují i výsledky veterinární prohlídky. Převažující chronický charakter nálezů poukazuje na skutečnost, že k brakaci telat přistupují chovatelé převážně při dlouhodobém výskytu klinických příznaků. Cílem chovatelů je v první řadě vždy zabránit ztrátám telat adekvátní terapií a souborem preventivních zoohygienických opatření. U průjmového syndromu vede neúspěšná terapie k úhynu nebo k utracení telat. Samotná průjmová onemocnění lze tak z příčin brakací spíše vyloučit. V případě respiračních onemocnění, u kterých převažuje chronicita, může být zvažováno, zda dlouhodobá léčba s nejistým výsledkem má pro chovatele z pohledu ekonomiky význam. Je nutné uvést, že mezi nežádoucí projevy respiračních, ale i průjmových onemocnění patří kromě klinických příznaků ztráty vitality, také neprospívání, které se manifestuje nálezy zahrnujícími snížený přírůstek a vyhublost. Vyhublá a neprospívající telata, která prodělala závažný průběh onemocnění, navzdory zotavení již nikdy nedosáhnou užitkovosti a kondice zdravých telat v chovu. Vyhublost, chronicitu respiračních onemocnění a snížený přírůstek lze tak zařadit mezi hlavní možné příčiny brakací u telat. Více než zdravotní důvody je tedy nutné u telat zvažovat u příčin vyřazování důvody ekonomické. Prodloužená délka výkrmu, riziko ztráty užitkovosti v budoucnu nebo zhoršená kvalita jatečného těla jsou hlavní aspekty, které u léčených nebo již uzdravených telat rozhodují o jejich dalším využití v chovu.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena ITA VFU Brno (FVHE/Večerek/ITA2019).

Literatura

BLANCO-PENEDO, I.; LÓPEZ-ALONSO, M.; SHORE, R. F.; MIRANDA, M.; CASTILLO, C.; HERNÁNDEZ, J.; BENEDITO, J. L. Evaluation of organic, conventional and intensive beef farm systems: health, management and animal production. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*. 2012, vol. 6, no. 9, s. 1503–1511.

BOJKOVSKI, J. A.; MILANOV, D.; SAVIĆ, S.; VASIĆ, A.; ZDRAVKOVIĆ, N.; ROGOŽARSKI, D.; PROKIĆ, N.; KORICA, S. Respiratory Diseases of Calves on Dairy Cow Farm. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*. 2014, vol. 71, no. 2, s. 313–320.

KLINK, E.; PRESTMO, P.; GRIST, A. Animal Health and Disease Monitoring in the Abattoir. *Livestock*. 2015, vol. 20, no. 6, s. 330–335.

ZHANG, H.; WANG, Y.; CHANG, Y.; LUO, H.; BRITO, L. F.; DONG, Y.; SHI, R.; WANG, Y.; DONG, G.; LIU, L. Mortality-Culling Rates of Dairy Calves and Replacement Heifers and Its Risk Factors in Holstein Cattle. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*. 2019, vol. 9, no. 10, s. 1–11.

Kontaktní adresa: Michal Kaluža, MVDr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, kaluzam@vfu.cz

Možnosti využití pedometrů k hodnocení welfare dojnic

Possibilities of using pedometers to evaluate welfare of dairy cows

Renčínová Vendula, Voslářová Eva, Večerek Vladimír

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

Summary

Pedometers are often used by farmers only to a limited extent, mainly to evaluate physical activity to detect estrus in dairy cows. However, their potential is much higher. Pedometers can be effectively used also to detect welfare disruption in cattle, namely impaired health due to hoof or mammary gland diseases. The paper summarizes current scientific knowledge of the use of pedometers for dairy cow welfare assessment.

Keywords: *pedometer; welfare; activity; mastitis; laminitis*

Úvod

Změny chování zvířat jsou pro chovatele důležitým indikátorem k odhalení počínajících zdravotních problémů či jiného narušení welfare. Chovatelé se začali více zabývat sledováním pohybové aktivity dojnic v souvislosti s vyhledáváním říjících se krav, kdy vzrůstá jejich pohybová aktivita. Hodnocení změn denní aktivity je užitečné nejen k identifikaci říje, ale také k hodnocení welfare, zejména z pohledu výskytu bolesti a nepohodlí způsobených změnami zdravotního stavu. Pedometry slouží k záznamu pohybové aktivity. Měřič pohybů umístěný na končetině je schopen detekovat dobu ležení, stání, chůze, počet kroků, počet vstání. Data z pedometrů pomáhají chovateli analyzovat různé aplikace. Pravidelné vyhodnocování výsledků a tedy analýza aktivity skotu v reálném čase může poskytnout užitečné informace pro včasnou detekci nemoci, a tím snížit její negativní účinek, zvýšit šanci na úspěšnost léčby a zabránit tomu, aby se nemoc stala chronickou. Včasná identifikace diskomfortu u dojnic má dopady nejen na welfare ale také na ekonomiku chovu skotu.

Cílem práce bylo poukázat na možnosti využití pedometrů k hodnocení denní aktivity dojnic, které mohou pomoci odhalit onemocnění a včasnou diagnostikou zlepšit jejich welfare.

Možnosti využití pedometrů k hodnocení welfare dojnic

Krávy mají cirkadiánní rytmy, utvářené cykly světlo-tma a činnostmi jako je např. čištění stání (Veisier et al., 2017). Gomez and Cook (2010) zjistili, že dojnice denně stráví průměrně 11,9 hodin odpočinkem, 4,4 hodin krmením, 2,5 hodiny stáním v uličkách a 2,7 hodin společně při procesu dojení. Veisier et al. (2017) uvádějí, že cirkadiánní vzorce se změnily, když se kráva cítila špatně (kulhání nebo mastitida). Dojnice s laminitidou vykazovaly v průběhu dne menší celkové kolísání úrovně aktivity. Krávy s mastitidou vykazovaly vyšší aktivitu během dne, ale nižší aktivitu během večera. Vzorce chování se mění 1 až 2 dny před tím, než se projeví viditelné příznaky onemocnění. Monitorování cirkadiánních vzorců činností může sloužit jako systém včasného varování pro „podezřelé“ dojnice. Mastitida spolu s kulháním je pravděpodobně onemocnění s největším dopadem na pohodu krav.

Faktorem ovlivňujícím kvalitu života dojnice jsou zdravé paznehty. Skot je náchylný ke kulhání při chůzi a stání na mokré podlaze ve stájích (Mill and Ward, 1994). Poranění a onemocnění způsobující kulhavost je jedním z nejzávažnějších zdravotních problémů ovlivňujících welfare dojnic. Často jsou důvodem k vyřazení zvířete. Včasná detekce a zahájení léčby jsou tedy nezbytné. Sárová et al. (2011) zjistili, že laminitida u dojnic je vedoucími pracovníky mléčných farem skotu silně podceňována. Podíl kulhajících krav pozorovaných na farmě (tj. prevalence

mírného a těžkého kulhání) kolísal mezi 9 a 64 %, zatímco odhady odpovědných pracovníků se pohybovaly mezi 0 a 20 %. Velká odchylka v pozorované a odhadované prevalenci kulhání ukazuje na nutnost zlepšit identifikaci kulhání u mléčných krav. Green et al. (2010) zkoumali souvislost mezi užitkovostí a lézemi na končetinách způsobujícími kulhání a došli k závěru, že léze způsobující kulhání snížily užitkovost dojnic. Bolest, kterou zažívá dojnice při onemocnění paznehtu, je často maskována instinktivním chováním, což vede ke zpožděné vizuální detekci a léčbě kulhání (Gomez and Cook, 2010). **Nezjištěná laminitida může s nepříznivou prognózou postupovat do vážnějšího a bolestivějšího stavu.** Dojnice, které pociťují bolest, se odchylují od svého normálního chování změnou aktivity. Ve srovnání se zdravými kravami vykazovaly kulhající krávy nižší denní aktivitu ($P < 0,001$) (Callaghan et al., 2003). Mazriera et al. (2006) zjistili, že u 92 % krav, u kterých se vyvinula klinická laminitida, došlo k poklesu pedometrické aktivity o 15 %. Zvýšení doby ležení je určující pro diagnostiku kulhání (Ito et al., 2010). Akcelerometrie je spolehlivý a užitečný nástroj k detekci chování při stání a ležení. Detekce chování při ležení a stání byla založena na odhadech úhlu krokoměru. Algoritmus chůze vybral parametry z měření trojrozměrného akcelerometru. Odhad délky kroku a trvání kroku představuje další důležitý parametr pohybové aktivity krav (Munksgaard et al., 2006; O'Driscoll et al., 2008; Nielsen et al., 2010). Flower et al. (2005) zjistili, že chromé krávy mají delší trvání kroku a kratší délku kroku ve srovnání se zdravými kravami pomocí kinematické analýzy chůze.

Dalším faktorem ovlivňujícím významně welfare dojnic je zánět mléčné žlázy, s jehož včasnou diagnostikou může chovatelům pomoci také hodnocení aktivity dojnic. Galarza et al. (2012) zjistili, že mastitida vedla ke zkrácení času stráveného ležením, zvýšené preferenci pro ležení na jedné straně a ke zvýšenému neklidnému chování během dojení. Mastitidní krávy trávily méně času ležením ve srovnání s kontrolními kravami. Mírná klinická mastitida nemusí způsobit dostatečnou bolest k pozorování výrazných změn v chování. Chapinal et al. (2010) uvádějí, že k detekci bolesti spojené s mastitidou může být nezbytné vyhodnotit různá behaviorální opatření. Hodnocení odpočinku v leže a lateralita jsou důležitými opatřeními pro pohodu a pohodlí krav (Forsberg et al., 2008; O'Driscoll et al., 2008). Je možné, že mastitidní krávy mohou mít sníženou motivaci k ležení ve srovnání se zdravými kravami kvůli bolesti, kterou cítí na vemeni. Siivonen et al. (2011) kromě zjištění, že krávy s experimentálně indukovanou mastitidou měly sklon trávit méně času vleže ($P < 0,07$), také zjistily, že mastitidní krávy vykazovaly v den indukce vyšší pohybovou aktivitu ($P = 0,02$) než kontrolní den (1. den) před indukci. Také tyto informace lze získat pomocí údajů z pedometru.

Závěr

Každodenní práce v chovu hospodářských zvířat je velmi náročná, ale různé moderní aplikace ji mohou chovatelům v mnohém usnadnit. Monitorování údajů na mléčné farmě umožňuje průběžnou kontrolu produkce, zdraví a welfare zvířat. Znalost možností využití hodnocení aktivity dojnic by měla vést ke zlepšení jejich životních podmínek a to včasným odhalením začínajícího onemocnění končetin nebo mléčné žlázy a tím snížením nákladů nejen na léčbu, ale v některých případech i ztrátě dojnice jejím vyřazením z důvodu těchto onemocnění.

Literatura

O'CALLAGHAN, K.A.; CRIPPS, P.J.; DOWNHAM, D.Y.; MURRAY, R.D. Subjective and objective assessment of pain and discomfort due to lameness in dairy cattle. *Animal Welfare*. 2003, vol. 12, no. 4, s. 605–610.

O'DRISCOLL, K.; BOYLE, L.; HANLON, A. A brief note on the validation of a system for recording lying behaviour in dairy cows. *Applied Animal Behaviour Science*. 2008, vol. 111, no. 1–2, s. 195–200.

FLOWER, F.C.; SANDERSON, D.J.; WEARY, D.M. Hoof pathologies influence kinematic measures of dairy cow gait. *Journal of Dairy Science*. 2005, vol. 88, no. 9, s. 3166–3173.

- FORSBERG, A.M.; PETTERSON, G.; LJUNGBERG, T.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. A brief note about cow lying behavior - Do cows choose left and right lying side equally? *Applied Animal Behaviour Science*. 2008, vol. 114, no. 1–2, s. 32–36.
- GALARZA, C.M.; GIBBONS, J.; WAGNER, S.; DE PASSILLÉ, A.M.; RUSHEN, J. Behavioral changes in dairy cows with mastitis. *Journal of Dairy Science*. 2012, vol. 95, no. 12, s. 6994–7002.
- GOMEZ, A.; COOK, N.B. Time budgets of lactating dairy cattle in commercial herds. *Journal of Dairy Science*. 2010, vol. 93, no. 12, s. 5772–5781.
- GREEN, L.E.; BORKERT, J.; MONTI, G.; TADICH, N. Associations between lesion-specific lameness and the milk yield of 1,635 dairy cows from seven herds in the Xth region of Chile and implications for management of lame dairy cows worldwide. *Animal Welfare*. 2010, vol. 19, no. 4, s. 419–427.
- CHAPINAL, N.; DE PASSILLÉ, A.M.; RUSHEN, J.; VAGNER, S.A. Automated methods of detecting lameness and measuring analgesia in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 2010, vol. 93, no. 5, s. 2007–2013.
- ITO, K.; VON KEYSERLINGK M.; LEBLANC, S.; WEARY, D. Lying behavior as an indicator of lameness in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2010, vol. 93, no. 8, s. 3553–3560.
- KLAAS, I.C.; ROUSING, T.; FOSSING, C.; HINDHEDE, J.; SORENSSEN, J.T. Is lameness a welfare problem in dairy farms with automatic milking systems? *Animal Welfare*. 2003, vol. 12, no. 4, s. 599–603.
- MAZRIER, H.; TAL, S.; AIZINBUD, E.; BARGAI, U. A field investigation of the use of the pedometer for the early detection of lameness in cattle. *The Canadian Veterinary Journal*. 2006, vol. 47, no. 9, s. 883–886.
- MILL, J.M.; WARD, W.R. Lameness in dairy cows and farmers' knowledge, training and awareness. *Veterinary Record*. 1994, vol. 134, no. 7, s. 162–164.
- MUNKSAGAARD, L.; REENEN, C.G.; BOYCE, R. Automatic monitoring of lying standing and walking behavior in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 2006, vol. 89, s. 304.
- NIELSEN, L.R.; PEDERSEN, A.R.; HERSKIN, M.S.; MUNKSGAARD, L. Quantifying walking and standing behaviour of dairy cows using a moving average based on output from an accelerometer. *Applied Animal Behaviour Science*. 2010, vol. 127, no. 1–2, s. 12–19.
- SÁROVÁ, R.; STÉHULOVÁ, I.; KRATINOVÁ, P.; FIRLAM P.; ŠPINKA, M. Farm managers underestimate lameness prevalence in Czech dairy herds. *Animal Welfare*. 2011, vol. 20, s. 201–204.
- SIIVONEN, J.; TAPONEN, S.; HOVENEN, M.; PASTELL, M.; LENSİK, B.J.; PYÖRÄLÄ, S.; HÄNNINEN, L. Impact of acute clinical mastitis on cow behaviour. *Applied Animal Behaviour Science*. 2011, vol. 132, no. 3–4, s. 101–106.
- VEISIER, I.; MIALON, M.M.; SLOTH, K.H. Short communication: Early modification of the circadian organization of cow activity in relation to disease or estrus. *Journal of Dairy Science*. 2017, vol. 100, no. 5, s. 3969–3974.

Kontaktní adresa: Vendula Renčínová, Mgr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H13020@vfu.cz

Hodnocení stresové zátěže ovcí během praktické výuky

Evaluation of sheep stress during practical lesson

Urbanová Monika, Chloupek Petr, Doubková Veronika,
Rozkydalová Michaela, Popelková Tereza, Tšponová Zuzana

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

Summary

The study evaluated the level of stress before and after the practical training in sheep's stable during education. Monitored stressor was exercises consisted of basic manipulation, fixation and clinical examination. The level of stress was evaluated by determining cortisol in saliva samples through enzymimmuno assays commercial kit. The values before and after exercise were comparing and a statistically significant differences were proven.

Keywords: *salivary cortisol; noninvasive monitoring; ELA; animal stress*

Úvod

Praktická výuka budoucích veterinárních lékařů na zvířatech je bezpodmínečně nutná k získání praktických dovedností a je důležité osvojit si je do takové míry, že budou považovány za rutinní. Studenti umí manipulovat se psy a kočkami nebo hlodavci, protože to jsou zvířata, se kterými se snadno dostanou do kontaktu. Odlišná je situace v případě hospodářských zvířat, kterých dlouhodobě ubývá. K prvnímu seznámení mnohdy dochází až v rámci praktické výuky.

Některé rutinní manipulační postupy mohou u hospodářských zvířat vyvolat stres (Grandin and Shivley, 2015). Je důležité rozpoznat stresory a minimalizovat jejich negativní vliv, aby se zabránilo negativním účinkům na zdraví a produkci zvířat. Referenčním biochemickým indikátorem stresu je hormon kortizol, tzv. stresový hormon (Palme and Mostl, 1997; Fuentes-Rubio et al., 2016). Hodnotu kortizolu můžeme zjistit ze vzorku krve, ale jsou i jiné způsoby. Můžeme využít možností tzv. neinvazivního odběru vzorků, vzorkem může být např. feces (Palme and Mostl, 1997), velmi snadno se u ovcí získává srst (Stubjoen et al., 2015) nebo sliny (Fell et al., 1985).

Množství slinného kortizolu odpovídá množství tzv. volné frakce kortizolu v krvi, jenž je biologicky aktivní a tvoří asi 10 % celkového kortizolu v krvi u dospělých ovcí (Fell et al., 1985). Fell et al. (1985) ve své studii uvádí rozsah bazálních hodnot volného kortizolu v rozmezí od 180 - 2 537 pg/ml. Ve studii upozorňuje, že vlivem cirkadiálních rytmů dochází ke kolísání bazálních hodnot kortizolu a může dojít k fyziologickému zvýšení hladiny kortizolu u nestresovaných ovcí o 362 – 1 812 pg/ml volné frakce. Nejnížší hladiny byly zjištěny kolem poledne. Z tohoto důvodu uvádí, že koncentrace volného kortizolu u nestresovaných ovcí by měla být do 3 625 pg/ml (Fell et al., 1985).

Zvýšená hladina kortizolu je detekovatelná ve slinách po cca 15 - 30 minutách od vystavení stresu (Fell et al., 1985; Fuentes-Rubio et al., 2016). Je-li ovce vystavena štěkotu psa, může dosahovat hladina kortizolu ve slinách průměrné hodnoty 13 000 pg/ml (Fuentes-Rubio et al., 2016). V experimentu Contreras-Aguilar et al. (2018) bylo stresem stříhání, zde opět došlo ke zvýšení slinného kortizolu z výchozí hodnoty před stříháním 6 000 - 8 500 až na 14 000 pg/ml 30 minut po ostříhání. Po vystavení ovcí 30 min trvajícím transportu, se hladina slinného kortizolu může zvýšit až na $79\,387 \pm 1\,015$ pg/ml (Fell et al., 1985). Koncentrace kortizolu byly obvykle nižší u ovcí, které byly chovány v ovčíně a více znají manipulační postupy než u venku se pasoucích zvířat (Purchas, 1973).

Cílem studie bylo zjistit, zda dochází k elevaci stresového hormonu kortizolu ve slinách po stresové zátěži, která může být vyvolána v důsledku praktického cvičení na ovcích, které bylo zaměřené na klinické vyšetření spojené s nezbytnou manipulací a fixací. Dalším cílem bylo zjištění, zda dochází po opakovaném vystavení stejnému stresoru k navykání si ovcí na danou situaci.

Materiál a metodika

Stanovení stresové zátěže proběhlo na 10- ti kusech ovcí, které byly ve věku od 2 do 10 roků. Ovce pocházely z chovu VFU Brno. Ve stáji zvířetníku byly ovce umístěny ve 2 kotcích po 5 kusech na hluboké slaměné podestýlce. Voda je poskytována prostřednictvím napáječek, denně jsou krmeny lučným senem, k dispozici mají solný liz. Teplota ve stáji se pohybovala mezi 12 až 17 °C, relativní vlhkost vzduchu byla v rozmezí 45- 60 %.

Jako stresor bylo vybráno praktické cvičení studentů VFU Brno ovcích zaměřené na klinické vyšetření spojené s nezbytnou manipulací a fixací, jehož se účastnilo 6 studentů. Ihned po příchodu studentů do stáje byly odebrány vzorky slin. Vatovými tampony byla vytřena dutina ústní, tyto tampony poté byly centrifugovány (3 min, při 16 000 g, 15 °C). Sliny byly odsáty do zkumavky Eppendorf a ihned chlazeny. Po příchodu do laboratoře byly vzorky zmrazeny a udržovány až do další analýzy při teplotě - 80 °C. Tento odběr se opakoval na závěr praktického cvičení. Tímto způsobem byla během dvouměsíčního období monitorována 3 praktická cvičení, takže bylo získáno 6 sad vzorků.

Stanovení kortizolu ve slinách bylo provedeno pomocí enzymoimunoanalýzy za použití komerčního kitu (Cortisol EIA Kit, BosterBio, Kalifornie, USA). Kvantitativní kalometrická detekce kortizolu byla detekována readerem při vlnové délce 450 nm. Výsledky byly stanoveny po odečtení ze standardní křivky, která byla navržena v programu ELISA Software free.

Statistické zpracování výsledků bylo provedeno pomocí statistického softwaru UNISTAT pro Excel verze 6.5. Hodnoty naměřené před praktickým cvičením a v závěru byly vyhodnoceny pomocí párového Studentova t-testu. Celkové zhodnocení 2 měsíčního monitoringu bylo provedeno dvoufaktorovou analýzou rozptylu s opakovaným měřením.

Rozdíly byly považovány za statisticky významné, když pravděpodobnost nulové hypotézy byla menší než 0,05 (tj. $p < 0,05$) a vysoce významné, pokud pravděpodobnost nulové hypotézy byla menší než 0,01 (tj. $p < 0,01$). Za statisticky nevýznamný výsledek byl označen výsledek, když pravděpodobnost nulové hypotézy byla větší než 0,05 (tj. $p > 0,05$).

Výsledky a diskuse

Proběhlé cvičení mělo významný vliv na hladinu kortizolu ve slinách ovcí. Před zahájením prvního cvičení byla průměrná hodnota 3 749,4 pg/ml a následně po proběhlém praktickém cvičení se tato hodnota zvýšila na 5 568,4 pg/ml, tento vzestup byl statisticky vysoce významný ($p < 0,01$). Výchozí hodnota slinného kortizolu před 2. cvičením byla 3 079,9 pg/ml a poté vystoupala na 4 050,3 pg/ml, byl prokázán statistický významný vzestup ($p < 0,05$). Při třetím cvičení došlo ke zvýšení z výchozí hodnoty 2 773,6 pg/ml na 6 167,3 pg/ml i zde bylo prokázáno statisticky významné zvýšení ($p < 0,05$).

Přestože tyto ovce jsou zvyklé na výskyt ošetřovatelů ve stáji a pravidelnou manipulaci, proběhlé cvičení pro ně bylo stresorem. Průměrné výchozí hodnoty, zjištěné v naší studii jsou nepatrně vyšší při porovnání s bazálními hodnotami, které uvádí Fell et al. (1985). Působením stresu dochází k vzestupu koncentrací slinného kortizolu. Také v našich výsledcích je patrný vzestup slinného kortizolu, ovšem zvýšení nedosahuje 2 – 3 násobného zvýšení jako při vystavení ovcí štěkotu (Fuentes-Rubio et al., 2016). Transport je ještě silnější stresor, protože

dochází k více jak desetinásobnému zvýšení hladiny kortizolu (Fell et al., 1985) v porovnání s naší studií. Proto hodnotím stresovou zátěž jako mírnou.

Vzhledem k tomu, že odběry proběhly opakovaně v průběhu 2 měsíců, bylo dalším cílem prokázat, zda dochází ke změnám v průběhu této doby. Faktor času se hodnotil z důvodu možného přivyknutí si na tento stresor. Výsledek analýzy byl statisticky nevýznamný ($p > 0,05$). Vliv času nebyl prokázán, během této doby nedošlo ke zvykání si na sledovaný stresor. Mírný pokles hodnot byl patrný při porovnání výsledku prvního a druhého cvičení. Po třetím praktickém cvičení byl výrazný nárůst hodnoty kortizolu, průměrná hodnota byla dokonce vyšší než po prvním cvičení, u kterého byl předpoklad největšího stresového zatížení. Tento nárůst byl zřejmě ovlivněn výskytem říjící se samice ve stádě se skopcem, který začal projevoval prvky agrese. Jeho pokusy o trkání znesnadňovaly manipulaci s dalšími ovci a zvyšovala se nervozita ve stáji. Hodnota kortizolu ve slinách u skopce vzrostla téměř čtyřnásobně během cvičení v porovnání s hodnotou před začátkem praktického cvičení.

Závěr

Ačkoliv ovce byly zvyklé od svých ošetřovatelů na pravidelnou manipulaci a fixaci, ve studii bylo prokázáno, že klinické vyšetření spojeno s manipulací a fixací prováděná během praktického cvičení skupinou studentů je stresorem. Stresová zátěž byla hodnocena jako mírná.

Literatura

CONTRERAS-AGUILAR, M. D., ESCRIBANO, D., QUILES, A., LÓPEZ-ARJONA, M., CERÓN, S., MARTÍNEZ-SUBIELA, S., HEVIA, M. L. AND TECLES, F., 2018. Evaluation of new biomarkers of stress in saliva of sheep. *Animal*, vol. 13, no. 6, s. 1278–1286.

GRANDIN, T., SHIVLEY, C., 2015. How Farm Animals React and Perceive Stressful Situations Such As Handling, Restraint, and Transport. *Animals (Basel)*. 2015, vol. 5, s. 1233-51.

FELL, L.R., SHUTT, D.A. AND BENTLEY, C.J. Development of a salivary cortisol method for detecting changes in plasma “free” cortisol arising from acute stress in sheep. *Australian Veterinary Journal*. 1985, vol. 62, s. 403-406.

FUENTES-RUBIO, M., FUENTES, F., OTAL, J., QUILES, A., HEVIA, M. L. Validation of an assay for quantification of alpha-amylase in saliva of sheep. *Canadian journal of veterinary research*, 2016 vol. 80, no. 3, s. 197-202.

PALME, R., MOSTL, E. (1997): Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. *Z. Säugetierkd. – Int. J. Mammal. Biol.* 1997, vol. 62, s. 192-197.

PURCHAS, R. The Response of Circulating Cortisol Levels in Sheep to Various Stresses and to Reserpine Administration. *Australian journal of biological sciences*, 1973, vol. 26, no. 2, s. 477-489.

STUBSJOEN, SM., BOHLIN, J., DAHL, E., KNAPPE-POINDECKER, M., FJELDAAS, T., LEPSCHY, M., PALME, R., LANGBEIN, J., ROPSTAD, E. Assessment of chronic stress in sheep (part I): The use of cortisol and cortisone in hair as non-invasive biological markers. *Small Ruminant Res.* 2015, vol. 132, s. 25-31.

Kontaktní adresa: Urbanová Monika, MVDr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VFU Brno, Palackého 1946/1, 612 42 Brno, Česká republika, H17327@vfu.cz

Hodnocení welfare nosnic na úrovni hejna

Assessment of laying hen welfare at flock level

Křivánková Tereza, Večerek Vladimír, Voslářová Eva

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

Summary

Behavior of birds reflects their welfare and thus can serve for welfare assessment of birds housed in different housing systems. The aim of the study was to compare behavior of laying hens housed in aviaries and furnished cages. Behavioral assessment of the birds was performed in Lohman Brown laying hens at 45 weeks of age. Hens in aviaries exhibited more agonistic behavior and individual assessment revealed also more peck wounds and worse plumage in aviary hens than in hens housed in furnished cages.

Keywords: *expres of behavior; enriched cages; aviaries; ethology*

Úvod

Projevy chování zvířat mnoho vypovídají o úrovni welfare v chovu (Hansen and Jeppesen, 2006). U nosnic se při hodnocení welfare sledují hlavně projevy komfortního chování jako je např. popelení, které je považováno i za důležité sociální chování (Louton et al., 2016). Dále projevy agrese, strachu a explorační. Individuálním posouzením kondice lze u nosnic hodnotit mimo jiné i výskyt klovaní peří a projevy agresivity (Abrahamsson and Tauson, 1995). Tyto nežádoucí projevy chování zanechávají na klovaných jedincích viditelné poškození (El-Lethey et al., 2000).

Cílem práce bylo srovnat chování nosnic ve voliérách a v obohacených klecích.

Materiál a metody

Na základě protokolu Welfare Quality® Assessment Protocol for Poultry byly srovnány projevy chování nosnic Lohman Brown ve věku 45 týdnů ustájených ve voliérách a obohacených klecích ve vybraném chovu v České republice. Nosnice v obou systémech ustájení pocházely ze stejného odchovu. Mikroklimatické podmínky byly řízeny centrálně a nastaveny shodně pro obě haly. Péče o nosnice byla poskytována stejnými zaměstnanci s prohlídkou ve shodných intervalech. Nosnice byly krmeny stejnou krmnou směsí (syvká směs na bázi pšenice, kukuřice a šrotu). Technologie voliérového ustájení: NATURA70 (Big Dutchman) o rozměrech: šířka 24,5 m, délka 98,03 m, výška 3 m, využitelná plocha voliéry 2127,38 m². Do každé voliéry bylo naskladněno 37 900 kuřic. Technologie obohacených klecí: DKG Hostivice s. r. o. (ČR) o rozměrech: šířka 155 cm, délka 237 cm, výška 50 cm, počet max. 72 nosnic v jedné kleci.

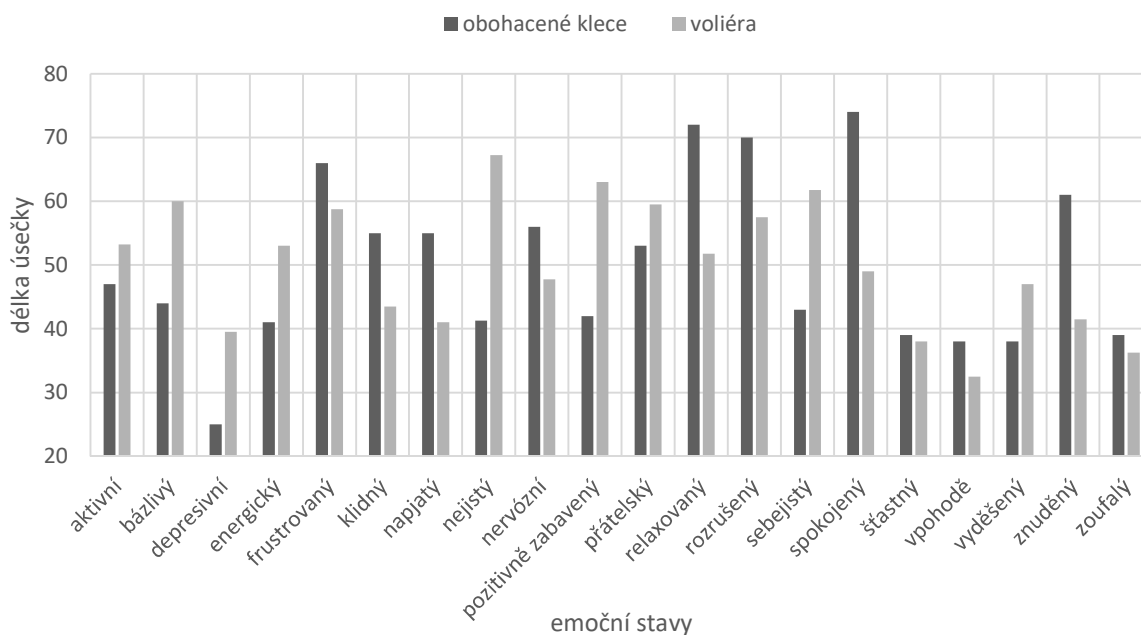
V každém typu ustájení byly pozorováním hodnoceny projevy chování na úrovni hejna a následně proběhlo individuální hodnocení náhodně vybraných 15 nosnic z každého systému ustájení. Při hodnocení byla použita následující stupnice: 0 = žádný nález, 1 = nález malého rozsahu, 2 = nález velkého rozsahu. Na úrovni hejna byly hodnoceny následující parametry: výskyt projevů agresivního chování, využívání podestýlky, využívání enrichmentu, využívání snáškových hnízd. V rámci individuálního hodnocení byly hodnoceny následující parametry: poškození hřebínku vlivem klovaní a poškození peří. Stupeň poškození peří byl nejprve hodnocen pro jednotlivé oblasti na těle nosnice (krk/záda/kloaka) písmeny A = žádné nebo mírné poškození, B = střední poškození v rozsahu menším jak 5 cm, C = oblast poškození či absence peří je rozsáhlejší než 5 cm. Následně byl vyjádřen celkový stav opeření: 0 = všechny

části těla byly hodnoceny A, 1 = jedna nebo více částí bylo hodnoceno B, ale žádná C, 2 = jedna nebo více částí bylo hodnoceno C. Kvalitativní hodnocení chování bylo provedeno na základě analýzy videozáznamů podle metodiky uvedené v protokolu Welfare Quality® Assessment Protocol for Poultry.

Statistické hodnocení výsledků proběhlo v programu Unistat 5.6 for Excel (Unistat Ltd., London, UK). V první fázi bylo provedeno testování normality dat s využitím Shapiro-Wilkova testu (Zar, 1999). Jestliže data nevykazovala normální rozdělení, byl použit Mann-Whitneyův pořadový test. Hladina statistické významnosti byla určena $p < 0,05$.

Výsledky a diskuze

Z individuálního hodnocení nosnic vyplývá, že nosnice ve voliérách (skóre $0,9 \pm 0,18$) měly významně více ($p = 0,017$) poškozené hřebínky od klování ostatních nosnic než nosnice v obohacených klecích (skóre $0,2 \pm 0,14$). Nosnice chované ve voliérách (skóre $1,8 \pm 0,1$) měly také významně horší ($p = 0,001$) celkový stav opeření než nosnice chované v obohacených klecích (skóre $0,93 \pm 0,23$). Špatný stav opeření u mladých nosnic může souviset s nevyhovující technologií ustájení (Taylor and Hurnik, 1994), výživou (Van Krimpen et al., 2007) nebo klováním peří (Bilcik and Keeling, 1999).



Graf 1. Kvalitativní hodnocení chování u nosnic z voliér a obohacených klecí.

Při pozorování projevů chování na úrovni hejna bylo v obou typech ustájení zjištěno, že nosnice nevyužívaly podestýlku, protože podestýlka nebyla přítomna ani v jednom typu ustájení. Rozdíly nebyly zjištěny ani ve využívání snáškových hnízd: hnízda byla k dispozici v obou typech ustájení, rozmístění hnízd v obou systémech bylo rovnoměrné. Nosnice v obohacených klecích neměly k dispozici žádný enrichment. Nosnice ve voliérách měly k dispozici obohacení prostředí v podobě zavěšených barevných kyblíků, ale pozornost enrichmentu věnovalo méně jak 50 % nosnic. U nosnic chovaných ve voliérách byly pozorovány projevy agresivního chování (stupeň 2), naopak u nosnic v obohacených klecích agresivní projevy chování pozorovány nebyly (stupeň 0). Vyšší míru projevů agresivity ve voliérách pozorovali také El-Lethey et al. (2000). Přestože mají nosnice ve voliérách více prostoru, je množství zvířat v jedné skupině mnohonásobně vyšší než u nosnic chovaných v obohacených klecích. Tím může

docházet k nepřiměřenému působení sociálního stresu a rozvoji poruch chování jako je klování peří nebo kanibalismus (Nicol et al., 2006). Srovnání výsledků kvalitativního hodnocení chování nosnic z obohacených klecí a voliér jsou uvedeny v grafu č. 1. Analýzou videozáznamů nebyly zjištěny výrazné rozdíly mezi slepicemi v obohacených klecích a voliérách ve sledovaných kategoriích emočních stavů.

Závěr

Výsledky ukazují, že přestože nosnice ve voliérách mají více životního prostoru, tato technologie nutně nemusí vést k zajištění lepšího welfare nosnic z pohledu umožnění více projevů přirozeného chování. Kritickým problémem se jeví zejména výskyt agonistického chování a s tím spojeného poškozování nosnic ve voliérových chovech.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena ITA VFU Brno (FVHE/Večerek/ITA2019).

Literatura

- ABRAHAMSSON, P.; TAUSON, R. Aviary systems and conventional cages for laying hens: Effect on production, egg quality, health and bird location in three hybrids. *Acta Agriculturae Scandinavica*. 1995, vol. 45, s. 191-203.
- BILCIK, B.; KEELING, L.J. Changes in feather condition in relation to feather pecking and aggressive behaviour in laying hens. *British Poultry Science*. 1999, vol. 40 no. 4, s. 444-451.
- EL-LETHEY, H.; AERNI, V.; JUNGI, T.W.; WECHSLER, B. Stress and feather pecking in laying hens in relation to housing condition. *British Poultry Science*. 2000, vol. 41, s. 22-28.
- HANSEN, S.; JEPPESEN, L. Temperament, stereotypes and anticipatory behaviour as measures of welfare in mink. *Applied Animal Science Behaviour*. 2006, vol. 99, no. 1, s. 172-182.
- LOUTON, H.; BERGMANN, S.; REESE, S.; ERHARD, M.; RAUCH, E. Dust-bathing behaviour of laying hens in enriched colony housing systems and an aviary system. *Poultry Science*. 2016, vol. 95, no. 7, s. 1482-1491.
- NICOL, C.J.; BROWN, S.N.; GLEN, E.; POPE, S.J.; SHORT, F.J.; WARRISS, P.D.; ZIMMERMAN, P.H.; WILKINS, L.J. Effect of stocking density, flock size and management on the welfare of laying hens in single-tier aviaries. *British Poultry Science*. 2006, vol. 47, no. 2, s. 135-146.
- TAYLOR, A.A.; HURNIK, J.F. The effect of long-term housing in an aviary and battery cages on the physical condition of laying hens – body – weight, feather condition, claw length, foot lesions and tibia strength. *Poultry Science*. 1994, vol. 73, s. 268-273.
- VAN KRIMPEN, M.M.; KWAKKEL, R.P.; REUVEKAMP, B.F.J.; VAN DER PEET-SCHWERING, C.M.C. Impact of feeding management on feather pecking in laying hens. *World's Poultry Science Journal*. 2007, vol. 61, no. 4, s. 663-686.
- WELFARE QUALITY®. Welfare Quality® Assessment Protocol for Poultry (broilers, laying hens). Welfare Quality® Consortium. 2009, Lelystad, Netherlands.
- ZAR, J.H. Biostatistical Analysis. 4th edn. 1999, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, USA.

Kontaktní adresa: Tereza Křivánková, Mgr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H18370@vfu.cz

Hodnocení welfare v chovu králíků metodou stanovení metabolitů glukokortikoidů v trusu

The evaluation of welfare in rabbit breeding by the method of determination of glucocorticoid metabolites in faeces

Tšponová Zuzana, Pištěková Vladimíra

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

Summary

The most common management system in commercial rabbit farming in Europe is semi-intensive, with a minimum interval between kindling and artificial insemination or natural mating of between 10 and 12 days, resulting in overlap between lactation and gestation. Rabbits are generally considered to be very sensitive to external stimuli because they are easily scared. Any disruption, such as loud noise, induces a rapid cascade of endocrine organ secretion by the regulated hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. HPA activity was used to assess stress and welfare of livestock. Stress increases the level of circulating cortisol in the blood, which is accompanied by a reduced immune response to infections, as well as reduced growth and fertility. Although blood samples are most commonly used to analyze glucocorticoid (GC) levels, blood sampling alone can cause an increase in GC levels. In addition, blood GC levels can be affected by circadian variation, pulse secretion, and short-term stressors. These effects are considered to be mitigated when measuring GC values in faecal samples that can be taken without disturbing the animal, and because glucocorticoid metabolites in faeces reflect accumulation within a few hours.

Keywords: rabbit; faeces; glucocorticoids; animal welfare

Úvod

Nejběžnějším způsobem chovu králíků v Evropě je polointenzivní chov s minimálním intervalem mezi porodem a oplodněním mezi 10 a 12 dny (Arias-Alvarez et al., 2009), což vede k překrývání fáze laktace a březosti (Argente et al., 2014). Králíci jsou obecně považováni za velmi citlivá zvířata na vnější podněty, protože se snadno vyděsí. Jakékoli rušení, jako je hlasitý hluk, vyvolá rychlou kaskádu endokrinních sekrecí regulovanou osou hypotalamus-hypofýza-nadledvina (HPA) (Cabezas et al., 2007). Aktivita HPA osy byla použita k hodnocení stresu a dobrých životních podmínek hospodářských zvířat (Mormède et al., 2007). Stres zvyšuje hladinu cirkulujícího kortizolu v krvi (Möstl and Palme, 2002), což je doprovázeno sníženou imunitní odezvou na infekce (Blecha and Baker, 1986; Salak et al., 1993), rovněž snížením růstu a plodnosti (Elsasser et al., 2000; Turner et al., 2005). Měření koncentrací kortizolu v krvi bylo používáno jako ukazatel stresu u domestikovaných zvířat (Cohen et al., 1997) a poslední dobou se ukázaly být dobrým ukazatelem stresu také proteiny akutní fáze (Murata et al., 2004). Ačkoliv se vzorky krve používají nejčastěji k analýze koncentrace glukokortikoidů (GC), odběr krve sám o sobě může zapříčinit zvýšení koncentrace GC (Boiti et al., 1978, Touma et al., 2004). Kromě toho může být koncentrace GC v krvi ovlivněna cirkadiálními variacemi (Szeto et al., 2004), pulsními sekrecemi a krátkodobými stresory (Lane et al., 2006). Tyto vlivy jsou považovány za zmírněné, když se měří hodnoty GC ve vzorcích trusu, které mohou být odebrány bez rušení zvířete a proto, že metabolity glukokortikoidů v trusu odrážejí nahromadění za několik hodin (Lane et al., 2006, Touma et al., 2004, Palme et al., 2005).

Buijs et al. (2011) použili měření koncentrace metabolitů glukokortikoidů v králičím trusu jako neinvazivní indikátor stresu. Párové vzorky trusu byly odebírány individuálně propadem na tácy, u králíků umístěných individuálně v kleci. První vzorek byl odebrán 18–8 hodin před stresovým vlivem. Vzorek po stresovém vlivu byl odebrán 6–18 hodin po působení stresoru,

kdy se předpokládá, že hodnoty metabolitů glukokortikoidů v trusu dosahují peaku 12 hodin po působení akutního stresoru. Po odběru byly vzorky ihned zamrazeny a uchovány při teplotě – 20 °C až do analýzy. Analýza byla provedena metodou ELISA.

Některé studie použily zvýšené koncentrace glukokortikoidů k definování chronického stresu (Mendoza et al., 2000). Malé změny v bazálních koncentracích glukokortikoidů způsobené chronickým stresem nejsou detekovatelné analýzou vzorku krve, ale mohou být detekovány kvantifikací metabolitů glukokortikoidů v trusu (Mormede et al., 2007). Ačkoliv individuální rozdíly metabolitů glukokortikoidů v trusu jsou většinou velké, použití jednotlivých zvířat jako vlastní kontroly může redukovat tento vliv (Palme et al., 1999).

Závěr

Metoda stanovení metabolitů glukokortikoidů v trusu je u králíků vhodná ke zhodnocení welfare, jelikož se jedná o metodu neinvazivní, zatímco samotný odběr krve by byl pro králíka velice stresující a výsledky by byly manipulací zkreslené. Stanovení bazální koncentrace metabolitů glukokortikoidů v trusu může být užitečnou pomůckou při hodnocení chronického stresu.

Literatura

ARGENTE M-J., DE LALUZ GARCÍA, M., BIRLANGA, V., MUELAS, R. Relationship between cortisol and acute phase protein concentrations in female rabbits. *The Veterinary Journal*, 2014, 202: 172-175.

BOITI, C., YALOW, RS. Corticosteroid response of rabbits and rats to exogenous ACTH. *Endocrine Research Communication*, 1978, 5: 21–33.

BUIJS, S., KEELING, L. J., RETTEBBACHER, S. Glucocorticoid metabolites in rabbit faeces- Influence of environmental enrichment and cage size. *Physiology and Behaviour* 2011,104: 469-473.

COMIN, A., ZUFFERLI, V., PERIC, T., CAVAVESE, F., BARDETTA, D., PRANDI, A. Hair cortisol levels determined at different body sites in the new zealand white rabbit. *World Rabbit Science*, 2012, 20: 149–154.

ELSASSER, T. H., KLESING, K. C., FILIPOY, N., THOMPSON, F. Metabolic consequences of stress. In: Moberg, G. P., Mench, J. A. (Eds.). *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*, CABI Publishing: 2000, Wallingford, UK, pp. 77–110.

LANE, J. Can non-invasive glucocorticoid measures be used as reliable indicators of stress in animals? *Animal Welfare*, 2006, 15: 331–42.

LISTE, M. G., MARÍA G. A., GARCÍA-BELENGUER S., CHACÓN, G., GAZZOLA, P., VILLARROEL, M. The effect of transport time, season and position on the truck on stress response in rabbit. *World Rabbit Science*, 2008, 16: 229–235.

MENDOZA, SP., CAPITANIO, JP., MASON, W.A. Chronic social stress: studies in non-human primates. In: Moberg GP, Mench JA, editors. *The biology of animal stress*. CABI Publishing: 2000, pp. 227-47.

MORMEDE, P., ANDANSON, S., AUPERIN, B., BEERDA, B., GUEMENE, D., MALMKVIST, J., et al. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology and Behaviour*, 2007, 92: 317-39.

MÖSTL, E., PALME, R. Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology*, 2002, 23: 67–74.

MURATA, H., SHIMADA, N., YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. *The Veterinary Journal*, 2004, 168: 28–40.

- PALME, R., RETTENBACHER, S., TOUMA, C., EL-BAHR, SM., MOSTL, E. Stress hormones in mammals and birds — comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Academy of Science*, 2005, 1040: 162–71.
- PALME, R., ROBIA, C., MESSMAN, S., HOFER, J., MOSTL, E. Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminant: a non-invasive parameter of adrenocortical function. *Wien Tierarztl Monatsschr*, 1999, 86: 237-41.
- RAMPIN, F., PICCIRILLO, A., SCHIAVON, E., POPPI, L., GRILLI, G. Detection of pathological lesions in slaughtered rabbits. *Italian Journal Animal Science*, 2008, 7: 105-111.
- SALAK, J. L., MCGLONE, J. J., LYTE, M. Effects of in vitro adrenocorticotrophic hormone, cortisol and human recombinant interleukin-2 on porcine neutrophils migration and luminol-dependent chemiluminescence. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1993, 39: 327–337.
- SZETO, A., GONZALES, JA., SPITZER, SB., LEVINE, JE., ZAIAS, J., SAAB, PG., et al. Circulating levels of glucocorticoid hormones in WHHL and NZW rabbits: circadian cycle and response to repeated social encounter. *Psychoneuroendocrinology*, 2004, 29: 861–6.
- TOUMA, C., PALME, R., SACHSER, N. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Hormones and Behavior*, 2004, 45: 10–22.
- TURNER, A. I., HEMSWORTH, P. H., TILBROOK, A. J. Susceptibility of reproduction in females pigs to impairment by stress or elevation of cortisol. *Domestic Animal Endocrinology*, 2005, 29: 398–410.

Kontaktní adresa: Zuzana Tšponová, MVDr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 00 Brno, H18369@vfu.cz

Využití obohacujících předmětů u individuálně a sociálně ustájených potkanů

Use of enrichment items in individually and socially housed rats

^{1,2}Nádeníček Jaroslav, ¹Voslářová Eva, ¹Bedáňová Iveta, ¹Večerek Vladimír

¹Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Česká republika

²Fyziologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno, Česká republika

Summary

The aim of this study was to compare preferences and duration of use of selected enrichment items in individually and socially housed rats. A total of 16 Wistar male rats aged 3 weeks (8 individually housed and 8 pair housed) were recorded continuously for 7 days. Subsequently, analysis of video recordings were performed and duration of use of each enrichment item on each observation day by each rat was measured. The results of the study show that there are differences in the use and preference of enrichment items in laboratory rats. Especially preferred are articles allowing their alterations and having a wider use (wood wool, paper). Plastic objects are more interesting for socially housed rats as they are used primarily in social interactions. In all enrichment items, fluctuations in the duration of their use during the monitored period were seen, when the rats' interest in individual items changed on different days.

Keywords: laboratory rat; enrichment; welfare; behaviour

Úvod

V posledních letech je velmi diskutovaná problematika welfare laboratorních zvířat. Existuje určitá shoda, že i zvířata využívaná pro pokusy by měla být umístěna v podmínkách, které minimalizují nepohodlí a umožňují jejich přirozené chování. Poskytnutí obohacujících prvků se v mnoha případech ukazuje jako dobré řešení pro eliminaci poruch chování (Dahlqvist et al., 2004). Obohacení životního prostředí u laboratorních potkanů způsobuje funkční změny v mezolimbickém přenosu dopaminu a mění citlivost na psychomotorické stimulanty (Broom, 1986). Pro vyhodnocení, zda je účinek obohacení přínosný je třeba sledovat preferenci vybraného obohacovacího prvku: účinek na chování a účinek na fyziologické parametry (Broom, 1986). Současně je nutné vyhodnotit dopad na samotný výzkum, tedy zda obohacení může ovlivnit výsledky vědecké studie. Navíc je nezbytné posoudit, zda a jak je ovlivněna statistická významnost.

Cílem této studie bylo srovnání preference a doby využívání vybraných obohacujících prvků (kokosové vlákno, papír, dřevitka, dřívko, plastová kulička, plastová rourka) u individuálně a sociálně ustájených potkanů.

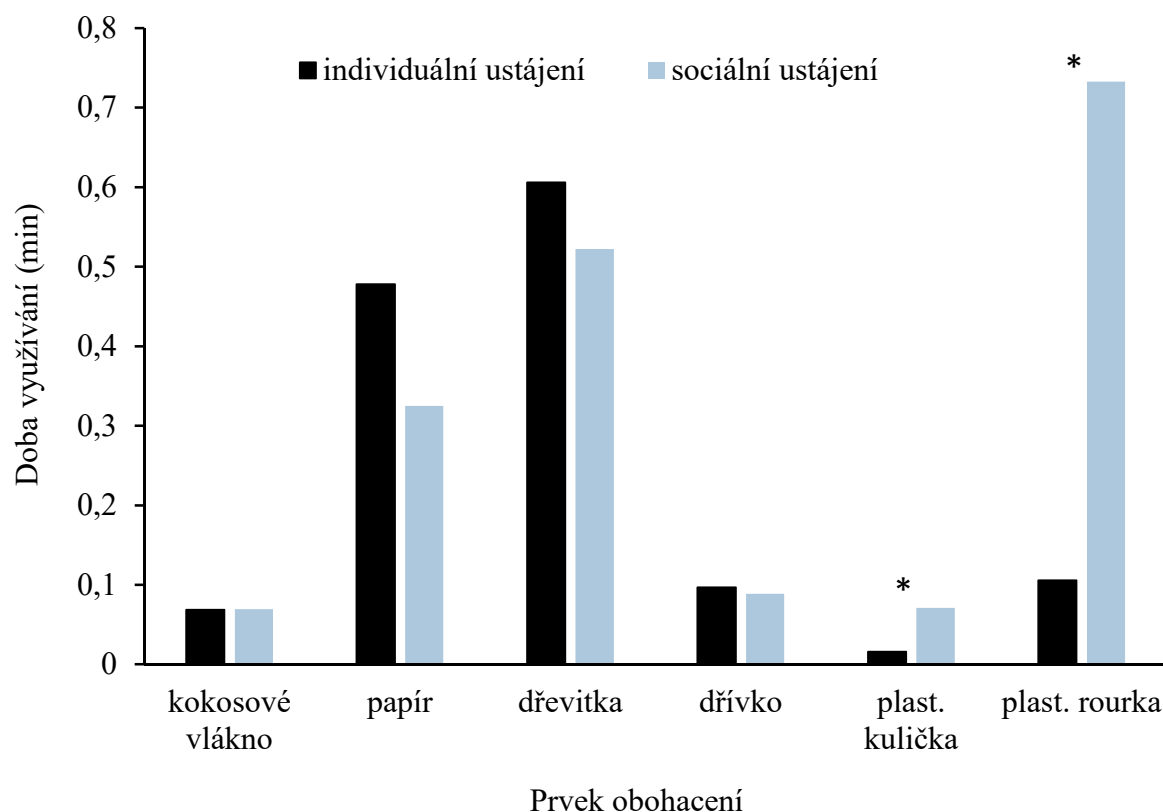
Materiál a metody

Potkani, samci typu Wistar ve věku 3 týdnů v počtu 16 jedinců byli náhodně rozděleni do dvou skupin. První skupina potkanů (n = 8) byla ustájena individuálně a druhá skupina (n = 8) byla ustájena sociálně po dvojicích. Obě skupiny potkanů byly umístěny do standardních klecí ve stejné místnosti. V chovné místnosti byl udržován 12-ti hodinový světelný režim. Teplota byla udržována v rozmezí 19,4 - 23,3 °C. Obě skupiny měly po celou dobu sledování (1 týden) v kleci k dispozici stejné obohacující předměty: kokosové vlákno, papír, dřevitka, dřívko, plastová kulička, plastová rourka. Všechny klece byly kontinuálně nahrávány kamerovým systémem a následně byla provedena analýza videozáznamu s cílem kvantitativně vyjádřit dobu věnovanou využívání jednotlivých obohacujících předmětů u obou skupin. Pro účely analýzy byl hodnocen 8-hodinový úsek z každého dne (8 - 16 hod) pro každou klec po dobu 7 dnů.

Data byla statisticky vyhodnocena pomocí programu Unistat v. 6.5. Po testování normality (Shapiro-Wilkův test) byla data podrobena analýze rozptylu s opakovaným měřením s faktorem Skupina (individuální × sociální ustájení) a Den (opakování měření: 1. - 7. den). Při testování byla pravděpodobnost $p < 0,05$ považována za statisticky významnou.

Výsledky a diskuze

Všechny předměty byly oběma skupinám laboratorních potkanů předloženy první den současně, aby měli možnost volby výběru. Materiál předmětů byl záměrně zvolen tak, aby byly zahrnuty předměty, u kterých mají potkani možnost orální úpravy (dřevitka, papír, dřívko, kokosové vlákno), a také ty bez možnosti orální úpravy (plastová kulička, plastová rourka). Celkové srovnání doby využití sledovaných obohacujících předmětů znázorňuje graf č. 1.



Graf 1. Srovnání využívání různých obohacujících prvků u individuálně a sociálně ustájených potkanů (* $P < 0,01$).

Nejvíce využívaným prvkem obohacení z orálně upravitelných předmětů byla u skupiny sociálně ustájených potkanů i u skupiny individuálně ustájených potkanů dřevitka. Doba jejího využití se celkově mezi oběma skupinami nelišila ($P > 0,05$). Důvodem preference dřevitky může být možnost jednoduché manipulace, vůně nebo přirozená možnost orální úpravy. Žvýkání u zvířat snižuje sympatickou nervovou reakci na stres a vede k jejich uklidnění (Koizumi et al., 2011). Velmi využívaným prvkem u obou skupin potkanů byl také papír, obě skupiny se však o něj začaly zajímat až druhý den sledování. Papír byl u obou skupin ustájených potkanů využíván také jako podkladový materiál, na němž jedinci odpočívali. Mezi méně využívané prvky u obou skupin patřilo kokosové vlákno a dřívko. U kokosového vlákna byl vidět zajímavý trend v časovém využití bez ohledu na typ ustájení potkanů. Zatímco první den se obě skupiny o předmět aktivně zajímaly, druhý den se mu nevěnovaly vůbec a dávali přednost jiným předmětům. Tento trend, kdy kokosové vlákno bylo střídavě jeden den

využíváno a další den nikoliv, pokračoval po celou dobu experimentu. Změny v době využívání v jednotlivých dnech sledovaného období byly pozorovány i u ostatních obohacujících předmětů a u obou skupin potkanů.

Zatímco u předmětů umožňujících orální úpravu nebyl mezi skupinami zjištěn rozdíl v jejich využívání, u obou plastových předmětů existoval statisticky významný rozdíl v době jejich využívání mezi sociálně a individuálně ustájenými potkany. Plastová rourka i plastová kulička byla významně více ($P < 0,01$) využívána sociálně ustájenými potkany. Plastová rourka byla u sociálně ustájených potkanů dokonce nejvíce využívaným předmětem ze všech obohacujících prvků. Plastová rourka byla využívána především při sociálních interakcích jako je například hra. To může vysvětlit menší zájem o tento předmět u individuálně ustájených potkanů. Potkani bez ohledu na typ ustájení tento předmět nevyužívali k odpočinku nebo jako možnost úkrytu, ale spíše jako obohacující prvek, kterým procházeli a případně s ním manipulovali. Plastová kulička byla u obou skupin nejméně využívaným předmětem ze všech předložených obohacujících prvků. Individuálně ustájení potkani ji využívali minimálně, sociálně ustájení potkani ji využívali častěji ($P < 0,01$), opět zejména při sociálních interakcích.

Závěr

Výsledky studie ukazují, že u laboratorních potkanů existují rozdíly ve využití a preferenci obohacujících předmětů. Preferované jsou zejména předměty umožňující jejich úpravu a mající širší využití (dřevitka, papír). V případě předložení předmětů zhotovených z přírodních materiálů dochází k orálnímu opracování, což u potkanů podporuje přirozené chování. Plastové předměty jsou zajímavé spíše pro sociálně ustájené potkany, neboť jsou využívány především při sociálních interakcích. U všech obohacujících prvků docházelo k výkyvům v době jejich využívání v průběhu sledovaného období, kdy se měnil zájem o jednotlivé předměty v různých dnech. Lze předpokládat, že střídání a obměňování dostupných obohacujících předmětů by zvýšilo zájem potkanů.

Literatura

BROOM, D.M. Indicators of poor welfare. *British Veterinary Journal*. 1986, vol. 142, no. 6, s. 524–526.

DAHLQVIST, P.; RONBACK, A.; BERGSTROM, S.A.; SODERSTROM, I.; OLSSON, T. Environmental enrichment reverses learning impairment in the Morris water maze after focal cerebral ischemia in rats. *European Journal of Neuroscience*. 2004, vol. 19, no. 8, s. 2288–2298.

KOIZUMI, S.; MINAMISAWA, S.; SASAGURI, K.; ONOZUKA, M.; SATO, S.; ONO, Y. Chewing reduces sympathetic nervous response to stress and prevents poststress arrhythmias in rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2011, vol. 301, no 4, s. 1551–1558.

Kontaktní adresa: Jaroslav Nádeníček, Mgr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H18368@vfu.cz

Vývoj zmien telesnej kondície mačiek behom pobytu v útulku ako indikátor welfare

Changes in the body condition as a welfare indicator of shelter cats

Vojtkovská Veronika, Voslářová Eva, Večerek Vladimír

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

Summary

The objective of this study was to assess body condition (BC) as an important animal-based welfare indicator of shelter cats. The 5-point scale of the „Body Condition Scoring” system was used to evaluate BC of 180 cats during 20 shelter visits at two-week intervals. BC of cats was assessed at the time of their admission to the shelter, during stay in the shelter and at the time of stay termination. Almost 40% of cats were found not to be in optimal condition when admitted to the shelter. However, BC of cats tended to improve during their stay in the shelter. No influence of BC on the length of stay in the shelter until adoption was found although more cats in optimal condition was adopted than those with impaired BC.

Keywords: feline; stray; body condition score; animal-based indicator

Úvod

Veľké množstvo mačiek nie je v optimálnej telesnej kondícii pri prijatí do útulku (Marston & Bennett, 2009). Telesná kondícia je jedným z vhodných indikátorov odhaľujúcich narušenie welfare (Scott et al., 2002). Jej posudzovanie je tradičný a pomerne jednoducho uplatniteľný prístup hodnotenia welfare. Metód, ktoré opisujú vzhľad tela a rozloženie telesného tuku je niekoľko. Najbežnejšie využívanou je „Body Condition Scoring“ – systém využíva k posúdeniu vizuálne hodnotenie a pohmat (Burkholder, 2001). U mačiek sú zvyčajne hodnotenými oblasťami hrudník, oblasť bedier, brucho a pás (Laflamme, 1997).

Cieľom práce bolo posúdiť zmeny telesnej kondície mačiek v priebehu pobytu v útulku a vyhodnotiť vplyv telesnej kondície mačiek na ich osvojovanie novými majiteľmi.

Materiál a metodika

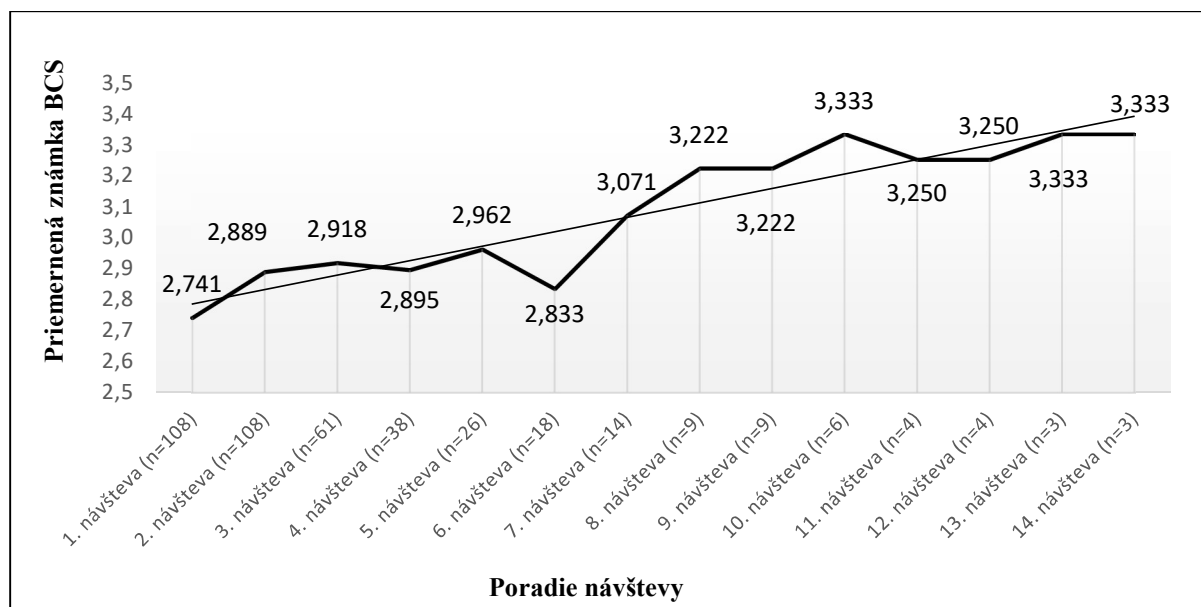
Zmeny telesnej kondície mačiek v priebehu pobytu v útulku boli sledované v zariadení azylového typu poskytujúcom dočasnú starostlivosť túlavým a opusteným mačkám (kapacita cca 30 zvierat). Pre hodnotenie bol zvolený systém známkovania podľa metodiky konceptu „Body Condition Scoring“ (BCS). Pre jednoduchú odlišiteľnosť jednotlivých stupňov bola zvolená 5 bodová stupnica hodnotenia. Zber dát potrebných k analýze prebiehal 40 týždňov, systémom návštev útulku v dvojtýždennom intervale (spolu bolo teda realizovaných 20 návštev útulku). Počas každej návštevy boli podľa protokolu známkou 1-5 ohodnotenú vždy všetky mačky momentálne sa nachádzajúce v útulku (ohodnotených bolo spolu 180 zvierat). Okrem dát zozbieraných počas návštev boli k analýze použité i niektoré informácie z databázy vedenej útulkom. Dáta boli vyhodnotenú štatistickým programom Unistat for Excel 6.5. K overeniu normálneho rozdelenia dát bol použitý Shapiro-Wilkov test. Rozdiely v počtoch zvierat boli analyzované χ^2 testom. Rozdiely medzi získanými známkami a rozdiely v dĺžke pobytu mačiek v útulku boli testované neparametrickým Mann-Whitneyovým U poradovým testom.

Výsledky a diskusia

Počas 20-tich návštev útulku sme spolu ohodnotili 180 zvierat. Počas sledovania bolo 118 mačiek adoptovaných (65,5 %), 37 uhynulo (20,5 %), 2 boli vrátené do pôvodnej lokality (1,1

%), 1 majiteľovi (0,5 %) a 22 mačiek (12,2 %) v útulku zostalo i po ukončení sledovania. Dĺžka pobytu vypočítaná z dátumu prijatia a dátumu ukončenia pobytu v útulku bola 42 dní (medián), priemerne strávili mačky v útulku 62,6 dní.

Analýzou dát bolo zistené, že pri prijatí do útulku malo 71 mačiek (39,4 %) zmenenú známku BCS (získalo známku 1, 2, 4 alebo 5). Optimálnu známku BCS (známku 3) získalo 109 mačiek (60,5 %). Do útulku sa teda dostalo štatisticky vysoko významne ($p = 0,000$) väčšie množstvo mačiek s optimálnou telesnou kondíciou. Zníženú známku BCS (známka 1 alebo 2) pri prijíme do útulku malo 52 mačiek (28,8 %), zvýšená známka BCS (známka 4 alebo 5) bola udelená 19-tim mačkám (10,5 %). Do útulku sa teda dostalo štatisticky významne viac mačiek s podváhou ($p = 0,0001$) ako s nadváhou. Výsledky sa zhodujú napr. so zisteniami Marston & Bennett (2009) z Austrálie; autori zistili, že do útulku prichádza s optimálnou kondíciou 70,6 % mačiek, 27,8 % mačiek je podvyživených a 1,29 % má nadváhu. Podvyživené mačky v tejto štúdii mali okrem zhoršenej kondície často i ďalšie zdravotné problémy. Nadváha bola pozorovaná najmä u mačiek, ktorých sa vzdal pôvodný majiteľ. Vývoj telesnej kondície mačiek v priebehu pobytu v útulku v našej štúdii zachytáva graf č. 1.



Graf 1: Vývoj hodnoty Body Condition Score (BCS) u mačiek v útulku (priemerné známky).

Z výsledkov vyplýva, že známka BCS sa v priebehu pobytu mačiek v útulku celkovo zvyšovala. Priemerná známka získaná na začiatku pobytu bola vysoko významne nižšia ($p = 0,0061$) ako známka získaná na konci pobytu. K zmene známky BCS (pri porovnaní známky BCS z prvej a poslednej návštevy) došlo u 35 mačiek (32,4 %) zo 108 (počet mačiek, ktoré boli hodnotené minimálne 2 krát). Z týchto 35 mačiek bolo 26 mačiek, ktorým sa stav v priebehu v útulku zlepšil a 9 takých, ktorým sa stav zhoršil. Mačiek, ktorým sa stav zlepšil bolo vysoko významne viac ($p = 0,0000$). Naše zistenia nie sú v súlade s výsledkami autorov Tanaka et al. (2012), ktorí sa v štúdií venovali sledovaniu zmien v telesnej kondícii mačiek v útulkoch. Podľa autorov došlo v priebehu prvého týždňa k úbytku na váhe až u 82 % mačiek, pričom váha tela bola v korelácii so zníženým príjmom krmiva, čo možno považovať za prejav stresu u mačiek (Carlstead et al., 1993).

Mačiek, ktoré mali optimálnu známku BCS pred adopciou bolo v porovnaní s mačkami, ktorých známka pred adopciou nebola optimálna, adoptovaných vysoko významne viac ($p = 0,0000$). Dĺžka pobytu mačiek s optimálnou a zmenenou známkou BCS pred adopciou (medián

44,5 dní verzus medián 37 dní) sa však štatisticky významne nelíšila ($p = 0,7856$). Získané známky mačiek pred adopciou boli vysoko významne vyššie ako známky neadoptovaných mačiek ($p = 0,0022$). Vo všeobecnosti sú zvieratá s optimálnym fyzickým stavom adoptované skôr, platí to napríklad i u psov (Vitulová et al., 2019). Počet mačiek, ktoré mali optimálnu známku BCS pred úmrtím sa nelíšil od počtu mačiek, ktorých známka pred úmrtím nebola optimálna ($p > 1$). Dĺžka pobytu mačiek s optimálnou a zmenenou známkou BCS pred úmrtím (medián 33,5 dní verzus medián 39 dní) sa štatisticky významne nelíšila ($p = 0,5973$). Známky BC u mačiek pred úmrtím boli však vysoko významne nižšie ako známky mačiek, ktoré ukončili svoj pobyt v útulku iným spôsobom ($p = 0,0000$). Zhoršená telesná kondícia predisponuje mačku k eutanázii (Marston & Bennett, 2009), resp. k úmrtiu vo všeobecnosti (Freeman, 2012; Teng et al., 2018).

Záver

Analýzou dát zozbieraných vo vybranom útulku bolo zistené, že telesná kondícia je narušená u takmer 40 % mačiek prijatých do útulku. Známka BCS má ale tendenciu zvyšovať sa v priebehu pobytu mačky v útulku, čo môže naznačovať zlepšovanie welfare. Mačky s optimálnou telesnou kondíciou neboli adoptované významne skôr ako jedince so zhoršenou kondíciou, avšak medzi adoptovanými mačkami bolo vo všeobecnosti väčšie množstvo tých s optimálnou kondíciou. Posudzovanie telesnej kondície je adekvátnym, no čiastkovým nástrojom k odhaľovaniu zmien vo welfare mačiek v útulkoch. Pre získanie komplexného obrazu je preto na mieste vyhodnotiť i ďalšie animálne orientované indikátory welfare.

Literatúra

- BURKHOLDER, W. J. Precision and practicality of methods assessing body composition of dogs and cats. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. 2001, vol. 23, no. 9, s. 1–10.
- CARLSTEAD, K.; BROWN, J. L.; STRAWN, W. Behavioral and physiological correlates of stress in laboratory cats. *Applied Animal Behaviour Science*. 1993, vol. 38, no. 2, s. 143–158.
- FREEMAN, L.M. Cachexia and sarcopenia: emerging syndromes of importance in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2012, vol. 26, no. 1, s. 3–17.
- LAFLAMME, D. Development and validation of a body condition score system for cats: a clinical tool. *Feline practice*. 1997, vol. 25, s. 13–18.
- MARSTON, L. C.; BENNETT, P. C. Admissions of cats to animal welfare shelters in Melbourne, Australia. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2009, vol. 12, no. 3, s. 189–213.
- SCOTT, K.C.; LEVY, J.K.; GORMAN, S.P.; NEWELL, S.M. Body condition of feral cats and the effect of neutering. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2002, vol. 5, no. 3, s. 203–213.
- TANAKA, A.; WAGNER, D. C.; KASS, P. H.; HURLEY, K. F. Associations among weight loss, stress, and upper respiratory tract infection in shelter cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2012, vol. 240, no. 5, 570–576.
- TENG, K. T.; MCGREEVY, P. D.; TORIBIO, J. A. L.; RAUBENHEIMER, D.; KENDALL, K. & DHAND, N. K. Strong associations of nine-point body condition scoring with survival and lifespan in cats. *Journal of feline medicine and surgery*. 2018, vol. 20, no.12, s. 1110–1118.
- VITULOVA, S.; VOSLAROVA, E.; VECEREK, V.; BEDANOVA, I.; VOLFOVA, M. The health of shelter dogs and its impact on their adoption. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*. 2019, vol. 132, no. 7-8, s. 325–333.

Kontaktná adresa: Veronika Vojtkovská, Mgr., Ústav ochrany a welfare zvierat a verejného veterinárneho lékařství, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, vojtkovskav@vfu.cz

SEKCE 4

Veřejné a soudní veterinářství a toxikologie

Hodnocení úrovně welfare v chovu mléčných koz stanovením kortizolu ve slinách

Assessment of dairy goats welfare by determination of cortisol in saliva

Popelková Tereza, Rozkydalová Michaela, Pištěková Vladimíra

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

Summary

Interest in animal welfare has been steadily increasing in recent years, but assessing welfare levels is a difficult and complex matter. Many methods - invasive and non-invasive - have been developed to evaluate animal welfare. One of the most commonly used methods is the determination of stress hormones cortisol and corticosterone in various matrices. The purpose of this article is to summarize the advantages of using a non-invasive method of saliva sampling to determine cortisol levels and thereby assess the welfare level in dairy goat farming.

Keywords: *saliva; cortisol; non-invasive; welfare; goats; stress*

Úvod

V posledních letech roste zájem o dobré životní podmínky zvířat. Posouzení welfare zvířat je však složitou a komplexní záležitostí (Rushen et al., 2011). Dle Brooma (1986) představuje welfare zvířat stav, ve kterém se organismus zvířete snaží vyrovnat s prostředím, ve kterém žije. V chovech mléčných koz běžně nastává nespočet situací např. transport nebo přeskupování zvířat, které mohou u zvířat vyvolat stres a se kterými se zvířata musejí vyrovnat. Důležité ovšem je snažit se tyto stresové situace co nejvíce eliminovat.

Standardně se ke studiu stresu a welfare u hospodářských zvířat využívá měření aktivity osy hypotalamus-hypofýza-nadledvina (HPA). HPA osa reguluje sekreci glukokortikoidních hormonů - kortizolu a kortikosteronu, které jsou produkovány v kůře nadledvin (Mormède et al., 2007). K aktivaci HPA osy a následné sekreci glukokortikoidů dochází v důsledku stresových situací, proto se stanovení koncentrace těchto hormonů a jejich metabolitů využívá jako indikátor welfare zvířat (Broom and Johnson, 1993). Hladinu glukokortikoidů však mohou ovlivňovat i další faktory, které musíme brát v potaz (prostředí, pohlaví, věk, atd.), stejně tak musíme brát zřetel i na cirkadiánní rytmus kortizolu, který dosahuje u většiny hospodářských zvířat vrcholu v ranních hodinách (Mormède et al., 2007).

Stanovení kortizolu ve slinách

Přestože je tradiční technikou použití krevní plazmy k měření glukokortikoidních hormonů, její využití je omezené, protože samotný odběr krve je pro zvířata stresující. Proto bylo vyvinuto několik alternativních metod jako je měření kortikosteroidů ve slinách, mléce, moči, feces, srsti nebo vejcích (Palme, 2012).

Výhodou odběru slin vůči odběru krve je kromě snadnějšího a neinvazivního odběru vzorků také to, že v krvi měříme celkovou koncentraci kortizolu volného i vázaného, což ale nemusí nutně odrážet biologický účinek hormonu, kdežto kortizol ve slinách přímo odráží volnou biologicky aktivní frakci kortizolu v krvi. Kortizol se do slin dostává pomocí pasivní difuze a jeho koncentrace není ovlivněna průtokem slin, což umožňuje relativně rychlé vyrovnání koncentrací slinného a volného plasmatického kortizolu (Riad-Fahmy et al., 1982). Studie (Chacón Pérez et al., 2004; Greenwood et al., 1992; Hernandez et al., 2014) uvádějí, že plasmatický a slinný kortizol spolu korelují a potvrzují tak, že sliny jsou vhodnou alternativou pro hodnocení aktivity HPA osy. Dalším důležitým aspektem je také stabilita kortizolu ve

slinách. Nalla et al. (2015) uvádí, že mezi vzorky lidských slin skladovaných při teplotě -18 °C, -4 °C, 4 °C a při pokojové teplotě po dobu 72 hodin nebyl statisticky významný rozdíl v hladinách kortizolu.

Stanovení kortizolu ve slinách má výhody i oproti ostatním neinvazivním metodám. Cook (2002) prokázal, že u ovcí se kortizol ve slinách objeví za 20 - 30 minut po působení akutního stresoru a předpokládáme, že obdobně je tomu i v případě koz. Také u mléčných krav prokázal Hernandez et al. (2014) časové zpoždění 10 minut při dosažení maximálních koncentrací kortizolu v plazmě a ve slinách po působení stresu ve formě sociální izolace. Naopak u vzorků feces je nutné počkat, protože metabolity glukokortikoidů se zde objeví za 12 - 15 hodin po stresové zátěži. Důvodem tohoto zpoždění je doba trvání střevní pasáže (Palme et al., 1996). Nesporným kladem ale je, že vzorky feces získané spontánní defekací nevyžadují žádnou manipulaci člověka se zvířaty (Kleinsasser et al., 2010). Vzorky moči můžeme získat od zvířat taktéž spontánně, nebo katetrizací, která už ale vyžaduje určitou manipulaci se zvířaty. Palme et al. (2005) uvádí, že v moči jsou detekovány metabolity glukokortikoidů, které dosahují maxima v prvních získaných vzorcích moči, tj. několik hodin po aplikaci kortikosteronu. Rovněž do mléka se dostane kortizol s určitým zpožděním. Romero et al. (2015) zaznamenal ve své studii statisticky významné zvýšení kortizolu v mléce 1,5 hod po vystavení laktujících koz akutnímu stresu. Získání vzorků mléka je však omezeno pouze na laktující zvířata. Významným aspektem využití slin pro detekci kortizolu je také fakt, že získáme od zvířat individuální vzorky. Obdržené množství slin od jednoho jedince je v případě koz i kůzlat dostatečné pro analýzu a můžeme tak posoudit úroveň welfare konkrétního jedince.

K měření hladiny kortizolu se široce používá imunoanalýza. Principem imunoanalýzy je konkurence mezi analyzovaným analytem a analytem značeným buď enzymy (EIA) nebo radioizotopy (RIA) o vazebná místa na protilátce (Darwish, 2006). Dříve byla nejčastěji používanou metodou RIA (radioimmunoassay), v dnešní době však vzrostl zájem o použití neradioaktivních markerů, a proto se do popředí dostala také levnější a méně pracná EIA (enzymeimmunoassay) metoda (Prakash et al., 1999). Postupně byly vyvinuty a validovány metody pro detekci kortizolu v plasmě (Yadav et al., 2013) nebo feces (Kleinsasser et al., 2010) koz, ale zatím nebyla validována metoda pro stanovení kortizolu ve slinách koz. Avšak pro detekci kortizolu ve slinách dobytka Chacón Pérez et al. (2004) vyvinul a validoval EIA metodu, díky jejíž citlivosti, specificitě a přesnosti se ukázalo, že je vhodná a spolehlivá a má také oproti dříve používané RIA metodě nižší detekční limity.

Závěr

Z výše uvedeného vyplývá, že stanovení kortizolu ve slinách zvířat má mnoho výhod, ať už vůči metodám invazivním či neinvazivním a je tak vhodným nástrojem pro zjištění akutního stresu a posouzení welfare zvířat nejen v chovech koz.

Literatura

- BROOM, D. M. Indicators of poor welfare. *British Veterinary Journal*. 1986, vol. 142, s. 524-526.
- BROOM, D. M.; JOHNSON, K. G. Stress and animal welfare. Chapman and Hall, London. 1993, 211.
- COOK, C. J. Rapid noninvasive measurement of hormones in transdermal exudate and saliva. *Physiology & Behavior*. 2002, vol. 75, s. 169-181.
- DARWISH, I. A. Immunoassay methods and their applications in Pharmaceutical analysis: basic methodology and recent advances. *International Journal of Biomedical Science*. 2006, vol. 2, s. 217-235.
- GREENWOOD, P. L.; SHUTT, D. A. Salivary and plasma cortisol as an index of stress in goats. *Australian Veterinary Journal*. 1992, vol. 69, s. 161-163.

- HERNANDEZ, C. E.; THIERFELDER, T.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K.; BERG, CH.; ORIHUELA, A. Time lag between peak concentrations of plasma and salivary cortisol following a stressful procedure in dairy cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2014, vol. 56, no. 61.
- CHACÓN PÉREZ, G.; GARCÍA-BELENQUER LAITA, S.; ILLERA DEL PORTAL, J. C.; PALACIO LIESA, J. Validation of an EIA technique for the determination of salivary cortisol in cattle. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2004, vol. 2, no. 1, s. 45-51.
- KLEINSASSER, C.; GRAML, C.; KLOBETZ-RASSAM, E.; BARTH, K.; WAIBLINGER, S.; PALME, R. Physiological validation of a non-invasive method for measuring adrenocortical activity in goats. *Veterinary Medicine Austria*. 2010, vol. 97, s. 259-262.
- MORMÈDE, P.; ANDANSON, S.; AUPERIN, B.; BEERDA, B.; GUEMENE, D.; MALMKVIST, J.; MANTECA, X.; MANTEUFFEL, G.; PRUNET, P.; VAN REENEN, C. G.; RICHARD, S.; VEISSIER, I. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & Behavior*. 2007, vol. 92, s. 317-339.
- NALLA, A. A.; THOMSEN, G.; KNUDSEN, G. M.; FROKJAER, V. G. The effect of storage conditions on salivary cortisol concentrations using an enzyme immunoassay. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2015, vol. 75, s. 92-95.
- PALME, R.; FISCHER, R.; SCHILDORFER, H.; ISMAIL, M. N. Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Animal Reproduction Science*. 1996, vol. 43, s. 43-63.
- PALME, R.; RETTENBACHER, S.; TOUMA, C.; EL-BAHR, S. M.; MOSTL, E. Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion and noninvasive measurement in fecal samples. Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology. *Annals of the New York Academy Sciences*. 2005, vol. 1040, s. 162-171.
- PALME, R. Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assessment in farm animals. *Animal Welfare*. 2012, vol. 21, s. 331-337.
- PRAKASH, B. S.; WALLEHORST, S.; METTEN, M.; HOLTZ, W.; WUTKE, W. Development of a sensitive enzyme immunoassay (EIA) for FSH determination in bovine plasma. *Animal Reproduction Science*. 1999, vol. 55, s. 183-192.
- RIAD-FAHMY, D.; READ, G. F.; WALKER, R. F.; GRIFFITHS, K. Steroids in saliva for assessing endocrine function. *Endocrine Reviews*. 1982, vol. 4, s. 367-395.
- ROMERO, G.; RESTREPO, I.; MUELAS, R.; BUESO-RÓDENAS, J.; ROCA, A.; DÍAZ, J. R. Within-day variation and effect of acute stress on plasma and milk cortisol in lactating goats. *Journal of Dairy Science*. 2015, vol. 98, s. 832-839.
- RUSHEN, J.; BUTTERWORTH, A.; SWANSON, J. C. Animal behavior and well-being symposium: farm animal welfare assurance: science and application. *Journal of Animal Science*. 2011, vol. 89, s. 1219-1228.
- YADAV, R.; MOHAN, K.; KUMAR, V.; SARKAR, M.; NITU, K.; MEYER, H. H. D.; PRAKASH, B. S. Development and validation of a sensitive immunoassay (EIA) for blood plasma cortisol in female cattle, buffaloes, and goats. *Domestic Animal Endocrinology*. 2013, vol. 45, s. 72-78.

Kontaktní adresa: Tereza Popelková, MVDr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H18009@vfu.cz

Vliv času a teploty skladování vzorku na stabilitu kortizolu ve slinách prasat

The influence of time and temperature of sample storage on cortisol stability in pig saliva

Rozkydalová Michaela, Popelková Tereza, Chloupek Petr

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

Summary

With the passage of time, there is an increasing consideration on reduction of environmental stress in animals. In order to assess the stress in animals, it has been developed several methods using different types of samples. With regard to present knowledge, animal species (domestic pig) and breeding technology we have decided to evaluate stress level by assessment of cortisol in saliva samples. Multiple factors have impact on the level of saliva cortisol but there is still not many information about stability of cortisol in pigs saliva. So that is the reason why we have focused on time and temperature dependency of sample storage and cortisol levels assessment in samples. Samples were kept both in the fridge and room temperature and cortisol levels were monitored for 60 minutes. The results did not show any significant change in cortisol levels between the samples stored for 60 minutes in 4°C and 25°C.

Keywords: storage; temperature; time; cortisol; pig; saliva;

Úvod

V důsledku zlepšování welfare zvířat je stále více kladen důraz na snižování stresové zátěže zvířat. K hodnocení stresové zátěže zvířat byly v různých studiích použity různé parametry a také různé invazivní i neinvazivní metody odběru vzorků. Často používaným parametrem, který je použit i v naší studii, je hladina kortizolu. Jsou vypracovány metodiky, podle nichž lze stanovit hladinu kortizolu v moči, slinách, mléce, trusu nebo srsti (Morméde a kol., 2007). S ohledem na minimalizování stresu při odběru vzorku, živočišný druh a technologii chovu byly jako vhodný vzorek zvoleny sliny. Množství kortizolu ve slinách vypovídá o hladině kortizolu v krvi, neboť mezi volným sérovým kortizolem a kortizolem ve slinách dochází k signifikantní korelaci (Cook a kol., 1996).

Materiál a metody

Pro experiment byla zvolena odstavovaná selata (*Landrace x České bílé ušlechtilé prase*) ve věku 28 +/- 2 dny, přičemž vzorky byly od selat odebírány po provedení odstavu. Vzorky byly získány výtěrem dutiny ústní vatovými tampony. Po výtěru byly tampony centrifugovány při 14 000 otáčkách po dobu 3 minut. Z jednotlivých vzorků byl vytvořen směsný vzorek o objemu 3,3 ml. Směsný vzorek byl po homogenizaci rozdělen do 26 dílčích vzorků. 13 z nich bylo uloženo do termobloku, který udržoval teplotu 25 °C a zbylých 13 vzorků bylo uloženo do lednice o teplotě 5 +/- 1 °C. Vzorky byly po dobu 60 minut v časových intervalech 5 minut mrazeny pomocí suchého ledu o teplotě - 79,5 °C. Experiment byl proveden v sedmi opakováních. Hladina kortizolu ve vzorcích byla stanovena metodou ELISA pomocí komerčně dostupných kitů (Cortisol EIA kit). Statistická analýza dat byla provedena v programu UNISTAT for Excel pomocí Wilcoxonova testu.

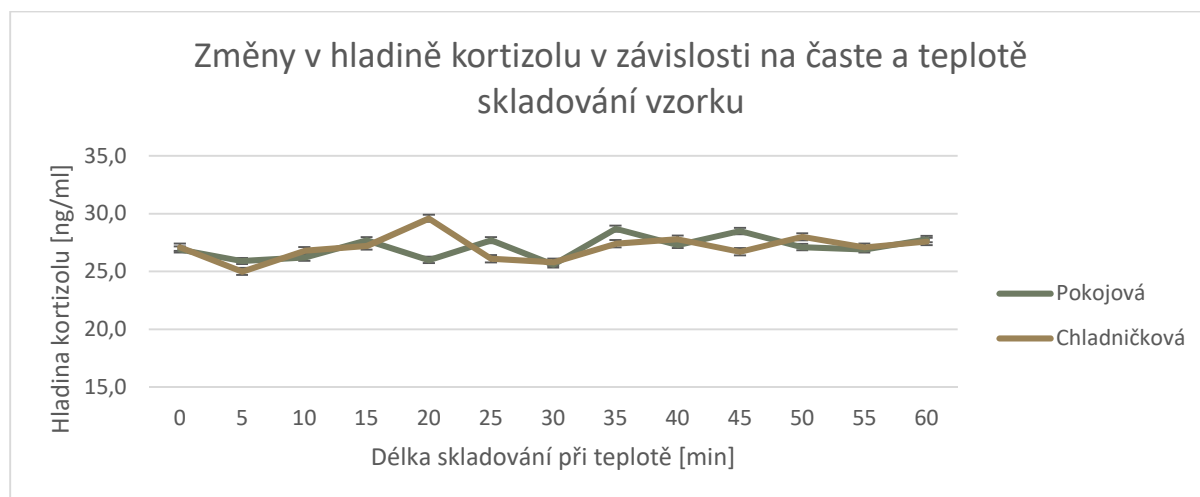
Výsledky a diskuse

S ohledem na způsob odběru vzorku lze říci, že se nejedná o čisté sliny ale spíše o orální tekutiny. Součástí takového vzorku jsou pak kromě slin zbytky přijímaných tekutin a krmiva, bakteriální mikroflóra dutiny ústní, případně krev a další případné kontaminanty, se kterými

došla dutina ústní zvířete do kontaktu. Tyto vlivy mohou být zmírněny při odběrech vzorků slin od lidí například lačněním a vypláchnutím dutiny ústní před odběrem vzorku (Whembolua a kol. 2006). U zvířat je však takovýto postup vyloučen, protože lačnění či manipulace by mohli ovlivnit výsledky. Magnano a kol. (1989) prokázali vyšší hladiny kortizolu ve slinách kojenců způsobené kontaminací vzorku mateřským mlékem. Ke zvýšení hladiny kortizolu ve slinách u lidí rovněž došlo i po příjmu potravin bohatých na bílkoviny (Gibson a kol., 1999). Stanovená hodnota může být ovlivněna také přítomností krve ve vzorku, proto by měly být vzorky kontaminované krví z experimentu vyloučeny (Kivlighan a kol., 2004). Co se týče vlivu bakteriální kontaminace na hladinu kortizolu ve vzorku lidských slin, pokud byly vzorky po odběru zmrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, nebyly zjištěny žádné změny v hladině kortizolu. Mezi počtem kolonií kontaminujících bakterií ve vzorku a hladiny kortizolu ve vzorku překvapivě nebyly prokázány žádné souvislosti ani při skladování vzorku v pokojové teplotě po dobu 10 dnů (Whembolua a kol. 2006). Při odběrech vzorků nesmíme opomenout ani vliv cirkadiálních rytmů na bazální koncentrace kortizolu. U prasat jsou obvykle bazální koncentrace kortizolu vyšší ráno než v odpoledních a večerních hodinách (Griffith a kol., 1991).

Pokud se zaměříme na podmínky skladování odebraných vzorků ve vztahu k degradaci kortizolu ve slinách prasat, nenalezneme mnoho konkrétních informací. Několik publikací se však věnuje stabilitě kortizolu ve slinách lidí. Gröschl a kol., (2001) informují o tom, že kortizol je v odstředěném vzorku lidských slin statisticky stabilní po pěti dnech při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Garde a kol. (2005) uvádí, že v centrifugovaných slinách lidí je kortizol při $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ stabilní po dobu až 3 měsíců a při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebyly zjištěny změny ani po roce skladování. Při pokojové teplotě za 1 měsíc došlo k poklesu koncentrace kortizolu o 9,2%. U lidí je ovšem kontaminace vzorků minimalizována pomocí lačnění a výplachem dutiny ústní před odběrem.

U zvířat je častěji využívaným vzorkem sérum, případně plazma. Studie zabývající se stresovou zátěží slonů indických sledovala stabilitu kortizolu ve vzorcích séra skladovaných při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, pokojové teplotě a při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 62 hodin. Ke statisticky významnému snížení hladiny kortizolu došlo při skladování séra po 48 hodin při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Khonmee a kol., 2019). Stabilita kortizolu ve slinách prasat zatím nebyla hodnocena. Výsledky naší studie ukázaly, že po dobu 60 minut nedošlo v námi zvolených teplotních podmínkách ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$; $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) ke statisticky významnému snížení hladiny kortizolu ve vzorku slin.



Graf 1. Změny v hladině kortizolu v závislosti na čase a teplotě skladování vzorku

Závěr

Ve sledovaném časovém úseku 60 minut nedošlo ke změně v hladině kortizolu v závislosti na teplotě skladování. V navazující studii se budeme zabývat stabilitou kortizolu v centrifugovaném vzorku slin opět v závislosti na teplotě, ale v delším časovém rozmezí. Rozmezí bude stanoveno takovým způsobem, který odpovídá reálnému času potřebnému k odběru vzorku a k jeho transportu do laboratoře.

Literatura

COOK, N. J., SCHAEFER, A. L., LEPAGE, P., MORGAN JONES, S. D. M. Salivary vs. Serum cortisol for the assessment of adrenal activity in swine. Canadian journal of animal science [online]. 1996, no. 76, p. 329–335.

GARDE A. H., HANSEN, A. M. Long-term stability of salivary cortisol. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation [online]. 2005, no. 65, p. 433-436.

GIBSON, E.L., CHECKLEY, S., PAPADOPOULOS, A., POON, L., DALEY, S., WARDLE, J. Increased salivary cortisol reliably induced by a protein-rich midday meal. Psychosom Med [online]. 1999, no. 61, p. 214-224.

GRIFFITH, M. K., MINTON, J. E. Free-running rhythms of adrenocorticotrophic hormone (ACTH), cortisol and melatonin in pigs. Domestic animal endocrinology [online]. 1991, no. 8(2), p. 201-208.

GRÖSCHL, M., WAGNER, R., RAUH, M., DÖRR, H. G. Stability of salivary steroids: the influences of storage, food and dental care. Steroids [online]. 2001, no. 66, p. 737-741.

KIVLIGHAN, K. T., GRANGER, D. A., SCHWARTZ, E. B., NELSON, V., CURRAN, M., SCHIRTCLIFF, E. A.

LEWIS, J. G. Steroid Analysis in Saliva: An overview. The clinical biochemist reviews [online]. 2006, no. 27(3), p. 139-146.

KHONMEE, J., BROWN, J. L., LI, M., SOMGIRD, CH., BOONPRASERT, K., NORKAEW, T., PUNYAPORNWITHAYA, V., LEE, W., THITARAM, CH. Effect of time and temperature on stability of progestagens, testosterone and cortisol in Asian elephant blood stored with and without anticoagulant. Conservation physiology [online]. 2019, no 7, issue 1.

MAGNANO, C. L., DIAMOND, E. J., GARDNER, J. M. Use of salivary cortisol measurements in young infants: a note of caution. Child dev [online]. 1989, no. 60, p. 1099-1101.

MORMÉDE, P., ANDANSON, S., AUPÉRIN, B., BEERDA, B., GUÉMÉNÉ, D., MALMKVIST, J., MANTECA, X., MANTEUFFEL, G., PRUNET, P., REENEN, C. G., RICHARD, S., VEISSIER, I. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. Physiology a behaviour [online]. 2007, no. 92, p. 317–339.

WHEMBOLUA, G. L., GRANGER, D. A., SINGER, S., KIVLINGHAN, K. T., MARGUIN, J. A. Bacteria in the oral mucosa and its effects on the measurement of cortisol, dehydroepiandrosterone, and testosterone in saliva. Hormones and Behavior [online]. 2006, no. 9, p. 478-483.

Kontaktní adresa: Michaela Rozkydalová, MVDr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H18010@vfu.cz

Mikroplasty jako potenciální riziko pro vodní organismy

Microplastics as a potential risk to aquatic organisms

^{1,3}Hollerová Aneta, ^{2,3}Hodkovicová Nikola, ³Faldyna Martin, ⁴Mareš Jan, ¹Blahová Jana, ¹Svobodová Zdeňka

¹Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství,

²Ústav ekologie a chorob zoonozivních zvířat, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Česká republika

³Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, Česká republika

⁴Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství, Mendelova univerzita v Brně, Česká republika

Summary

*Our study is focused on the polystyrene microparticles and their impact on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) organism. At the end of experiment phase, the effect on hematological, biochemical, histological and immunological indices in the time and dose-dependent manner will be evaluated. Main task of our study will be analysis of intestinal microflora with emphasis on mutual ratio of *Lactobacillus* spp. and *Brevinema* after microplastic exposure when the DNA will be isolated and submitted for qRT-PCR. This analysis will be supplemented with histological examination and electron microscope images to verify the permeability of microparticles through the intestinal endothelium.*

Keywords: microplastics; aquatic environment; water pollution; rainbow trout

Úvod

V poslední době se výroba plastů po celém světě dramaticky zvyšuje a je považována za vážnou hrozbu pro vodní prostředí. Zejména kvůli své odolnosti vůči prostředí, schopnosti transportovat se na velké vzdálenosti a souvisejícími environmentálními riziky vzbuzuje plastový odpad ve vodním prostředí globální obavu. Studie uvádí, že 60 – 80 % veškerého světového odpadu tvoří plast (Derraik, 2008; Silvan, 2011; Invleva a kol., 2017). Značné množství studií prokázalo přítomnost těchto kontaminantů v řadě vodních organismech napříč potravním řetězcem, jako je zooplankton, larvy nebo ryby (Cole a kol., 2013; Kaposi a kol., 2014; Lonnstedt a Eklov, 2016). Negativní důsledky vystavení mikroplastům obecně zahrnují snížení nutriční hodnoty stravy, poškození tkání nebo zvýšení míry expozice patogenům (Avio a kol., 2017). Tento orální příjem byl prokázán v několika studiích, kdy v trávicích traktech exponovaných ryb byla zjištěna přítomnost fragmentů a vláken plastů, která se dále mohou splétat a bránit správnému vstřebávání živin. Navíc existuje možnost, že menší částice, vzniklé degradací větších kusů, jsou schopny přestupovat přes střevní endotel a dostávat se do tkání (Cole a kol., 2011). Jelikož byla prokázána přítomnost těchto kontaminantů v rybách a mlžích určených k lidské spotřebě, mohou mikroplasty představovat potenciální riziko pro zdraví člověka (Rochman a kol., 2015). Celkový dopad na vývoj organismu, chování a vliv na zdravotní stav je předmětem mnoha studií a zaujímá přední téma na mezinárodních konferencích. Podle své velikosti jsou plasty rozděleny na makro, mikro a nanoplasty; přičemž jako mikroplasty se pak nejčastěji označují částice s velikostí od 20 µm do 5 mm. Tyto látky představují zátěž pro životní prostředí a zdroj ekotoxicky aktivních látek (Hidalgo-Ruz a kol., 2012).

Materiál a metody

V rámci tohoto experimentu bude na Ústavu zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství na Mendelově univerzitě proveden růstový test pro testování toxicity chemických látek na juvenilních rybách pstruha duhového dle metodiky OECD 215 – Fish, Juvenile Growth Test s částicemi mikroplastů, které jsou komerčně dostupné pro laboratorní účely (např. Sigma-Aldrich). Experiment bude proveden v návaznosti na data a zkušenosti získané z předchozí

studie provedené s mikroplastovými částicemi polyethylenu, které byly podávány orálně pstruhu duhovému. Před zahájením samotného experimentu budou ryby náhodně rozděleny do 4 testovacích nádrží po 20 ks ryb. Jedna z nádrží bude kontrolní a další tři budou sloužit jako testovací. V průběhu pokusu bude probíhat test tří různých koncentrací těchto látek, a sice 0,5%, 2% a 5%. Experiment bude proveden v duplikátu. Před začátkem pokusu proběhne 14-denní fáze aklimatizace, jejíž účelem bude navyknutí pokusných ryb na podmínky pokusného prostředí a podávané krmivo. Následně proběhne 6-týdenní experiment na juvenilních pstruzích. Částice vybraného mikroplastu (polystyren) budou rybám dostupné z krmiva a do krmné směsi budou zapracovány metodou impregnace povrchové vrstvy pelet za použití pevné disperze účinné látky, sorbentu a farmaceuticky akceptovatelného polymeru. Během probíhajícího testu bude sledován vliv mikroplastů na růst a změny chování ryb, hmotnostní přírůstky, bude sledována mortalita a případné odchylky zdravotního stavu. V závěru pokusu bude provedeno usmrcení ryb tupým úderem do hlavy. Hlavním cílem bude analýza složení střevní mikroflory a vliv na druhy *Lactobacillus spp.* a *Brevinema* za pomoci odběru vzorků střevního obsahu. Ze vzorků bude izolována DNA, která bude následně předložena k qRT-PCR analýze s cílem identifikace hlavních skupin střevních mikroorganismů se zaměřením speciálně na druhy *Lactobacillus spp.* a *Brevinema* a bude sledováno případné ovlivnění jejich vzájemného poměru u exponovaných skupin vůči kontrolní skupině. Tato analýza bude doplněná o histologické vyšetření a snímky z elektronového mikroskopu k ověření prostupnosti mikročástic střevní stěnou. Vzorky střeva budou odebírány z více míst ke zjištění vlivu na různé úseky trávicího traktu. Následně bude zjištěn vliv mikroplastů na ukazatele hematologického, biochemického a imunologického profilu ryb. V rámci experimentu budou odebrány také vzorky tkání pro ověření průniku mikročástic do tkání ryb za pomoci elektronové mikroskopie a histologického vyšetření. Dílčím cílem je zjištění vlivu na genovou expresi vybraných pro a protizánětlivých genů (např. *cyp1a*, *tnf-a*, *il1*, *il10* apod.) za pomoci metody kvantitativní qRT-PCR.

Výsledky

Tento experiment bude proveden v roce 2020 s následnou analýzou hematologických, biochemických a imunologických ukazatelů. Předpokládaným výsledkem je zjištění negativního vlivu částic vybraného mikroplastu na střevní mikroflóru, hematologické, biochemické a imunologické parametry organismu pstruha duhového na základě výsledků dostupných studií a již proběhlého experimentu s polyethylenovými mikročásticemi při stejném designu pokusu a stejných expozičních časech a koncentracích.

Poděkování

Studie je finančně podpořena projektem IGA VFU 212/2020/FVHE a ERDF / ESF „PROFISH,, [č. CZ.02.1.01 / 0.0 / 0.0 / 16_019 / 0000869].

Literatura

AVIO, C.G., GORBI, S., REGOLI, F. Plastics and microplastics in the oceans: From emerging pollutants to emerged threat. *Marine Environmental Research*. 2017, no. 128, s. 2–11.

COLE, M., LINDEQUE, P., FILEMAN, E., HALSBAND, C., GOODHEAD, R., MOGER, J., GALLOWAY, T.S. Microplastic ingestion by zooplankton. *Environ. Sci. Technol.* 2013, 47, 6646e6655.

COLE, M., LINDEQUE, P., HALSBAND, C., GALLOWAY, T. S. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*. 2011, vol. 62, no. 12, s. 2588-2597.

DERRAIK, J. G. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*. 2002, vol. 44, no. 9., s 842 -852.

HIDALGO-RUZ, V., GUTOW, L., THOMPSON, R.C., THIEL, M. Microplastics in the marine Environment: A review of the methods used for identification and quantification. *Environmental Science & Technology*. 2012, vol. 46, no. 6, s. 3060–3075.

INVLEVA, N. P., WIESHEU, A. C., NIESSNER, R. Microplastic in aquatic ecosystems. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, vol. 57, no. 7, s. 1720-1739.

LONNSTEDT, O. M., EKLOV, P. Environmentally relevant concentrations of microplastic particles influence larval fish ecology. *Science*. 2016, vol. 352, no. 6290, s. 1213-1216.

KAPOSI, K. L., MOS, B., KELAHER, B. P., DWORJANYN, S. A. Ingestion of microplastic has limited impact on a marine larva. *Environmental Science and Technology*. 2015, vol. 43, no. 3, s. 1638-1645.

ROCHMAN, C. M., TAHIR, A., WILLIAMS, S. L., MAXA, D. V., LAM, R., MILLER, J. T., TEH, F.-C., WERORILANGI, S., TEH, S. J. Anthropogenic debris in seafood: plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. *Scientific Reports*. 2015, vol. 5., s. 14340.

SIVAN, A. New perspectives in plastic biodegradation. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011, vol. 22, no. 3, s. 422-426.

Kontaktní adresa: Aneta Hollerová, Mgr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H19003@vfu.cz

Ekotoxicita zlatých nanočástic pro organismy vodních ekosystémů

Ecotoxicity of gold nanoparticles for organisms of aquatic ecosystems

¹Čaloudová Hana, ²Hlávková Daniela, ²Palíková Pavla, ²Havelková Barbora,
²Beklová Miroslava

¹Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství,

²Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Česká republika

Summary

Gold nanoparticles (AuNPs) are used in a wide range of products and applications. For example, in electronics, medical devices and drugs or cosmetics. With their increasing consumption, an increase in environmental concentrations is expected. To better understand the potential ecotoxicological impact of AuNPs released into the aquatic environment, tests were performed on invertebrates of the trophic levels of producer (*Lemna minor*), consumer (*Daphnia magna*) and destruent (*Vibrio fischeri*), as well as fish embryos (*Danio rerio*). The toxicity of three AuNP suspensions (polyvinylpyrrolidone (PVP) 11.5 d. nm, PVP 15.2 d. nm, citrate 1.1 d. nm) and the ionic form of gold were evaluated. The highest toxicity was recorded in *Vibrio fischeri*. Lowest toxicity was observed in *Daphnia magna*, but even in this case abnormal swimming and accumulation in the intestine were observed. In the case of *Danio rerio*, an increased incidence of edema was observed in all AuNP samples and in the case of AuNP PVP also a decrease in heart rate.

Keywords: *Lemna minor*; *Daphnia magna*; *Vibrio fischeri*; *Danio rerio*; gold chloride

Úvod

Zlaté nanočástice se v současné době používají v široké škále odvětví a produktů, příkladem je výroba elektroniky a zdravotnického vybavení, dále jsou součástí terapeutických látek či kosmetiky a zároveň se využívají u osob postižených nádorovým onemocněním (Asharani et al., 2011; Knoblochová, 2013). Lze tedy předpokládat, že se zvyšující se produkci a spotřebou zlatých nanočástic se zvýší i jejich environmentální koncentrace. Výzkumy potvrzují jejich přítomnost ve všech složkách životního prostředí. Nanočástice se do prostředí dostávají skrze odpad a odpadní vody z domácností i průmyslu, či ve formě emisí (Lapresta - Fernández et al., 2012). Aktuální predikce environmentální koncentrace zlata v odpadních vodách ve Velké Británii je 470 pg/l (Mahapatra et al., 2015). K dispozici je několik studií, které se zabývají ekotoxikologickým efektem zlatých nanočástic na vodní organismy, avšak jejich výsledky a závěry se různí. Proto byly v této studii provedeny ekotoxikologické testy na zástupcích různých trofických úrovní - producenti (okřehek – *Lemna minor*), konzumenti (perloočka – *Daphnia magna* a ryba – *Danio rerio*) a destruenti (bakterie – *Vibrio fischeri*).

Materiál a metodika

Nejprve byly syntetizovány nanočástice zlata o různé velikosti, metodou chemické redukce s použitím citrátu (Cit) a polyvinylpyrrolidonu (PVP) jako redukčního a stabilizačního činidla. Výsledkem byly zlaté nanočástice s průměrnou velikostí částic (d. nm) 1,1 nm, 11,5 nm a 15,2 nm. Pro porovnání toxických účinků zlata byly testy provedeny i s iontovou formou zlata, chloridem zlatitým (AuCl₃). Koncentrační řady testovaných látek byly stanoveny na základě předběžných testů.

Pro posouzení vlivu nanočástic zlata na vodní organismy byly zvoleny testy akutní toxicity dle příslušných norem a metodik (ČSN EN ISO 20079, ČSN EN ISO 6341, ČSN EN ISO 11348 a OECD 213). Rostliny okřešku menšího se nechaly růst po dobu 7 dní v různých koncentracích testované látky rozpuštěné v živném roztoku SIS. V intervalu 24 hodin byl kontrolován počet lístků a jejich stav a po 7 dnech byla stanovena inhibice růstu na základě růstových rychlostí a hmotnosti konečné biomasy. Pomocí komerčně dostupného softwaru TOXICITA 3.1 (VÚV Ostrava, Česká republika) byla na základě získaných inhibičních hodnot vyhodnocena hodnota 168hEC₅₀. Akutní test na perloočkách *Daphnia magna* spočíval ve sledování jejich imobilizace ve zvoleném rozsahu koncentrací testované

látky. Následně byla v 24hodinovém intervalu sledována inhibice pohybu perlooček a zaznamenání jak uhynulí, tak imobilizovaní jedinci. Ze získaných hodnot byla stanovena hodnota 48hEC50 probitovou analýzou pomocí počítačového programu (PROBITY VÚRH Vodňany). Principem bakteriálního bioluminiscenčního testu toxicity je změna intenzity luminiscence mořských světélkujících bakterií *Vibrio fischeri*, vyvolaná negativním působením toxického vzorku. Pomocí luminometru LUMISTox 300 byla stanovena efektivní koncentrace, která způsobí 20% (EC20) nebo 50% (EC50) inhibice emise světla ve srovnání s kontrolou. Do akutního testu toxicity na rybích embryích byly nasazeny oplozené jikry dáňa pruhovaného. Test trvající 96 hodin byl prováděn v triplicátu, semistatickou metodou s výměnou lázně každých 24h. Byla pozorována mortalita a stanovena 96hLC50 probitovou analýzou pomocí počítačového programu Ekotox 5.2. Dále byly zaznamenávány subletální změny, jako například úspěšnost líhnutí, retardace vývoje, vývojové deformity, edémy a další změny. Na základě výsledných hodnot EC/LC byla porovnána citlivost všech testovacích organismů a posouzeno případné environmentální riziko vzhledem k reálným koncentracím nanočástic zlata v životním prostředí.

Výsledky a diskuze

Výsledky akutních testů toxicity jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka 1. Hodnoty EC50 pro *Daphnia magna*; EC50 pro *Lemna minor*, EC50 pro *Vibrio fischeri*, LC50 pro embrya *Danio rerio*.

Testovací organismus	AuCl ₃	PVP10 (11,5 d. nm)	PVP40 (15,2 d. nm)	Cit (1,1 d. nm)
<i>Daphnia magna</i> (48 hod)	0,59 mg/l	169,64 mg/l	195,55 mg/l	78,92 mg/l
<i>Lemna minor</i> (biomasa)	19,55 mg/l	21,96 mg/l	32,43 mg/l	132,11 mg/l
<i>Lemna minor</i> (růstová rychlost)	9,52 mg/l	56,90 mg/l	64,54 mg/l	155,64 mg/l
<i>Vibrio fischeri</i> (30')	0,89 mg/l	41,98 mg/l	26,08 mg/l	-
<i>Danio rerio</i> (96 hod)	52,2 mg/l	140,6 mg/l	93,9 mg/l	165,3 mg/l

Výsledky ekotoxikologických testů se liší v závislosti na druhu organismu a podmínkách testu. Testy akutní toxicity nanočástic zlata u okřehku menšího prokázaly, že biomasa je lepším biomarkerem v porovnání s růstovou rychlostí. Nejvyšší toxicita u zkoumaných vzorků byla zaznamenána u bakterií *Vibrio fischeri*. Naměřené hodnoty EC, které způsobily 50% (EC50) inhibici emise světla ve srovnání s kontrolou byly v rozmezí 0,89–41,98 mg/l. Naopak nejméně toxické byly nanočástice pro perloočky *Daphnia magna*. Rozdílná toxicita nanočástic zlata pro perloočky byla zaznamenána i na základě hodnot střední efektivní koncentrace stanovených dle velikosti částic. Při expozici dafnií byly nanočástice s průměrnou velikostí částic 1,1 nm více toxické (48hEC50 = 78,92 mg/l) než nanočástice s průměrnou velikostí částic 15,2 nm (48hEC50 = 195,55 mg/l). V případě embryí dáňa pruhovaného byla pozorována nižší toxicita zlatých nanočástic v porovnání s AuCl₃, nejnižší hodnota LC50 byla stanovena pro nanočástice s průměrnou velikostí částic 15,2 nm. Pigmentace očí a kůže nebyla ovlivněna žádnou z testovaných látek. Pozorována byla statisticky významná přítomnost srdečních edémů u embryí exponovaných všem testovaným AuNPs v koncentraci 100 mg/l, stejně jako těch exponovaných 75 mg/l PVP10 a Cit. Tento účinek byl nejvýraznější u skupiny vystavené AuNPs PVP10, v tomto případě bylo zasaženo 88% embryí. V případě nanočástic stabilizovaných PVP bylo pozorováno také snížení srdeční frekvence, což svědčí o negativním působení zlatých nanočástic na vývoj oběhového systému embryí dáňa pruhovaného. Obdobné závěry byly publikovány i ve studii Gao et al., 2016, kdy autoři přičítají negativní vliv

stříbrných nanočástic stabilizovaných PVP na vývoj oběhového systému mechanické interferenci, která omezuje difuzi kyslíku a vede k hypoxii embryí a následným změnám v genové transkripci, dochází k indukci syntézy genů pro vaskulární endoteliální růstový faktor, které však nezpůsobí zvýšenou proteosyntézu, protože nanočástice blokuje činnost endoplazmatického retikula.

Závěr

Zjištěné hodnoty EC50 (LC50) potvrzují nízké toxické účinky nanočástic zlata na vodní organismy při krátkodobé expozici. Získané hodnoty efektivních koncentrací nanočástic zlata umožňují predikovat ekotoxické riziko pro zástupce vodní biocenózy, a i když tyto hodnoty jsou vyšší než v současnosti známé environmentální koncentrace, nelze v souvislosti s jejich rostoucím průmyslovým využíváním vyloučit potenciální riziko jejich negativního působení.

Poděkování

Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 217/2019/FVHE.

Literatura

ASHARANI, P. V., LIANWU, Y., GONG, Z., VALIYAVEETIL, S. Comparison of the toxicity of Gold, Silver and Platinum Nanoparticles in Developing Zebrafish Embryos. *Nanotoxicology*. 2011, vol. 5, s. 43–54.

GAO, J., MAHAPATRA, C. T., MAPES, C. D., KHLEBNIKOVA, M., WEI, A., SEPÚLVEDA, M. S. Vascular toxicity of silver nanoparticles to developing zebrafish (*Danio rerio*). *Nanotoxicology*. 2016, vol. 10, no. 9, s. 1363–1372

KNOBLOCHOVÁ, L. Gold nanoparticles as a tool of targeted therapy of cancer. Prague: Charles University. 2013.

LAPRESTA - FERNANDÉZ, A., FERNANDÉZ, A., BLASCO, J. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *Trends in Analytical chemistry*. 2012, vol. 32, s. 40–59.

MAHAPATRA I, SUN TY, CLARK JRA, *et al.* Probabilistic modelling of prospective environmental concentrations of gold nanoparticles from medical applications as a basis for risk assessment. *Journal of Nanobiotechnology*. 2015, vol. 13, no. 93.

Kontaktní adresa: Hana Čaloudová, MVDr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H17345@vfu.cz

Antidepressant fluoxetine as a potential pollutant in water environment

Václavík Josef, Medková Denisa, Sehonová Pavla, Svobodová Zdeňka

¹ Dpt. of Animal Protection and Welfare & Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

Summary

The aim of this article is to describe potential risk of fluoxetine as a potential pollutant in the water environment. Fluoxetine is a type of antidepressant from a group of selective serotonin reuptake inhibitors, which primarily affect the nervous system, mainly brain. It is usually taken by people as pharmaceutical for the treatment of depression, panic disorders, anxiety disorders, anorexia, social phobia and panic stress. In recent years, due to people's hurried lifestyle the rate of use fluoxetine and other antidepressants in the human population has been steadily increasing. Fluoxetine presents a certain ecology danger for the aquatic environment, where it can continually get throw wastewater treatment plants and persists in the range between ng/l to µg/l

Keywords: Fluoxetine; water environment; fish; toxicity test

Introduction

Due to the current trend of increasing drug consumption within human medicine, there is a growing burden on the environment and organisms living in it. An important group consists of psychoactive substances, whose use in the world is constantly increasing. One of the commonly used antidepressants is fluoxetine, which is the main active substance in Prozac. It is a drug that works on the principle of serotonin reuptake, which affects the distribution of this neurotransmitter in the nervous system and consequently the mental state of the patient. Fluoxetine is commonly used in medicine to control depressive states, to treat obsessive-compulsive disorders and to treat mental bulimia. After being expelled from the body, fluoxetine enters the sewage network and passes to sewage treatment plants which are unable to recover it in their entirety. Rezka et al. (2016) in his study reported the efficiency of uptake in wastewater treatment plants in the range of 40 – 90 %. Fluoxetine passes into the aquatic environment, where some of it dissolves in water and the rest is stored in sediment, from where it gradually enters the food chain. Fluoxetine concentrations can be found in aquatic organisms ranging from invertebrates to fish.

Many studies have been published to report the presence of this substance in the aquatic environment. De Solla et al. (2016) report a concentration of 5.81-8.98 ng/g fluoxetine in the tissues of freshwater mussel (*Lasmigona costata*) caught at the outflow of the Grand River sewage treatment plant. Brook et al. (2003) discloses the representation of fluoxetine in individual tissues of brook trout (*Salvenicus fontalis*) from Pecan Creek with values for brain tissue of 1.58 ng/g, liver of 1.36 ng/g and muscle tissue of 0.11 ng/g. Fluoxetine has wide spectrum of effects on aquatic organisms. As well as other antidepressants, fluoxetine has been found to significantly affect fish behavior. Zebrafish (*Danio rerio*) has been reported to have reduced aggression, resulting in a decrease in attacks between fish and mutual persecution (Theodoridi et al., 2017). Similarly, Eisenreich et al. (2017) describe a reduction in the aggressive behavior of siamese fighting fish (*Betta splendens*) by fluoxetine.

In addition, fluoxetine has an effect on the reproductive and endocrine systems. The fish reproductive system, like other vertebrates, is influenced through the neuroendocrine system by the hypothalamus-pituitary-gonads axis (Prasad et al., 2015). Lister et al. (2009) reported a decrease in egg production in zebrafish (*Danio rerio*) due to fluoxetine and decreased ovarian beta estradiol levels without altering gonadosomatic fish indices. Also Menningen et al. (2008)

report a decrease in plasma levels of estradiol and decreased expression of estradiol receptors in goldfish (*Carassius auratus*).

Fluoxetine affects food intake in cichlids (*Cichlasoma dimerus*), resulting in smaller increments and anorexia (Dorelle et al., 2020). Due to exposure to fluoxetine, the average ingestion time of daphnia in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) increased (Weinberger et al. 2013). The presence of antidepressant has a significant influence on the size of liver tissue, where the content of fat and glycogen decreases and protein concentrations increase (Menningen et al., 2008).

Method

A 6 week OECD 215 juvenile growth test will be carried out. Rainbow trout will be used as an experimental organism. The fish will be placed in experimental tanks of 180 l. The tested drug fluoxetine will be administered to experimental fish 2 times a day built into biomar feed. Doses of the administered drug will be based on concentrations commonly occurring in the environment. The stability of the test conditions will be ensured by daily measurement of water quality in individual aquariums. At the end of the experiment, fish are killed and samples are taken for individual determinations.

Evaluation

Changes in the behaviour and escape reactions of fish will be monitored during the test. Blood collection will be carried out to assess changes in the haematological and biochemical profile. Any morphological changes (especially parenchymatous tissues) will be subjected to histological examination. Testing of antioxidative stress will show possible changes in the activity of the detoxification system

Conclusion

Currently, some negative effects of fluoxetine on aquatic organisms are known. Due to the increase in concentrations of antidepressants in the environment, it is topical to deal with this issue in detail. The aim of the experiment is to extend the knowledge of the effect of fluoxetine on fish

References

- Brooks, B.W, Foran, Ch.M., Richards, S.M., Weston, J., Turner, P.K., Stanley, J.K., Solomon, K.R., Slaterry, M., La Point, T. W., Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. Toxicology Letters, Vol.142, 2003, 169 -183.
- Brooks, B.W., Chambliss ,C.K., Stanley, J.K., Ramirez, A., Banks, K.E., Johnson, R.D., Lewis, R.J., Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. Environ Toxicol Chem., Vol. 24, 2005, 464 – 469.
- Dorelle, L.S., Cuna da, R.H., Sganga, D.E., Rey Vazquez, G., Greco, L.L., Nostro, F.N.N., Fluoxetine exposure disrupts food intake and energy storage in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Cichliformes). Chemosphere, Vol. 238, 2020, 124609.
- Eisenreich, B.R., Greene, S., Szalda – Petree, A., Of fish and Mirrows: Fluoxetine disrupts aggression and learning for social rewards. Physiology and Behavior, Vol. 173, 2017, 285 – 262.
- Lister, A., Regan, C., Van Zwol, J., Van der Kraak, G., Inhibition of egg production in Zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: a mechanistic evaluation. Aquatic Toxicology, Vol. 95, 2009, 320 – 329.

Mennigen, J.A., Martyniuk, C.J., Crump, K., Xiong, H., Zhao, E., Popesku, J., Anisman, H., Cossins, A.R., Xia, X., Trudeau, V.L., Effects of fluoxetine on the reproductive axis of female goldfish (*Carassius auratus*). *Physiological Genomics*, Vol. 35, 2008, 273-282.

Prasad, P., Ogawa, S., Parhar, I.S., Role of serotonin in fish reproduction. *Front. Neurosci.*, Vol. 9, 2015.

Rezka, P., Balcerzak, W., Occurrence of antidepressants – from wastewater to drinking water. *Technical Transactions*, Vol. 1, 2016, 145 – 155.

Solla de, S.R., Gilroy, E.A.M., Klinck, J.S., King, L.E., McInnis, R., Struger, J., Backus, S.M., Gillis, P.L., Bioaccumulation of pharmaceuticals and personal care products in the unionid mussel *Lasmigona costata* in a river receiving wastewater effluent. *Chemosphere*, Vol. 146, 2016, 486 – 496.

Theodoridi, A., Tsalafouta, A., Pavlidis, M. Acute Exposure to Fluoxetine Alters Aggressive Behavior of Zebrafish and Expression of Genes Involved in Serotonergic System Regulation. *Front Neurosci.*, 2017.

Weinberger, J., Klaper, R., Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow). *Aquatic toxicology*, Vol. 151, 2014, 77 – 83.

Contact address: Josef Václavík, MVDr., Dpt. of Animal Protection and Welfare & Veterinary Public Health, FVHE UVPS Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H17014@vfu.cz

Vliv ethinylestradiolu na celosamčí triploidní populaci dánia pruhovaného (*Danio rerio*)

Effect of ethinylestradiol on all male triploid population of *Danio rerio*

¹Koutková Zuzana, ³Zentrichová Viola, ²Medková Denisa, ²Blahová Jana, ²Svobodová Zdeňka

¹Ústav hygiena a technologie potravin živočišného původu a gastronomie,

²Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství,

³Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Česká republika

Summary

The occurrence of estrogen hormones in surface waters and sediments is known. It is also known that these substances may affect aquatic organisms. One of many sources of estrogen in water is a hormonal contraceptive in which ethinylestradiol is used as one of the active ingredients. During our 10-week toxicity test, we tested the effect of ethinylestradiol on *Danio rerio* (zebrafish). For better monitoring of specific changes caused by estrogenic substances in males who are more sensitive, we decided to use triploid form *Danio rerio*. In case of *Danio rerio*, triploidy will guarantee the male sex of the experimental animals. It was important for our experiment to know that we worked with male from an early age. In the evaluation of the experiment we determined the levels of vitellogenin in the whole-body homogenate and a histological examination of gonads was performed.

Keywords: ethinylestradiol; zebrafish; *Danio rerio*; vitellogenin; triploid

Úvod

Testování vlivu xenoestrogenních látek na vodní organismy je již dlouhodobě aktuální téma. Řada autorů zkoumá vliv těchto látek na ryby v rozličných fázích věku (Tyler et al. 1999, Žlábek et al. 2009). U starších jedinců je možné již rozlišit pohlaví ryb, u experimentů začínajících v raném věku ale nezbyvá než předpokládat rovnoměrné rozložení samců a samic. Náš experiment začínal během druhého týdne života ryb a z důvodu testování vlivu estrogenních látek na samčí pohlaví bylo zásadní zajistit přítomnost pouze samců. Toho jsme docílili použitím triploidních forem dánia pruhovaného. Triploidie byla indukována teplotním šokem, který způsobil nerovnoměrnou funkci pólových tělísek během mitotického dělení buňky. V důsledku toho nedošlo k rovnoměrnému rozdělení chromozomů a vznikli triploidní jedinci (Flajšhans et al. 2020). Bylo zjištěno, že u dánia pruhovaného jsou triploidní jedinci pouze samčího pohlaví (Delomas et Dabrowski 2018). Účelem tohoto experimentu bylo zjistit, zda je možné využít triploidní formy dánia pruhovaného k detekci xenoestrogenně působících látek ve vodním prostředí.

Metodika

Před započítím experimentu bylo třeba převést testovanou látku ethinylestradiol do formy, kterou je možné aplikovat pokusným zvířatům. Ethinylestradiol a estradiol pro jednu z kontrolních skupin byly aplikovány do krmné směsi metodou impregnace. Testované látky byly rozpuštěny v 96% lihovém roztoku ve třech různých koncentracích pro ethinylestradiol a v jedné koncentraci pro estradiol. Koncentrace látek byly odvozeny na základě dostupné literatury a experimentů podobného zaměření (Xu et al. 2008, Wang et al. 2019). Do krmiva Gemma micro (Skretting a Nutreco company) byl pro stabilizaci vlastností přidán Aerosil (křemičitanový sorbent) v množství 1 % na dávku krmiva. Krmivo bylo rovnoměrně rozděleno a smícháno s lihovým roztokem obsahujícím testované látky. Po vysušení bylo připraveno ke zkrmení.

Indukce triploidie byla vyvolána teplotním šokem. Dvě minuty po in-vitro oplození byla embrya přemístěna do vodní lázně o teplotě 41,3°C. Po dvou minutách byla embrya z lázně přemístěna zpět do vody se standardní teplotou. Před započítáním experimentu byla úspěšnost triploidie ověřena na vzorku ryb pomocí průtokové cytometrie.

Experiment v délce 10 týdnů započal po třídenní fázi aklimatizace ryb v pokusných akváriích. Po dobu experimentu byly ryby krmeny 3x denně a testované krmivo ochotně přijímaly. Jednou denně se prováděla výměna vodní lázně. Současně se odebíraly vzorky vody, ve kterých jsme sledovaly hladiny základních fyzikálně-chemických parametrů.

Na konci experimentu byly ryby usmrceny pomocí látky MS222. Ryby byly zváženy a rozděleny na skupiny dle požadovaného vyšetření. Pro detekci vitellogeninu byly vzorky hluboce zamrazeny. Vzorky určené k histologickému vyšetření byly fixovány ve formadehydu.

Ke stanovení hladiny vitellogeninu byl použit ELISA (enzyme-linked immune sorbent assay) kit (Biosense Laboratories AS) určený pro dáňo pruhované. Testovanou tkání byl celotělový homogenát. Připravili jsme tři různá ředění vzorků a následně po inkubaci odečítali absorbanci při vlnové délce 492 nm pomocí Multiskan RC (Labsystems, Helsinki, Finland).

Naměřené hodnoty byly statisticky vyhodnoceny pomocí Shapiro-Wilkova testu normality a mnohonásobného porovnání (Turkey-HSD).

Výsledky

Na základě získaných výsledků můžeme říci, že ryby z pokusné skupiny C (krmivo obsahem ethinylestradiolu 0,1mg/100g) vykazovaly statisticky velmi významný rozdíl ($p < 0,05$) v indukci vitellogeninu v porovnání se skupinou A (kontrolní skupina) a skupinou B (ryby krmené krmivem s příměsí estradiolu v množství 0,01 mg/100g). Skupina C také vykazovala statisticky významný rozdíl ($p < 0,1$) v porovnání se skupinou E (ryby krmené krmivem s obsahem ethinylestradiolu v množství 0,001 mg/100g).

Tabulka 1. Vyhodnocení hladin vitellogeninu v celotělovém homogenátu dáňo pruhovaného.

Skupina	Pozitivní/celkový počet	Medián [ng/ml]	Minimum [ng/ml]	Maximum [ng/ml]
A	1/9	50,0	50,0	15723,4
B	7/12	4371,8	50,0	13686,6
C	13/13	23376111,1	14545022,3	48337916,7
D	10/12	11209,7	50	101316,7
E	7/12	6749,9	50	140622,9

Skupina A (kontrola), skupina B (estradiol - 0,01 mg/100g), skupina C (ethinylestradiol - 0,1 mg/100g), skupina D (0,01 - mg/100g), skupina E (0,001 - mg/100g).

Diskuze a závěr

V rámci našeho 10-týdenního experimentu jsme testovali vliv perorálního příjmu ethinylestradiolu na indukci vitellogeninu u triploidních forem dáňo pruhovaného. Na základě zjištěných výsledků můžeme říci, že vysoká hladina (0,1 mg/100g) ethinylestradiolu měla velmi významný vliv na indukci syntézy vitellogeninu u samců těchto ryb. Tato hladina je ale násobně vyšší než množství běžně se vyskytující se ve vodních tocích. Pro zjištění vlivu dlouhodobého vlivu příjmu nízkých hladin ethinylestradiolu na triploidní formy dáňo pruhovaného by bylo pravděpodobně třeba provést experiment v násobně delší době trvání. Je také známo, že látky estrogenního charakteru mají schopnost kumulace ve tkáních (Liu et al. 2015). Tím vzniká riziko i pro další zástupce v potravním řetězci, využívající ryby jako jeden ze zdrojů obživy.

Poděkování

Tento projekt byl financován v rámci projektu IGA VFU: 224/2019/FVHE. Za spolupráci děkuji také Fakultě rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a Ústavu zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství Mendelovy univerzity v Brně.

Literatura

DELOMAS, T.A.; DABROWSKI, K. Why are triploid zebrafish all male? *Molecular Reproduction and Development*. 2018, vol. 85, s. 612-621.

FLAJŠHANS, M.; HAVELKA, M.; LEBEDA, I.; RODINA, M.; GELA, D.; HUBÁLEK, M. Application of hydrostatic pressure shock for retention of the second polar body in sterlet (*Acipenser ruthenus*). *Aquaculture*. 2020, vol. 520, 734947.

LIU, S.; CHEN, H.; XU, X.R.; LIU, S.S.; SUN, K.F.; ZHAO, J.L.; YING, G.G. Steroids in marine aquaculture farms surrounding Hailing Island South China: Occurrence, bioconcentration, and human dietary exposure. *Science of the Total Environment*. 2015, vol. 502, s. 400-407.

TYLER, CH.R.; AERLE, R.V.; HUTCHINSON, T.H.; MADDIX, S.; TRIP, H. An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1999, vol. 18, no. 2, s. 337-347.

WANG, Y.; LI, Y.; CHEN, Q.; LIU, Z. Long-term exposure of xenoestrogens with environmental relevant concentrations disrupted spermatogenesis of zebrafish through altering sex hormone balance, stimulating germ cell proliferation, meiosis and enhancing apoptosis. *Environmental Pollution*. 2019, vol. 244, s. 486-494.

XU, H.; YANG, J.; WANG, Y.; JIANG, Q.; CHEN, H.; SOMG, H. Exposure to 17 α -ethynylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*. 2008, vol. 88, s. 1-8.

ŽLÁBEK, V.; RANDÁK, T.; KOLÁŘOVÁ, J.; SVOBODOVÁ, Z.; KROUPOVÁ, H. Sex differentiation and vitellogenin and 11-ketotestosterone levels in chub, *Leuciscus cephalus* L., Exposed to 17 β -estradiol and testosterone during early development. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2009, vol. 82, s. 280-284.

Kontaktní adresa: Zuzana Koutková, MVDr., Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H18014@vfu.cz

Změny vybraných biochemických parametrů u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) po expozici ethylhexyl methoxycinamátu
Changes of selected biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after ethylhexyl methoxycinamate exposure

Cahová Jana, Blahová Jana, Svobodová Zdeňka

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

Summary

*The aim of this study was to evaluate biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after ethylhexyl methoxycinamate (EHMC) exposure. EHMC was incorporated into feeding pellets to simulate the nature conditions of dietary exposure. Testing concentrations were 10, 100 and 1000 µg/kg and experiment was conducted for six weeks. Samples of plasma were examined for several biochemical parameters. The most significant effects were recorded in the highest concentration for glucose, lactate, cholesterol, total protein, albumin and ammonia. For evaluation of oxidative stress we demonstrated decrease of a plasma reduction potential in all tested groups.*

Keywords: UV filter; EHMC; oxidative stress; fish

Úvod

Problematika UV filtrů a jejich výskytu v životním prostředí je v poslední době poměrně diskutovaným tématem. UV filtry jsou hojně využívány v kosmetických přípravcích (např. krémy, tělová mléka, šampóny, balzámy na rty apod.) na ochranu proti škodlivému slunečnímu záření. V důsledku jejich nadužívání se dostávají do celého ekosystému. UV filtry jsou těžko degradovatelné a čistírnami odpadních vod nedostatečně eliminované. Nutno podotknout, že většina UV filtrů nevykazuje akutní toxicitu, ovšem závažnější je jejich chronické působení, a to i v environmentálně relevantních koncentracích. Jelikož jsou mnozí ze zástupců UV filtrů považováni za lipofilní sloučeniny, ukládají se snadno v sedimentech a také v organismech. UV filtry mohou vyvolat u zkoumaných jedinců narušení fyziologických funkcí na různých úrovních. Po expozici UV filtry byly u dána pruhovaného (*Danio rerio*) prokázány změny vybraných biochemických parametrů (Quintaneiro et al. 2019) a oslabení antioxidační kapacity organismu (Zhou et al. 2019). Známé jsou i embryotoxické účinky UV filtrů (Li et al. 2018) a jejich schopnost narušovat funkce endokrinního systému (Lee et al. 2019). Vzhledem k faktu, že se tyto látky hojně dostávají do vodního prostředí, byl jako testovaný druh zvolen zástupce vodního organismu - pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*).

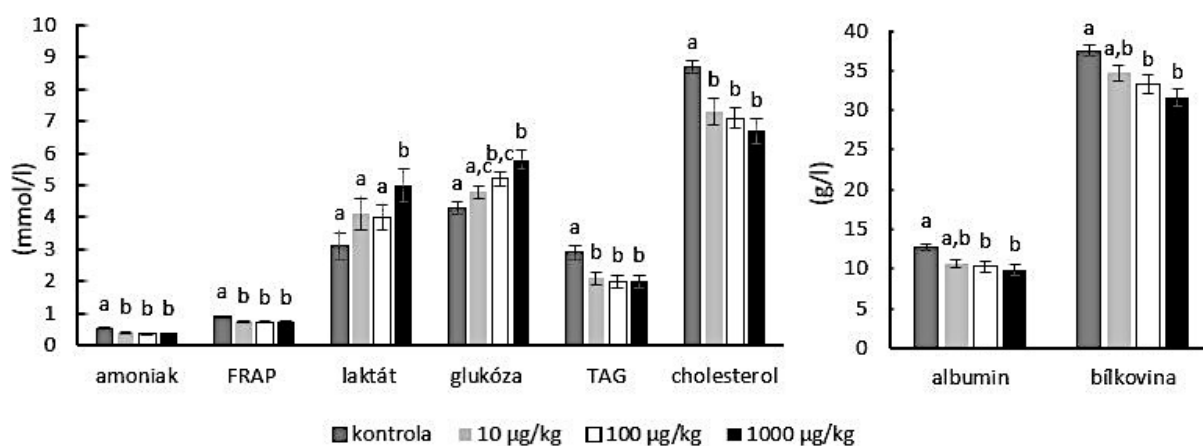
Materiál a metodika

Cílem experimentu bylo zhodnocení vlivu organického UV filtru ethylhexyl methoxycinamátu (EHMC) na juvenilní stádium pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). EHMC je jeden z nejčastěji používaných UV filtrů v kosmetických přípravcích. Zvolené byly 3 různé koncentrace: 10, 100 a 1000 µg/kg. Nejnižší koncentrace reprezentuje environmentální koncentraci v biotických maticích a další koncentrace byly zvoleny pro porovnání nárůstu účinku při zvyšující se dávce testované látky. Součástí testů byla také kontrolní skupina. Test probíhal po dobu 6-ti týdnů v semistatickém systému. Zkoumaná látka byla aplikována do krmných pelet pro simulaci přirozených podmínek dietární expozice. Krmné pelety s přídatkem testované látky byly připraveny smícháním krmiva s rozpuštěným standardem a speciálním kopolymerem Eudragitem® E, který umožnil ukotvení a stabilizaci povrchu pelet s adhezí látkou. Ryby byly krmeny 3-krát denně v souhrnné dávce 1,5 % celkové hmotnosti. V průběhu celého testu byly dvakrát denně kontrolovány chemické parametry vody (teplota, koncentrace kyslíku,

koncentrace amoniakálního dusíku, dusitanového dusíku a chloridů). Po ukončení experimentu byly odebrány vzorky krve z ocasní cévy. Pro stanovení biochemických parametrů byla krev aplikována do zkumavek s obsahem heparinu lithného. Krev byla následně odstředěna (10 minut, 4 °C, 3000 otáček/min). Získaná plazma byla zamražena a uschována pro další analýzy při teplotě –80 °C. Ke stanovení biochemických parametrů byl využit biochemický analyzátor Konelab 20i a komerční kity od firmy Biovendor. Sledovány byly koncentrace albuminu, celkové bílkoviny, glukózy, laktátu, cholesterolu, triacylglycerolů (TAG), amoniaku, kreatininu, vápníku a fosforu. Dále byly analyzovány aktivity vybraných enzymů alkalická fosfatáza (ALP), alaninaminotransferáza (ALT), aspartátaminotransferáza (AST) a laktátdehydrogenáza (LDH). Indikátory celkové antioxidační kapacity organismu byly sledovány pomocí redukčního potenciálu plazmy (FRAP) a koncentrace neenzymatického antioxidantu ceruloplazminu. Stanovení bylo provedeno spektrofotometricky.

Výsledky

V grafu č.1 jsou znázorněny výsledky biochemického vyšetření vybraných ukazatelů, u kterých byly prokázány statisticky významné rozdíly testovaných skupin v porovnání s kontrolou. Změny byly zaznamenány především v koncentracích 100 a 1000 µg/kg. Při hodnocení parametrů oxidativního stresu bylo prokázáno pouze snížení FRAP. Rozdíl oproti kontrolní skupině byl hodnocen jako statisticky významný u všech testovaných skupin. U ostatních parametrů (ALT, AST, ALT, kreatinin, vápník, fosfor a ceruloplazmin) nebyly prokázány statisticky významné rozdíly mezi skupinami.



Graf 1. Výsledky biochemického vyšetření krve po expozici EHMC (rozdílná písmena indikují statistickou významnost $p < 0,05$); FRAP (redukční potenciál plazmy); TAG (triacylglyceroly).

Diskuze

Naměřené hodnoty biochemických parametrů naznačují významné zatížení organismu ryb stresem. Primárním zdrojem energie pro boj se stresem jsou sacharidy. Na zvýšenou koncentraci glukózy v krvi v důsledku působení kortizolu a katecholaminů během stresu u lososa kusiče (*Oncorhynchus kusi*) poukázal například Nakano et al. (2014). Zvýšená koncentrace laktátu také koresponduje s predikcí stresové etiologie, neboť zvýšené množství laktátu v krvi je způsobeno aktivací anaerobní glykolýzy (Yang et al. 2019). Výsledky našeho experimentu prezentující sníženou koncentraci amoniaku v krvi lze dále porovnat s výsledky studie vedené autory Eom et al. (2020). Autoři vysvětlují snížení amoniaku jako důsledek hyperventilace zapříčiněné stresem. Pokud se během stresové situace vyčerpají primární zdroje energie, je nutné aktivovat energetické rezervy skryté v bílkovinách a tucích. U embrya kapra obecného (*Cyprinus carpio*) vystaveného látce triclosan, což je lipofilní sloučenina obdobně jako námi zkoumané EHMC, bylo prokázáno snížení proteinů (Dar et al. 2020). Navíc v

důsledku oxidativního stresu dochází k nadprodukci volných radikálů, které mohou poškodit jednotlivé proteiny a tato destrukce se může projevit jejich snížením v krvi (Yang et al. 2020). Katabolismem tuků, mezi které patří například cholesterol a triacylglyceroly, získá organismus velké množství energie nezbytné pro vyrovnání se se stresovou situací (Kaneko et al. 2008). Hypotézy popsané výše lze v našem experimentu podpořit sníženým redukčním potenciálem antioxidantů v plazmě.

Závěr

Na základě získaných výsledků lze předpokládat, že UV filtr EHMC má negativní vliv na necílové organismy. Zkoumaná látka poškozuje organismus ovlivněním sacharidového, lipidového i bílkovinného metabolismu. Snížení FRAP naznačuje, že z biochemického hlediska je UV filtr EHMC spouštěčem oxidativního stresu. Tuto hypotézu je však nutno podložit dalšími analýzami, jako je zhodnocení jednotlivých antioxidantů, popřípadě histologickým vyšetřením jednotlivých tkání.

Poděkování

Studie byla financována grantem IGA VFU Brno 226/2019/FVHE.

Literatura

DAR, O.I.; SHARMA, S.; SINGH, K.; SHARMA, A.; BHARDWAJ, R.; KAUR, A. Biochemical markers for prolongation of the acute stress of triclosan in the early life stages of four food fishes. *Chemosphere*. 2020, vol. 247, 125914.

EOM, J.; FEHSENFELD, S.; WOOD, C.M. Is ammonia excretion affected by gill ventilation in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*? *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 2020, vol. 275, 103385.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M. *Clinical biochemistry of domestic animals* (6th ed). 2008, Academic Press/Elsevier.

LEE, I.; LEE, J.; JUNG, D.; KIM, S.; CHOI, K. Two generation exposure to 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate (EHMC) in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and its reproduction and endocrine related effects. *Chemosphere*. 2019, vol. 228, s. 478-484.

LI, A.J.; LAW, J.C.F.; CHOW, C.H.; HUNAG, Y.; LI, K.; LEUNG, K. S.Y. Joint Effects of Multiple UV Filters on Zebrafish Embryo Development. *Environmental Science & Technology*. 2018, vol. 52, s. 9460–9467.

NAKANO, T.; KAMEDA, M.; SHOJI, Y.; HAYASHI, S.; YAMAGUCHI, T.; SATO, M. Effect of severe environmental thermal stress on redox state in salmon. *Redox Biology*. 2014, vol. 2, s. 772-776.

QUINTANEIRO, C.; TEIXEIRA, B.; BENEDÉ, J.L.; CISVERT, A.; SOARES, A.M.V.M.; MONTENEIRO, M.S. Toxicity effects of the organic UV-filter 4-methoxybenzylidene camphor in zebrafish embryos. *Chemosphere*. 2019, vol. 218, s. 273-281.

YANG, S.; WU, H.; HE, K.; YAN, T.; ZHOU, J.; ZHAO, L.L.; SUN, J.L.; LIAN, W.Q.; ZHANG, D.M.; DU, Z.J.; LUO, W.; HE, Z.; YE, X.; LI, S.J. Response of AMP-activated protein kinase and lactate metabolism of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) under acute hypoxic stress. *Science of The Total Environment*. 2019, vol. 666, s. 1071-1079.

YANG, C.; LIM, W.; SONG, G. Review: Mediation of oxidative stress toxicity induced by Pyrethroid pesticides in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2020, 108758.

ZHOU, R.; LU, G.; YAN, Z.; BAO, X.; ZHANG, P.; JIANG, R. Bioaccumulation and biochemical effects of ethylhexyl methoxy cinnamate and its main transformation products in zebrafish. *Aquatic Toxicology*. 2019, vol. 214, 105241.

Kontaktní adresa: Jana Cahová, MVDr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného lékařství, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H18015@vfu.cz

Porovnanie alkalickéj a neutrálnej kométovej analýzy po expozícii neonikotínoidom

Comparison of alkaline and neutral comet analysis after neonicotinoid exposure

Koleničová Simona, Holečková Beáta, Galdíková Martina, Schwarzbacherová Viera, Halušková Jana, Drážovská Monika

Ústav genetiky, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Slovenská republika

Summary

Comet assay under *in vitro* conditions is recommended as a suitable test in technical guidance documents for the registration, evaluation and authorization of chemicals and is widely used for testing the genotoxicity of pesticides, nanoparticles and drugs. In our work, we tested the commercial product Calypso® 480SC with the active substance of thiacloprid in concentrations of 30; 60; 120; 240 and 480 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ on isolated bovine lymphocytes that were exposed to the insecticide 2 hours after isolation and during the last 2 hours of 48 hour culture under alkaline and neutral conditions. Alkaline comet analysis after 2 hours exposure to Calypso showed a significant increase in DNA damage with statistical significance at concentrations of 60 to 480 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ** $p < 0.01$ and 120, 240, 480 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ *** $p < 0.001$, ANOVA, Dunnet's test) and 48-hour cultivation showed statistically significant DNA damage at concentrations of 240 to 480 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (240, 480 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ * $p < 0.05$, ANOVA, Dunnet's test). Neutral comet analysis showed statistically significant DNA damage only at a concentration of 480 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (480 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ * $p < 0.05$, ANOVA, Dunnet's test). The results of our experiment show that after 2 hours exposure of bovine lymphocytes to Calypso 480SC, % DNA in the tail of the comets increased due to increasing concentrations of insecticide, when higher damage was detected in alkaline comet assay.

Keywords: alkaline and neutral comet assay; genotoxicity; DNA damage; lymphocyte

Úvod

Kométovej analýze sa už mnoho rokov používa ako citlivá metóda na hodnotenie poškodenia DNA v eukaryotických bunkách. Tento test umožňuje meranie dvojlákových a jednolákových zlomov DNA v *in vivo* aj *in vitro* podmienkach, čo môže byť spôsobené interakciou DNA s genotoxickými látkami, preto sa používa na zisťovanie genotoxického poškodenia DNA (Collins a kol., 2014). Podľa podmienok, za ktorých sa kométovej analýze vykonáva sa delí na alkalickú a neutrálnu. Alkalická analýza je najbežnejšie používaná na meranie poškodenia DNA v eukaryotických bunkách. Alkalické podmienky tiež degradujú RNA a odhaľujú viac lézií DNA, vrátane jednolákových zlomov, dvojlákových zlomov a alkalicky labilných miest, takže sú citlivejšie ako neutrálne podmienky, ktoré odhaľujú iba dvojlákové zlomy (Singh, 2016). Neonikotínoidy sú jednou z najdôležitejších tried insekticídov chemicky príbuzných nikotínu. Bežne sa používajú aj vo veterinárnej medicíne ako účinná liečba bĺch pre psov a mačky. Neonikotínoidy sú systémové; majú dlhú perzistenciu a sú vysoko rozpustné vo vode. Všetky tieto vlastnosti vedú k možnosti kontaminácie životného prostredia a nepriaznivých účinkov na cieľové organizmy (Morrissey a kol., 2015).

Cieľom tejto práce bolo použitím alkalickéj a neutrálnej kométovej analýzy stanoviť potenciálny genotoxický účinok komerčného prípravku Calypso® 480 SC na bovinných lymfocytoch po 2 hodinovej expozícii (s kultiváciou a bez nej).

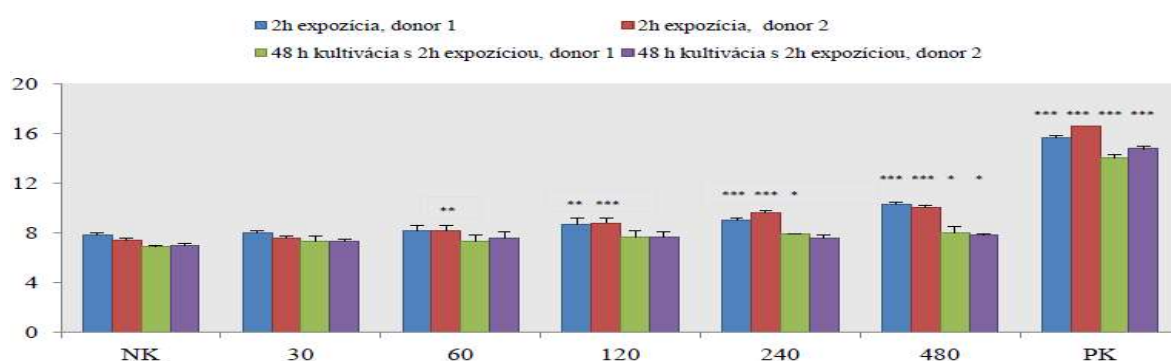
Materiál a metodika

Pri alkalickéj a neutrálnej kométovej analýze boli lymfocyty periférnej krvi hovädzieho dobytky izolované pomocou separačného média Histopaque 1077. Lymfocyty boli inkubované v kultivačnom médiu a boli vystavené pôsobeniu insekticídu Calypsu 480SC (koncentrácie

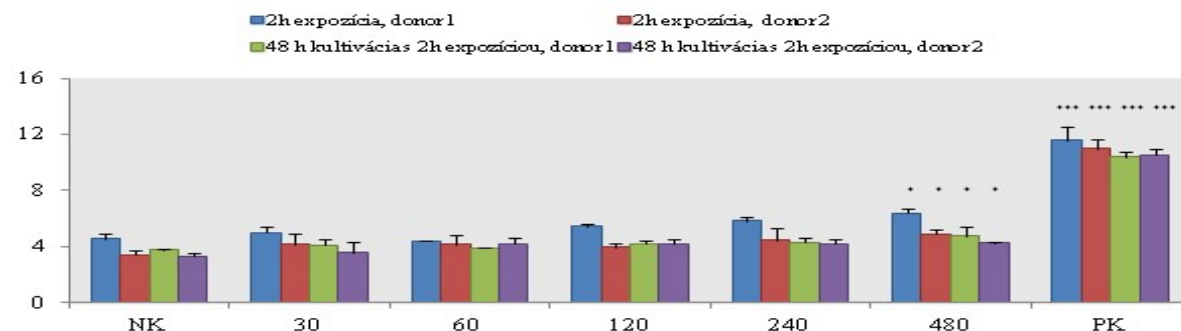
30,60,120, 240 a 480 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), destilovanej vode (negatívna kontrola) a H_2O_2 (pozitívna kontrola) počas doby 2 hodín (2 hodiny po izolácii - neproliferujúce a počas posledných 2 hodín 48 hodinovej kultivácie – proliferujúce lymfocyty). Pred lýzou sa bunky zmiešali s agarózou s nízkou teplotou topenia (LMP). Pomocou Trypanovej modrej bola určená relatívna životaschopnosť buniek. Bolo analyzovaných celkovo 100 komét pomocou fluorescenčného mikroskopu Nikon ECLIPSE Ni-U, vybaveného filtrom Texas Red. Percento poškodenia DNA vo chvoste bolo u vzniknutých komét analyzované pomocou softvéru CASP. Výsledky boli vyhodnotené štatistickou metódou ANOVA, Dunnetov test.

Výsledky

Výsledky poškodenia DNA v neproliferujúcich a proliferujúcich lymfocytoch periférnej krvi u hovädzieho dobytku pri alkalickéj kométovej analýze po expozícii Calypsom (koncentrácie 30, 60, 120, 240 a 480 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) sú zhrnuté na Obr. 1. Na Obr. 2 sú sumarizované výsledky neutrálnej analýzy.



Obrázok 1. Rozsah poškodenia DNA (% DNA vo chvoste) bovinných lymfocytov po vystavení pôsobeniu komerčnému prípravku Calypso 480 SC v priebehu 2 hodinovej expozície (alkalická kométovej analýza).



Obrázok 2. Rozsah poškodenia DNA (% DNA vo chvoste) bovinných lymfocytov po vystavení pôsobeniu komerčnému prípravku Calypso 480 SC v priebehu 2 hodinovej expozície (neutrálna kométovej analýza).

Pri alkalickéj kométovej analýze po 2 hodinovej expozícii Calypsou došlo k výraznému zvýšeniu poškodenia DNA so štatistickou významnosťou pri koncentráciách 60 až 480 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ** $p < 0,01$ a 120, 240, 480 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ *** $p < 0,001$, ANOVA, Dunnetov test) a pri 48 hodinovej kultivácii došlo k štatisticky významnému poškodeniu DNA pri koncentráciách 240 až 480 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (240, 480 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ * $p < 0,05$, ANOVA, Dunnetov test). Neutrálnou kométovej analýzou došlo k štatisticky významnému poškodeniu DNA iba pri koncentracii 480 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (480 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ * $p < 0,05$, ANOVA, Dunnetov test). Životaschopnosť neproliferujúcich a proliferujúcich lymfocytov u oboch donorov pri alkalickéj variante po expozícii Calypsou® bola vyššia ako 86,7% a pri neutrálnej bola vyššia ako 83,3%.

Diskusia

Možné genotoxické účinky komerčného prípravku Calypso® 480SC sa hodnotili v bovinných lymfocytoch pomocou alkalickkej a neutrálnej kométovej analýzy. Neonikotinoidy pôsobia selektívne ako agonisti nikotínových acetylcholinových receptorov v centrálnom nervovom systéme hmyzu. Naše výsledky ukazujú, že prípravok Calypso® je schopný indukovať štatisticky významné poškodenia DNA najmä za alkalických podmienok. Nami získané údaje súhlasia s predtým publikovanými výsledkami u hovädzích lymfocytov po expozícii Calypsu® (Galdíková a kol., 2015). Insekticíd sa testoval pri koncentráciách v rozmedzí od 30 do 480 ug.ml⁻¹. Lymfocyty boli kultivované počas 24 hodín a exponované pesticídom počas posledných 2 hodín. Zvýšené hladiny poškodenia DNA sledovali autori od koncentrácie 120 ug.ml⁻¹ smerom nahor. Taktiež sa po expozícii Calypsu® v ľudských periférnych lymfocytoch zistilo významne zvýšené percento poškodenia DNA vo chvoste (Calderon-Segura a kol., 2012), a to po krátkej expozícii (2 h) s koncentraciami Calypsu® v rozmedzí od 0,6 do 1,4 x 10⁻¹ M bez kultivácie. Zmeny boli zistené pri všetkých testovaných koncentráciách. Naše porovnanie rôznych kultivačných podmienok proliferujúcich a neproliferujúcich buniek a použitie dvoch typov kométovej analýzy (alkalická a neutrálna) ukázalo, že prípravok Calypso® bol schopný spôsobiť významné zmeny v molekulách DNA sledovaných buniek hovädzieho dobytku. Dôvodom môžu byť rôzne mechanizmy detekcie, počiatočné poškodenie genómu sa môže opraviť počas kultivačného procesu. Kométovej analýza indukuje počiatočné poškodenie genómu, kedy proces opravy nie je dostatočný alebo nemôže nastať (Kassie a kol., 2000).

Záver

Na záver možno povedať, že komerčný insekticíd Calypso® môže zmeniť genetický materiál bunky. Taktiež sa zistilo, že kométovej analýza je vhodná na včasnú detekciu poškodenia DNA v kultúrach živočíšnych buniek za rôznych kultivačných podmienok.

Pod'akovanie

Štúdia bola finančne podporená projektom VEGA 1/0242/19.

Literatúra

CALDERÓN-SEGURA, M.E., GÓMEZ-ARROYO, S., VILLALOBOS-PIETRINI, R., MARTÍNEZ-VALENZUELA, C., CARBAJAL-LÓPEZ, Y., CALDERÓN-EYQUERRO, M.C., CORTÉS-ESLAVA, J., GARCÍA-MARTÍNEZ, R., FLORES-RAMÍREZ, D., RODRÍGUEZ-ROMERO, M.I. at al. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects in human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* to neonicotinoid insecticides news. *Journal of Toxicology*. 2012, 612647.

COLLINS, A.R., EL YAMANI, N., LORENZO, Y., SHAPOSHNIKOV, S., BRUNBORG, G., AZQUETA, A. Controlling variation in the comet assay. *Frontiers in Genetics*. 2014, vol. 5, p.1-6.

GALDÍKOVÁ, M., ŠVIKOVÁ, K., HOLEČKOVÁ, B., DIANOVSKÝ, J., DRÁŽOVSKÁ, M., SCHWARZBACHEROVÁ, V. The effect of thiacloprid formulation on DNA/chromosome damage and changes in GST activity in bovine peripheral lymphocytes. *Journal of Environmental Science and Health B*. 2015, vol. 50, p. 698-707.

KASSIE, F., PARZEFALL, W., KNASMULLER, S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutation Research*. 2000, vol. 463, p. 13–31.

MORRISSEY, C.A., MINEAU, P., DEVRIES, J.H., SANCHEY-BAYO, F., LIESS, M., CAVALLARO, M.C., LIBER, K. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: a review. *Environment International*. 2015, vol. 74, p.291–303.

SINGH, N.P. The comet assay: Reflections on its development, evolution and applications. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2016, vol. 767, p. 23-30.

Kontaktná adresa: Simona Koleničová, MVDr., Ústav genetiky, UVLF Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika, simonakovacovamail@gmail.com

SEKCE 5

Veterinární ekologie a choroby volně žijících zvířat

Plasmids in pathogenic multiresistant *Escherichia coli*

^{1,2}Palkovičová Jana, ^{1,2}Kutilová Iva, ³DelaFuente Javier, ⁴Phan Minh Duy,
¹Medvecký Matej, ³San Millan Alvaro, ^{1,2}Dolejská Monika

¹Central European Institute of Technology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

²Dpt. of Biology & Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic

³Department of Microbiology Hospital Universitario Ramón y Cajal (IRYCIS), Madrid, Spain

⁴Australian Infectious Diseases Research Centre, School of Chemistry and Molecular Biosciences, The University of Queensland, Brisbane, Australia

Summary

Five *E. coli* ST131 of diverse origin carrying *IncF* plasmids were chosen for a fitness study. Multi-drug resistance *IncF* plasmids harbouring *bla*_{CTX-M-15} gene were eliminated from cell in order to study the impact of the plasmid on host bacteria. Plasmid curing method based on the incompatibility with the targeted plasmid was used for this process. Fitness of the host was established by growth curve analysis in all isolates and competition assays were performed in part of the isolates. Preliminary results showed similar relative fitness of wild-type strains and their plasmid-free variants indicating low fitness cost of *IncF* plasmids.

Keywords: plasmid; *IncF*; curing; fitness; antibiotic resistance

Introduction

Thanks to genetic rearrangements (transposition, loss or gain of genes), otherwise commensal *Escherichia coli* can become a successful pathogen, such as extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC). ExPEC strains causing a wide range of infections represent a serious issue to public health [1,2]. In previous papers [3,4] it was shown that some sublineages of *E. coli* sequence type 131 (ST131) obtained from diverse sources including humans, animals and waste water contained specific plasmids from incompatibility group F (*IncF*). Plasmids contribute to the successful dissemination of the ExPEC strains thanks to many virulence and antibiotic resistance genes they carry. The selected *IncF* plasmids for our study have mosaic structure, they contain often more than one *IncF* plasmid replicon, furthermore encode toxins granting stability of the plasmids in the host and *bla*_{CTX-M} genes that allows extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) production [4]. The focus of this study is to better understand the impact of plasmids on the host fitness and on a worldwide spread of these clinically important strains.

Material and Methods

To study the bacterial fitness in context of plasmid influence on the host, five *E. coli* ST131 representatives of diverse origin including humans (n=3), waste water (n=1) and a dog (n=1) were chosen. Each isolate carried one *IncF* plasmid targeted for the elimination. The plasmids were of different size (100 – 160 kb) and each plasmid encoded an ESBL gene *bla*_{CTX-M-15} and two *IncF* plasmid replicons (*IncFIA*, *IncFII*), as shown in table 1. Plasmid-free cells were obtained using plasmid curing that allows elimination of the targeted plasmid thanks to its incompatibility with a plasmid construct carrying the same replicons. The curing vector pMDP5_pEC958 was used to eliminate the *IncF* plasmids from the wild-type strains following the protocol for plasmid curing [5]. Successfully cured strains were subjected to whole genome sequencing on MiSeq Illumina platform and obtained sequences were analyzed in order to find possible mutations in chromosomal DNA of the cured strains. Growth curve analysis was performed to determine fitness of the wild-type strains and their plasmid-free variants. The *IncF* plasmids were then reintroduced to the plasmid-free strains and growth curve analysis was

performed as a control. Additionally, wild-type strains were marked with pBGC plasmid encoding green fluorescent protein and competition assays were conducted between wild-type and plasmid-free strains and between wild-type and plasmid-free strains with reintroduced IncF plasmids. Flow cytometry is used for competition assays allowing relative fitness determination based on the percentage of marked and unmarked cells in the pool.

Table 1. *E. coli* ST131 carrying IncF plasmids included in this study.

Sample	Origin	PFGE cluster ¹	Plasmid size [kb]
M45	Human	16	100
Dog 168	Dog	16	130
OV24	Waste water	16	160
M24	Human	23	105
M70	Human	23	120

¹ Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) cluster determined in our previous study [4]

Results

Plasmid curing was successful in all strains and four plasmid-free clones of each strain were obtained. Preliminary results of growth curve analysis showed uneven growth among cured variants, making it impossible to predict the fitness of the strain. Sequence analysis was performed in at least 2 plasmid-free clones of each isolate. Zero to five single nucleotide polymorphisms were detected in plasmid-free clones compared to their wild-type variants. Plasmid-free clones with zero chromosomal mutations were targeted and the IncF plasmid was successfully reintroduced in four of the six isolates. Competition assays between wild-type strains and their plasmid-free variants were performed for two isolates out of six. Similar relative fitness of wild-type and plasmid-free variant of the human strain was shown (Figure 1). Relative fitness of the dog plasmid-free variants differed in comparison to wild-type. One plasmid-free variant showed much lower relative fitness compared to wild-type and second one showed similar relative fitness.

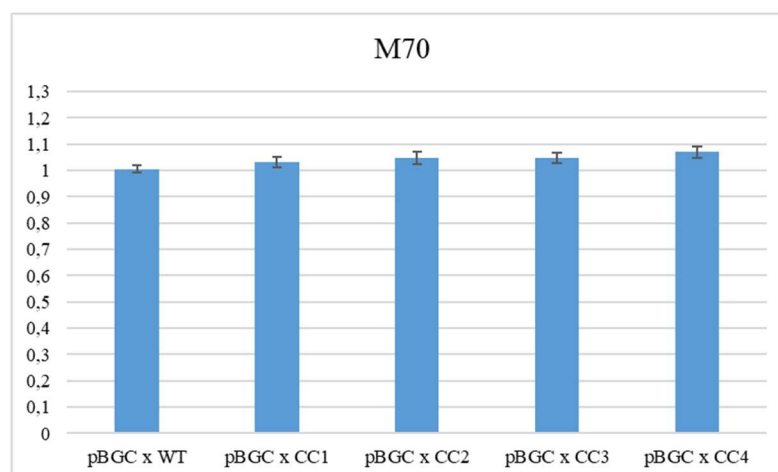


Figure 1. Fitness of the M70 plasmid-free variants compared to the marked wild-type. pBGC marked wild-type; WT unmarked wild-type; CC1 cured clone 1; CC2 cured clone 2; CC3 cured clone 3; CC4 cured clone 4.

Discussion

Previous studies [6,7] focusing on other incompatibility plasmid groups demonstrated that plasmid-host coevolution can lead to a reduced plasmid fitness cost or furthermore to an increased fitness of the host in the environment. Our fitness study demonstrating coevolution

of IncF plasmids and *E. coli* ST131 is one of its kind. Results of the two isolates obtained by competitions indicate that *E. coli* ST131 is adapted to maintain IncF plasmids with reduced fitness cost providing them with availability to grow in environment with no selection pressure with the same fitness as the plasmid-free variants or better. On the other hand, the results obtained by growth curves analysis of all isolates showed inconclusive outcomes for the plasmid-free clones of the isolates. However, as it was described before [8], growth curve analysis can only offer preliminary results and need to be confirmed by more discriminative competition assays.

Conclusions

Plasmid curing proved to be an effective way to eliminate plasmids from *E. coli* strains using a curing vector containing the same replicons as the target plasmids and antitoxins to the toxins encoded by the target plasmids. Results obtained by growth curves and confirmed by more accurate competition assays in our fitness study demonstrated similar relative fitness of wild-type strains and their plasmid-free variants, suggesting adaptation of the *E. coli* ST131 for harbouring IncF plasmids.

Acknowledgement

This study was supported by project 18-23532S from Czech Science Foundation and by Internal Grant Agency of University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno (215/2020/FVHE).

References

- [1] PLATELL, L. J., et al. Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods. *Vet Microbiol.* 2011;153(1-2):99-108.
- [2] KUDINHA, T., et al. *Escherichia coli* Sequence Type 131 as a Prominent Cause of Antibiotic Resistance among Urinary *Escherichia coli* Isolates from Reproductive-Age Women. *J Clin Microbiol.* 2013;51(10):3270-6.
- [3] KONDRATYEVA, K., et al. Meta-analysis of Pandemic *Escherichia coli* ST131 Plasmidome Proves Restricted Plasmid-clade Associations. *Sci Rep.* 2020;10(1):36.
- [4] JAMBOROVA, I. et al. Extensive Genetic Commonality among Wildlife, Wastewater, Community, and Nosocomial Isolates of *Escherichia coli* Sequence Type 131 (*H30R1* and *H30Rx* Subclones) That Carry *bla*_{CTX-M-27} or *bla*_{CTX-M-15}. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(10):e00519-18.
- [5] HALE, L., et al. An efficient stress-free strategy to displace stable bacterial plasmids. *Biotechniques.* 2010; 48(3): 223-8.
- [6] DIONISIO, F. et al. The evolution of a conjugative plasmid and its ability to increase bacterial fitness. *Biol Lett.* 2005;1(2):250-2.
- [7] NORBERG, P. et al. The IncP-1 plasmid backbone adapts to different host bacterial species and evolves through homologous recombination. *Nat Commun.* 2011;2:268.
- [8] DELAFUENTE, J., et al. Methods to Study Fitness and Compensatory Adaptation in Plasmid-Carrying Bacteria. *Methods Mol Biol.* 2020;2075:371-382.

Contact address: Jana Palkovičová, Mgr., Dpt. of Biology & Wildlife Diseases, FVHE UVPS Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H18375@vfu.cz

Plasmid-mediated colistin resistance among human clinical *Enterobacteriaceae* isolates: surveillance in the Czech Republic, 2017-2019

^{1,2}Zelendová Markéta, ⁴Jakubů Vladislav, ^{1,2}Jamborová Ivana, ⁴Pomorská Katarína, ²Medvecký Matej, ⁴Žemličková Helena, ^{1,2,3}Dolejšká Monika

¹CEITEC VFU, Veterinary and Pharmaceutical University Brno, Czech Republic

²Dpt. of Biology & Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

³Faculty of Medicine, Biomedical Center, Charles University, Plzen, Czech Republic

⁴NRL for ATB, The National Institute of Public Health, Centre for Epidemiology and Microbiology, Prague, Czech Republic

Summary

The prevalence of colistin resistance has increased rapidly among *Enterobacteriaceae*. National surveillance of plasmid-mediated colistin resistance started in the Czech Republic in 2017. The aim of this study was to determine the prevalence and characteristics of isolates with *mcr* genes from human clinical samples. In all strains, resistance to colistin was evaluated by determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) by the broth microdilution method. Of 704 strains analysed, twenty-five (3.6%) were positive for *mcr-1* and one (0.14%) for *mcr-4*. Four plasmid groups (*ColE10*, *IncX4*, *IncHI2*, *IncI2*) with *mcr-1* gene were identified and epidemic *mcr-1*-carrying *IncX4* plasmid predominated among our collection of clinical samples.

Keywords: antibiotic resistance; *Enterobacteriaceae*; *mcr-1*; plasmids

Introduction

The emergence of new genetic elements encoding antibiotic resistance in bacterial pathogens represent a threat to public health. Colistin is considered as a last resort antimicrobial agent against Gram-negative bacteria including *Enterobacteriaceae*. However, the occurrence and spread of colistin resistant bacteria has rapidly increased worldwide. Since the first discovery of *mcr-1* in November 2015 in China (Liu et al., 2016), ten variants of *mcr* genes have been reported (Wang et al., 2020). Plasmids carrying the *mcr-1* gene include several incompatibility groups such as *IncHI2*, *IncI2*, *IncFII*, *IncP* and *IncX4* (Doumith et al., 2016; Xavier et al., 2016). Most of these groups are well known to be involved in the spread of a diversity of antibiotic resistance genes in *Enterobacteriaceae* (Zurfluh et al. 2017). The aim of this study was to detect and characterize *mcr*-carrying isolates originating from human clinical samples from Czech Republic.

Material and Methods

During 2017-2019, a total of 704 colistin-resistant isolates (MIC>2mg/l) from human clinical materials were examined for the presence of *mcr-1* to *mcr-9* genes. Colistin resistant strains were screened for the presence of *mcr* genes using multiplex PCR and tested for susceptibility to 18 antimicrobials substances by broth microdilution method. All *mcr*-positive isolates were further subjected to whole genome sequencing (WGS) using MiSeq Illumina platform. Raw reads assembly was performed by SPAdes v3.12.0 to generate contigs that were used to identify antibiotic resistance genes, bacterial sequence types, and plasmid replicons using ResFinder, MLSTFinder and PlasmidFinder. Transferability of *mcr*-carrying plasmids was determined by conjugation experiments.

Results

From all examined isolates, twenty-six (3.7%) isolates with plasmid-mediated resistance were identified. Twenty-five isolates were positive for *mcr-1* (3.6%) while only one isolate with *mcr-*

4 (0.14%) was obtained; other *mcr* genes were not detected. Isolates carrying *mcr-1.1* or *mcr-1.2* were identified as *Escherichia coli* (n=22) and *Klebsiella pneumoniae* (n=3) while one *mcr-4.3* positive *Enterobacter cloacae* complex isolate was detected (Table 1; Table2). Most *mcr*-positive isolates showed resistance to aminopenicillins (n=25), quinolones (n=18) and trimethoprim-sulphamethoxazole (n=15). *E. coli* isolates belonged to various sequence types and showed diverse antibiotic resistance and plasmid content. The *mcr-1* gene was located predominantly on 33 kb IncX4 (n=18) with high level of nucleotide similarity (>99.9%) to each other as well as to plasmids available at GenBank database. The gene was also carried by 60 kb IncI2 (n=4) or large (>150 kb) multidrug-resistant IncHI2 (n=2) plasmids. Resistance to colistin was transferred to recipient *E. coli* laboratory strains via conjugation in the majority of the isolates (88%, n=26).

Discussion

Our study investigated sporadic cases of *mcr*-producing *Enterobacteriaceae* recovered from patients in the Czech Republic during 2017-2019. The high diversity of the *mcr-1*-positive *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates detected in our study corresponds with results of *mcr*-positive *Enterobacteriaceae* isolated from different sources (animals, food and humans) in other studies (El Garch et al. 2018; Xavier et al., 2016; Zurfluh et al. 2017). In the present study, *mcr-1* was located on IncX4 plasmids in majority of *mcr-1*-positive isolates. Previous evidence revealed that IncX4 plasmids play a significant role in the spread of the *mcr-1* gene among *Enterobacteriaceae* worldwide (Doumith et al. 2016). Horizontal transfer of plasmid-mediated *mcr* genes represents a possible risk factor for public health since colistin is considered as one of the last-resort antibiotics for the treatment of serious infections in human medicine.

Conclusion

Although this study demonstrated a low prevalence of *mcr*-positive isolates in patients in the Czech Republic, the occurrence of colistin-resistant bacteria should be considered as a possible risk for public health.

Table 1. Characterization of colistin-resistant isolates in 2017-2018.

Isolate	Organism	Origin	Year of sampling	<i>mcr</i> and its location
40331/17	<i>K. pneumoniae</i> ST54	urine	2017	<i>mcr-1.1</i> on IncX4
B0042913	<i>E. coli</i> ST448	rectal swab	2018	<i>mcr-1.1</i> on IncX4
B0042906	<i>E. coli</i> ST453	urine	2018	<i>mcr-1.1</i> on IncX4
43934	<i>E. coli</i> ST290	tonsil swab	2018	<i>mcr-1.1</i> on IncHI2
44158	<i>E. coli</i> ST156	wound swab	2018	<i>mcr-1.2</i> on IncX4
44653	<i>E. coli</i> ST1196	urine	2018	<i>mcr-1.1</i> on IncX4
45082	<i>E. coli</i> ST744	blood	2018	<i>mcr-1.1</i> on IncX4
46049	<i>K. pneumoniae</i> ST147	pus	2018	<i>mcr-1.1</i> on IncX4
46968	<i>E. coli</i> ST3941-like	urine	2018	<i>mcr-1.1</i> on IncX4

Table 2. Characterization of colistin-resistant isolates in 2019.

Isolate	Organism	Origin	Year of sampling	<i>mcr</i> and its location
48652	<i>E. coli</i> ST167	urine	2019	<i>mcr-1.1</i> on IncX4
48796	<i>K. pneumoniae</i> ST231	ulcer swab	2019	<i>mcr-1.1</i> on IncX4
48907	<i>E. coli</i> ST744	urine	2019	<i>mcr-1.1</i> on IncX4
48964	<i>E. coli</i> ST88	urine	2019	<i>mcr-1.1</i> on IncHI2
49016	<i>E. coli</i> ST539	urine	2019	<i>mcr-1.1</i> on IncX4
49687	<i>E. coli</i> ST538	urine	2019	<i>mcr-1.1</i> on IncI2
50279	<i>E. coli</i> ST2766	urine	2019	<i>mcr-1.1</i> on IncI2
50772	<i>E. coli</i> ST538	urine	2019	<i>mcr-1.1</i> on IncI2
50774	<i>E. coli</i> ST69	urine	2019	<i>mcr-1.1</i> on IncX4
51133	<i>E. coli</i> ST117	urine	2019	<i>mcr-1.1</i> on IncHI2
52110	<i>E. coli</i> ST453	urine	2019	<i>mcr-1.1</i> on IncX4
52230	<i>E. coli</i> ST1011	blood	2019	<i>mcr-1.1</i> on IncX4
52563	<i>E. coli</i> ST410	wound swab	2019	<i>mcr-1.1</i> on IncX4
52637	<i>E. coli</i> ST744	blood	2019	<i>mcr-1.1</i> on IncX4
52857	<i>E. coli</i> ST744	urine	2019	<i>mcr-1.1</i> on IncX4
53288	<i>E. coli</i> ST538	urine	2019	<i>mcr-1.1</i> on IncI2
49985	<i>E. cloacae</i> ST54	rectal swab	2019	<i>mcr-4.3</i> on ColE10

Acknowledgments

This project was funded by NV18-09-00605.

References

- DOUMITH, M.; GODBOLE, G.; ASHTON, P.; LARKIN, L.; DALLMAN, T.; DAY, M.; JOHNSON, A. P. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016, vol. 71, no. 8, s. 2300-2305.
- EL GARCH, F.; DE JONG, A.; BERTRAND, X.; HOCQUET, D.; SAUGET, M. *mcr-1*-like detection in commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. From food-producing animals at slaughter in Europe. *Veterinary Microbiology*. 2018, vol. 213, s. 42–46.
- LIU, Y. Y.; WANG, Y.; WALSH, T. R.; YI, L. X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; YU, L. F. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*. 2016, vol. 16, no. 2, s. 161-168.
- WANG, C.; FENG, Y.; LIU, L.; WEI, L.; KANG, M.; ZONG, Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerging Microbes & Infections*. 2020, vol. 9, no. 1, s. 508-516.
- XAVIER, B. B.; LAMMENS, C.; BUTAYE, P.; GOOSSENS, H.; MALHOTRA-KUMAR, S. Complete sequence of an IncFII plasmid harbouring the colistin resistance gene *mcr-1* isolated from Belgian pig farms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016, vol. 71, no. 8, s. 2342-2344.
- ZURFLUH, K.; NÜESCH-INDERBINEN, M.; KLUMPP, J.; POIREL, L.; NORDMANN, P.; STEPHAN, R. Key features of *mcr-1*-bearing plasmids from *Escherichia coli* isolated from humans and food. *Antimicrobial resistance and infection control*. 2017, vol. 6, no. 91.

Contact address: Markéta Zelendová, Mgr., Dpt. of Biology & Wildlife Diseases, FVHE UVPS Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H17324@vfu.cz

Enterobakterie a pseudomonády s rezistencí k antimikrobiálním látkám u pelikánů

Enterobacteria and pseudomonads resistant to antimicrobials in pelicans

^{1,2}Šišmová Petra, ^{1,2}Dolejská Monika, ³Diakou Anastasia, ^{1,2}Literák Ivan

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

²CEITEC, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Česká republika

³Laboratory of Parasitology and Parasitic Diseases, School of Veterinary Medicine, Faculty of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

Summary

Increasing antibiotic resistance has become an emerging issue in past decades. *Escherichia coli* and *Pseudomonas* spp. are among the most common causative agents of infections in humans and animals. Antibiotic resistant bacteria have been also reported in various wildlife species around the globe. The aim of this study was to isolate and characterize bacterial strains from cloacal swabs of wild water birds. Thirty-eight samples from pelican pulli (*Pelicanus crispus*, n=33; *Pelicanus onocrotalus*, n=5) originating from a nesting colony in Greece were analyzed. By using the MastDisc detection test the production of enzymes called extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) was analyzed. Two isolates of *E. coli* were positive for ESBL, in pseudomonads the test was not sufficiently conclusive. Subsequent susceptibility tests to other groups of antibiotics confirmed resistance to 7 antibiotics, suggesting the occurrence of multi-drug resistant strains. By the method of PCR typing, plasmid-mediated resistance genes to fluoroquinolones were tested. Based on the results, representative strains were subjected to whole-genome sequencing on the Illumina platform in order to detect sequence type (ST), antibiotic resistance genes and plasmid replicons. In the collection of *E. coli* isolates, plasmids from IncF group, resistance genes to aminoglycosides, sulfonamides and beta-lactams and sequence type ST1844 predominated. Hence, our results confirmed the presence of antibiotic resistant strains in pelicans, highlighting the role of wildlife animals in spreading of antibiotic resistant bacteria.

Keywords: *Escherichia coli*; *Pseudomonas* spp.; antimicrobial resistance; ESBL

Úvod

Rostoucí rezistence ke kriticky důležitým antibiotikům je v poslední době aktuální téma a to jak na poli humánní, tak i veterinární medicíny. Mezi významné původce infekcí řadíme bakterii *Escherichia coli* a zástupce rodu *Pseudomonas* (např. *Pseudomonas aeruginosa*). *E. coli* je součástí střevní mikroflóry lidí a zvířat, ale existují i patogenní kmeny, které mohou být příčinou jak lehčích onemocnění postihující např. močový trakt, tak i život ohrožujících systémových infekcí. Riziko onemocnění vyvolané pseudomonádami se zvyšuje při šíření do uzavřených prostor např. nemocnic. U imunosupresivních osob a pacientů upoutaných na lůžko mohou vyvolat tzv. nozokomiální infekce, které mohou být letální.

Jedním z klinicky nejvýznamnějších a velmi rozšířených mechanismů rezistence je produkce enzymů tzv. širokospektrých beta-laktamáz (ESBL), které narušují strukturu beta-laktamových antibiotik, a snižují tak jejich účinek. Geny kódující ESBL jsou obvykle lokalizovány na plazmidech, což jsou mobilní genetické elementy přítomné u bakterií. Tyto malé kruhové molekuly DNA se schopností replikace mohou být snadno přenášeny horizontální cestou mezi bakteriemi navzájem a tím přispívají ke zvýšení odolnosti mikroorganismů vůči antimikrobiálním látkám. Častý výskyt rezistence byl zaznamenán i u antibiotik ze skupiny fluorochinolonů. Přestože je řadíme mezi látky s širším spektrem účinku, jsou mnohdy předepisovány na léčbu běžných onemocnění. Geny odpovědné za tuto rezistenci mohou být lokalizované na plazmidu (plasmid-mediated quinolone resistance; geny PMQR), ale i součástí chromozomální DNA.

Aktuální studie ukázaly, že výskyt bakteriálních kmenů rezistentních vůči antibiotikům u volně žijících zvířat se v důsledku zvýšené kontaminace životního prostředí a kontaktu zvířat s lidmi stává důležitým problémem veřejného zdraví. Cílem této studie byla izolace a charakterizace bakteriálních kmenů ve vzorcích mláďat pelikánů (pelikán kadeřavý, pelikán bílý) z hnízdní kolonie v Řecku.

Materiál a metody

Selekce a kultivace bakteriálních izolátů

V roce 2019 byly z hnízdní kolonie odebrány vzorky kloakálních výtěrů od 38 mláďat pelikánů (33 vzorků z pelikánů kadeřavých *Pelicanus crispus*, 5 vzorků z pelikánů bílých *Pelicanus onocrotalus*). Odebrané vzorky byly pomnoženy v peptonové vodě a následně inokulovány na půdy MacConkey agaru s jednou z antimikrobiálních látek ve 3 po sobě jdoucích pasážích: ciprofloxacín (0,05 mg/l); cefotaxim (2 mg/l); meropenem (0,125 mg/l + roztok ZnSO₄ 100 mg/l) a kolistin (3,5 mg/l). Závěrečná pasáž byla očkována na misky s masopeptonovým agarem, ze kterých byly získané kolonie podrobeny druhové identifikaci použitím MALDI-TOF hmotnostního spektrometru (microflex LT/SH; Bruker). Pomocí teplotní lýze bakteriální kultury byla provedena izolace DNA.

Fenotypová a genotypová charakterizace bakterií

Za využití detekčního setu MastDisc (Mast Diagnostics, UK) byla u izolátů testována produkce beta-laktamázy dle pokynů výrobce. Zároveň byly provedeny testy citlivosti k dalším skupinám antibiotik (n=22) pomocí diskové difúzní metody (Oxoid, UK) a citlivost ke kolistinu metodou Colispot. Výsledky byly porovnány s průměry inhibičních zón dle standardů (EUCAST; CLSI 2015). Metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) byla otestována přítomnost genů rezistence k fluorochinolonům.

Celogenomové sekvenování a bioinformatická analýza dat

Na základě dosažených výsledků byly izoláty podrobeny celogenomovému sekvenování na platformě HiSeq Illumina. Na izolaci genomové DNA bakteriálních izolátů byla použita souprava NucleoSpin Tissue kit a příprava knihoven z izolované DNA proběhla s využitím kitu Nextera XT (Illumina). Po praktickém provedení sekvenace byla získaná sekvenční data za pomoci assembleru SPAdes převedena do formátu fasta obsahující pouze sekvenci jednotlivých čtení složených do delších úseků DNA. Z assemblovaných dat jsme určili zejména geny rezistence k antibiotikům, plazmidy a stanovili kombinaci alel pro určení sekvenčního typu s využitím bioinformatických nástrojů. Pro geny rezistence byla využita databáze ResFinder, pro stanovení plazmidů PlasmidFinder. Pro vyhodnocení genů antibiotické rezistence byla stanovena 100 % délka pokrytí a identita v rozmezí 95-100 % s referenční sekvencí. Sekvenční typ jednotlivých izolátů *E. coli* byl určen pomocí databáze Multilocus sequence typing (MLST 2.0).

Výsledky

Selektivní kultivací na půdách s antibiotiky bylo z kloakálních výtěrů 38 mláďat pelikánů získáno 26 izolátů *E. coli* a 10 izolátů pseudomonád. Produkce ESBL byla detekována u 2 izolátů *E. coli*, u pseudomonád nebyl test dostatečně průkazný. Testováním citlivosti k dalším skupinám antibiotik byla u 23 % izolátů *E. coli* (n=6) zjištěna rezistence k více než 7 antibiotikům (ampicilin, streptomycin, sulfonamidy, tetracyklin, trimetoprim-sulfametoxazol, chloramfenikol a kyselina nalidixová), zbylé izoláty *E. coli* byly rezistentní pouze ke kyselině nalidixové. V případě pseudomonád vykazovaly všechny izoláty rezistenci k 8 antibiotikům (ampicilin, streptomycin, trimetoprim-sulfametoxazol, chloramfenikol, cefazolin, kyselina nalidixová, amoxicilin-klavulanová kyselina a nitrofurantoin) a u 80 % izolátů byla zjištěna rezistence k azithromycinu. Všech 36 získaných izolátů bylo citlivých na karbapenemy

(ertapenem, meropenem, imipenem), monobaktamy (aztreonam) a fosfomycin. Testování genů rezistence k chinolonům metodou PCR prokázalo pozitivitu na *qnrS* u 3 izolátů *E. coli*, u pseudomonád bylo 40 % izolátů pozitivní na gen *aac(6)-Ib-cr*. Celogenomovým sekvenováním byla zjištěna chromozomální mutace *gyrA p.S83L* podmiňující rezistenci k chinolonům u 81 % izolátů *E. coli*, přičemž 3 izoláty vykazovaly současně další typy mutací a to *gyrA p.D87G*, *gyrA p.D87N* a *parC p.S80I*. U izolátů *E. coli* byla potvrzena přítomnost IncF plazmidu v 96 % případů. Nejčastěji zastoupené byly varianty IncFIB, IncFIC a IncFII. Další často detekovanou skupinou byly col-plazmidy prokázané u 14 (54 %) izolátů, přičemž převládal typ Col(MG828). V rámci určení sekvenčního typu *E. coli* byla zaznamenána malá variabilita, nejvíce izolátů náleželo k ST1844 (n=11). Byly prokázány geny rezistence k antimikrobiálním látkám ze skupiny aminoglykosidů, sulfonamidů a beta-laktamů.

Diskuze a závěr

Studii jsme prokázali přítomnost bakteriálních kmenů rezistentních na antibiotika u volně žijících pelikánů. Nejčastěji zastoupený sekvenční typ *E. coli* ST1844 byl již dříve detekován v izolátech chovné drůbeže a klinickém materiálu od pacienta, což ukazuje, že nalezený ST1844 není omezen na volně žijící ptáky. Z výsledků vyplývá, že složení mikroflóry volně žijících zvířat může být ovlivněno, přestože neabsolvovala žádnou antibiotickou léčbu. Jedním z důvodů mohou být i zbytkové koncentrace antimikrobiálních látek, které se v rámci koloběhu dostávají do životního prostředí. Adaptaci mikroorganismů odráží i fakt výskytu multirezistentních kmenů bakterií, které byly ve střevě pelikánů detekovány. Migrující druhy pak zvyšují riziko šíření rezistentních bakterií napříč dalšími ekosystémy.

Nejen racionální preskripce antibiotik v případě potřeby, ale i získávání informací v oblasti antibiotické rezistence u lidí, zvířat a v prostředí jsou nedílnou součástí k nalezení způsobů, které pomohou omezit šíření rezistentních bakterií.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem NV18-09-00605 (AZV).

Literatura

DOBIÁŠOVÁ H. at el., Extended spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among *Escherichia coli* isolates from zoo animals, Czech Republic, 2013. *FEMS Microbiology Ecology*. DOI:10.1111/1574-6941.12149

LIEW, SM. at el., Antimicrobial susceptibility and virulence genes of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, 2019. *The Journal of Life and Environmental Sciences*. DOI:10.7717/peerj.6217

NASSER, M. et al., Prevalence of the β -lactamase and Antibiotic Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Arab Region. 2020, *Journal of Global Antimicrobial*. DOI:10.1016/j.jgar.2020.01.011

RÖDEROVA, M. at el. Characteristics of Quinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Humans, Animals, and the Environment in the Czech Republic. 2017, *Frontiers in Microbiology*. DOI:10.3389/fmicb.2016.02147

Kontaktní adresa: Petra Šišmová, PharmDr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H18377@vfu.cz

First report of colistin resistance gene *mcr-1* from wildlife in Russia

^{1,2}Tarabai Hassan, ^{1,2}Valcek Adam, ^{1,2}Jamborova Ivana, ³Vazhov Sergey V., ⁴Karyakin Igor V., ⁵Raab Rainer, ^{1,2}Literak Ivan, ^{1,2}Dolejska Monika

¹Dpt. of Biology & Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

³Shukshin Altai State University for Humanities and Pedagogy, Biysk, Russia

⁴LLC Sibecocenter, Novosibirsk, Russia

⁵Technisches Büro für Biologie, Deutsch-Wagram, Austria

Summary

The aim of this study was to isolate and characterize Enterobacterales isolates with reduced susceptibility to colistin from Red and Black Kites (*Milvus milvus* and *Milvus migrans*, respectively) and to assess their potential risk as vectors and reservoirs of colistin resistance genes. Isolates (6%, n=168) that showed reduced susceptibility to colistin (3.5mg/L) were identified using MALDI-TOF MS and tested for mobile colistin resistance genes (*mcr-1-mcr-8*) by PCR. One *mcr-1*-positive *E. coli* isolate carried *mcr-1* gene and was resistant to colistin (MIC > 4 mg/L) and susceptible to 18 antibiotics by broth dilution and disk diffusion methods, respectively. WGS using MiSeq (Illumina) revealed the *mcr-1*-positive *E. coli* sample belonged to ST2280. The *mcr-1* gene was located on conjugative IncI2 plasmid pDR164 (59891 bp, GenBank number MK542639). In this study we present the first report of *mcr-1* positive *E. coli* isolate from wildlife in Russia.

Keywords: *Escherichia coli*; colistin; kite; wildlife; plasmid; landfill; DNA sequencing

Introduction

Colistin is considered a last resort antibiotic that is used for treatment of severe infections caused by MDR bacteria (WHO, 2016). The use of colistin in food-producing animals is globally limited or banned with some exceptions where it is being used as a growth promoter in combination with animal feed in some countries (OIE, 2018). The gene *mcr-1* conferring resistance to colistin has been reported globally in clinical, environmental and wildlife samples (Jian Sun, 2018). However, the majority of reports come from inpatients and domestic animals (Wang et al., 2017). Only few reports observed mobile colistin resistance in wildlife (Wu et al., 2018). Migratory birds can act as sentinels, reservoirs and spreaders of antibiotic resistance including colistin (Migura-Garcia et al., 2019). The spread of mobile colistin resistance is worrisome as it may lead to treatment failure in patients with severe infections.

Methods

Cloacal samples (n=168) were collected from Kites in Euroasia (Austria n=6, Belgium n=12, Czech Republic n=93, Germany n=41 and Russia n=16), enriched in peptone buffer (Ovoid, England) and cultivated on SuperPolymyxin medium for selection of colistin resistant isolates. Species identification on selected isolates was performed using MALDI TOF mass spectrometry. Enterobacterales isolates with reduced susceptibility to colistin were tested for *mcr-1* to *mcr-8* genes by multiplex PCR (Tarabai et al., 2019) and presence of *mcr* gene was verified by Sanger sequencing. As a result, a single *mcr-1* positive *E. coli* isolate (DR164) was detected and subjected for further typing. PCR-based replicon typing (Carattoli et al., 2005) was performed to identify the content of plasmid replicon. DR164 underwent antibiotic susceptibility testing to a set of 18 different antibiotics in addition to colistin using disk diffusion and broth microdilution methods, respectively (EUCAST, 2019). Conjugation assay based on filter mating was carried to determine the conjugative property of *mcr-1*-carrying plasmid. Whole genome sequencing (WGS) was performed using MiSeq (Illumina) platform to analyse the genetic content of DR164 isolate and investigate plasmid with *mcr-1* gene.

Results

Overall, 10 (6%, n=168) Enterobacteriales isolates showed reduced susceptibility to colistin (*E. coli* n=9 and *Klebsiella pneumonia* n=1). From those selected isolates, one *E. coli* isolate was positive for *mcr-1* gene (DR164) and originated from a Black Kite sample at Semenovod, Russia. DR164 isolate was susceptible to all tested antibiotics apart from colistin (MIC > 4 mg/L). WGS analysis revealed DR164 belonged to sequence type 2280. Sequencing and plasmid transfer experiments revealed the location of *mcr-1* gene on a conjugative IncI2 plasmid (pDR164). Plasmid pDR164 showed similarity to IncI2 plasmids found in *E. coli* isolates from swine, poultry, human and sewage in USA, Vietnam, Argentina and China, respectively. Comparison of pDR164 with other plasmids (Figure 1) revealed high similarity in the backbone, including regions for stability, replication, maintenance and horizontal gene transfer. An additional similarity between compared plasmids was the variable region carrying *mcr* gene. All plasmids contained *mcr-1* gene with the absence of other antibiotic resistance genes.

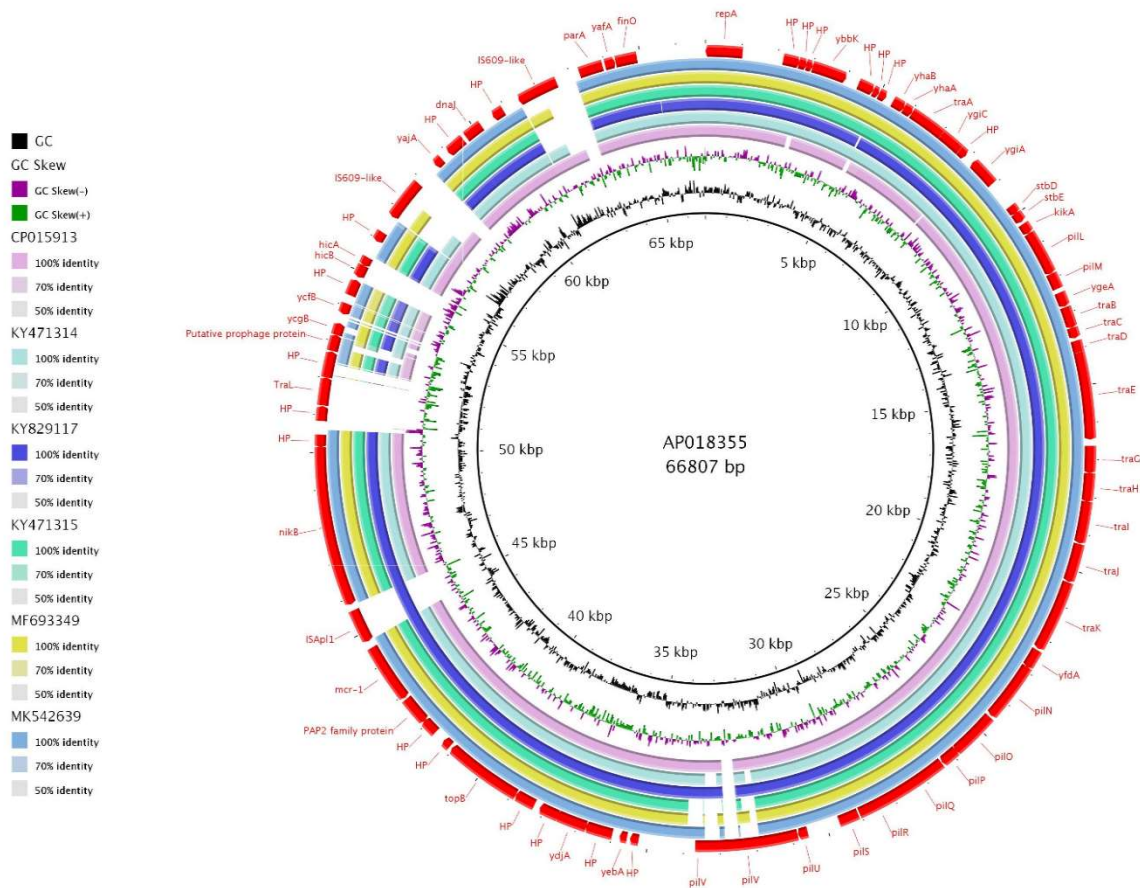


Figure 1. BRIG comparison of *mcr-1* positive IncI2 plasmid pDR164 (GenBank accession no.: MK542639) with similar plasmid sequences retrieved from GenBank. Plasmids used for comparison include pMCR-M19736 (KY471314), pMCR-M19855 (KY471315) and pG3216 (MF693349) originated from human clinical samples in Argentina, pSLy1 (CP015913) from a swine sample in USA, pVE362 (AP018355) from poultry in Vietnam and pMCR_WCHEC1604-IncI2 (KY829117) from sewage in China (Tarabai et al., 2019).

Discussion and Conclusion

We report the first *mcr-1* gene in *E. coli* from wildlife in Russia on a typical IncI2 plasmid and the first complete sequence of *mcr-1*-harbouring IncI2 plasmid from wildlife. Based on previous reports of *mcr-1* gene in wildlife and our findings, it appears that *mcr-1* gene may have established a reservoir in wildlife. Considering the global spread of *mcr-1* gene, migratory birds such as black kites may represent a vehicle for dissemination of clinically-important antimicrobial resistance bacteria and genes.

Acknowledgment

The project was supported by Czech Health Research Council (grant number NV18-09-00605) and the National Sustainability Programs II (NPU II; grant LQ1601) and partially financed by Internal Grant Agency of University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno (204/2018/FVHE) to M.D.

References

- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L., and Threlfall, E.J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 63(3), 219-228. doi: 10.1016/j.mimet.2005.03.018.
- EUCAST. 2019. eucast.org Available: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf [Accessed 1 1].
- Jian Sun, H.Z., Ya-Hong Liu, Youjun Feng (2018). Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. *Trends Microbiol.* 29(9), 794-808.
- OIE (2018). "OIE Annual report on antimicrobial agents intended for use in animals". (Paris: World organisation of ANimal Health (OIE)).
- Tarabai, H., Valcek, A., Jamborova, I., Vazhov, S.V., Karyakin, I.V., Raab, R., et al. (2019). Plasmid-Mediated *mcr-1* Colistin Resistance in *Escherichia coli* from a Black Kite in Russia. *Antimicrob Agents Chemother* 63(9). doi: 10.1128/AAC.01266-19.
- Wang, X., Liu, Y., Qi, X., Wang, R., Jin, L., Zhao, M., et al. (2017). Molecular epidemiology of colistin-resistant Enterobacteriaceae in inpatient and avian isolates from China: high prevalence of *mcr*-negative *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents* 50(4), 536-541. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.05.009.
- WHO (2016). "Critically important Antibiotics for Human Medicine ". (Geneva: WHO).
- Migura-Garcia, L., Gonzalez-Lopez, J.J., Martinez-Urtaza, J., Aguirre Sanchez, J.R., Moreno-Mingorance, A., Perez de Rozas, A., et al. (2019). *mcr*-Colistin Resistance Genes Mobilized by IncX4, IncHI2, and IncI2 Plasmids in *Escherichia coli* of Pigs and White Stork in Spain. *Front Microbiol* 10, 3072. doi: 10.3389/fmicb.2019.03072.
- Wu, J., Huang, Y., Rao, D., Zhang, Y., and Yang, K. (2018). Evidence for Environmental Dissemination of Antibiotic Resistance Mediated by Wild Birds. *Front Microbiol* 9, 745. doi: 10.3389/fmicb.2018.00745.

Contact address: Hassan Tarabai, M.Sc., Dpt. of Biology & Wildlife Diseases, FVHE UVPS Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, hassantarabai@gmail.com

Vplyv sezónnych zmien na mikrobiálnu asociáciu ovzdušia v chove hovädzieho dobytku

Effect of seasonal changes on microbial air association in cattle farm

Mindžáková Ingrid, Gregová Gabriela, Szabóová Tatiana, Venglovský Ján

Ústav hygieny zvierat a životného prostredia, Katedra životného prostredia, veterinárskej legislatívy a ekonomiky, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Slovenská republika

Summary

Livestock production has tendency to emitt large amounts of airborne microorganisms, which are suspected to pose a risk of airborne infection to farm workers, humans in vicinity and to animals on other farms. According to the present results, season variability is determinant of microbial communities indoor and outdoor of cattle farm, where the microorganisms can survival in distance more then 100 meters from farm, downwind. To reduce the biological risk, it's necessary to know the behavior of microorganisms during seasonal changes on the farm and its surroundings, to implement the necessary protective measures.

Keywords: bioaerosol; airborne microorganisms; cattle farm; seasonal changes

Úvod

Intenzifikáciou živočíšnej výroby dochádza k emitácií mikroorganizmov a alergénov rastlinného a živočíšneho pôvodu do ovzdušia následkom čoho vzniká riziko ohrozenia zdravia pracovníkov farmy, ľudí a zvierat žijúcich v okolí. Na prežívanie mikroorganizmov v bioaerosóle a jeho šírenie vplyvajú fyzikálne vlastnosti ovzdušia, ktoré sa počas ročných období kontinuálne menia. K redukcii vzniku biologického rizika je potrebné poznať správanie sa mikroorganizmov počas týchto zmien na farme aj v jej okolí a na základe toho zaviesť potrebné ochranné opatrenia.

Materiál a metodika

Výskum sa vykonával na farme so 620-timi kusmi hovädzieho dobytku. Chov sa sústreďuje na odchov kráv určených na mliečnu produkciu. Odber vzoriek sa vykonával v maštali s 278-mimi dojnicami so zavedeným voľným systémom ustajnenia s ležiskovými boxami s podstielkou. Fyzikálne parametre ovzdušia: teplota, vlhkosť a rýchlosť prúdenia vzduchu boli merané anemometrom Testo 417 a termohygrometer Testo 608-H1. Meranie prebiehalo počas odberu vzoriek v chove (v strede maštale, v jej rohoch) a v okolí farmy (20 m a 100 m po vetre), v čase 10:00 – 12:00 hod. Vzorky bioaerosólu sa odoberali aeroskopom MAS-100 Eco. Z jedného odberového miesta sa odobralo viac vzoriek vzdušných mikroorganizmov vo výške 1,5 m nad zemou. Po expozícii kultivačných médií prúdom vzduchu sa nechali dané médiá inkubovať nasledovne: pre mezofilné baktérie - živný agar - 24 hod./37 °C, koliformné baktérie - Endo agar - 24 hod./37 °C a kvasinky a mikromycéty - Sabouraudov agar -72 hod./25 °C. Po odčítaní sa počty mikroorganizmov upravili pomocou korekčných tabuliek a prepočítali na \log_{10} KTJ/m³ a na KTJ/m³ vzduchu. K štatistickým analýzám (aritmetický priemer, štandardná odchýlka, signifikantný rozdiel a Pearsonov korelačný koeficient) sa využíval softvér GraphPad Prism 8.

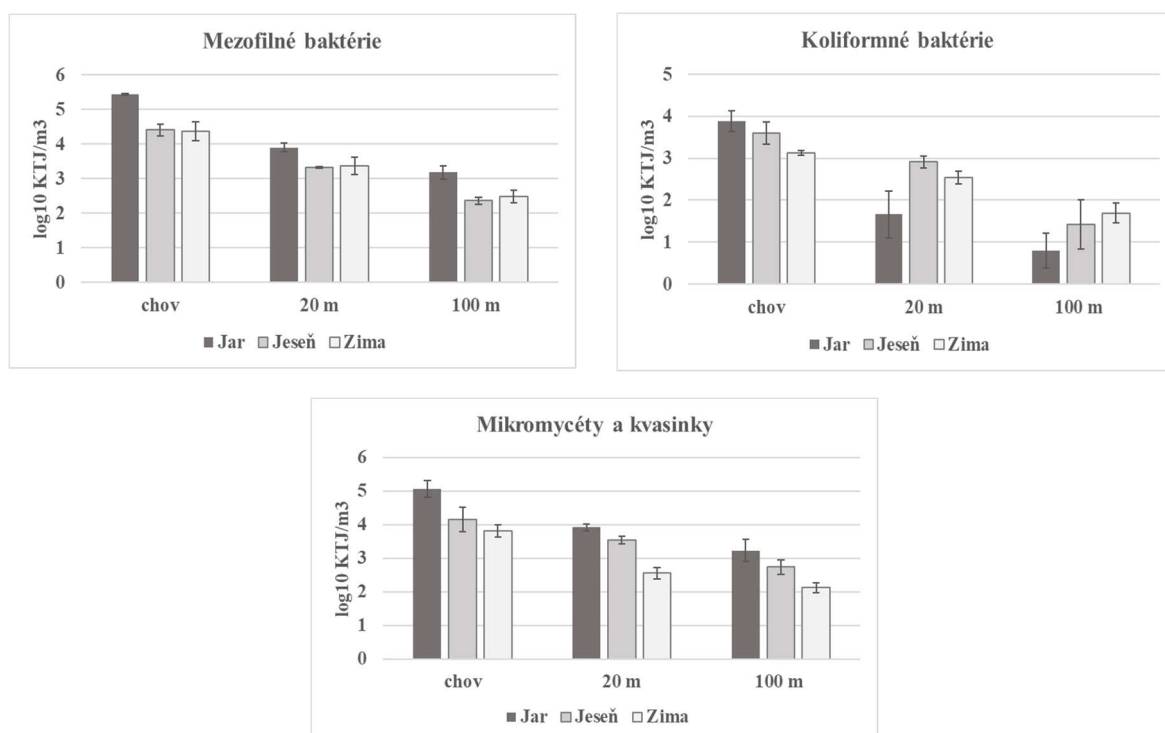
Výsledky

Fyzikálne parametre ovzdušia sú uvedené v tabuľke 1. Najvyššie hodnoty teplôt sa zaznamenali v maštaľnom prostredí. Hodnoty relatívnej vlhkosti boli počas jesene ovplyvnené daždivým obdobím.

Tabuľka 1. Priemer ± štandardná odchýlka fyzikálnych parametrov ovzdušia počas rôznych ročných období.

	Jar			Jeseň			Zima		
	T (°C)	RV (%)	v (m/s)	T (°C)	RV (%)	v (m/s)	T (°C)	RV (%)	v (m/s)
chov	18,66 ± 0,74	57,94 ± 1,82	0,53 ± 0,88	12,84 ± 0,24	94,86 ± 0,94	0,27 ± 0,63	6,84 ± 0,34	70,04 ± 0,98	0,15 ± 0,68
20 metrov	18,76 ± 0,32	41,96 ± 1,55	0,92 ± 1,25	11,10 ± 0,32	97,56 ± 0,38	0,45 ± 1,03	6,16 ± 0,20	60,96 ± 0,99	1,06 ± 0,32
100 metrov	15,33 ± 0,12	41,46 ± 1,30	1,20 ± 1,10	10,70 ± 0,29	96,96 ± 0,57	0,52 ± 0,27	6,13 ± 0,28	61,03 ± 1,53	0,98 ± 0,92

Priemery koncentrácií mikroorganizmov sú uvedené na obrázku 1. V priebehu troch ročných období sa zaznamenal pokles mezofilných baktérií v chove dobytky približne o jeden rad, avšak so zvyšujúcou vzdialenosťou od farmy ich koncentrácia poklesla priemerne o tri rady.



Obrázok 1. Priemerná koncentrácia ± štandardná odchýlka vyšetovaných koncentrácií mikroorganizmov v ovzduší počas rôznych ročných období

Výraznejší pokles koliformných mikroorganizmov, približne o tri rady sa zaznamenal počas jari. V porovnaní s chladnejšími ročnými obdobiami sa ich vplyv na prežívanie koliformných baktérií sa prejavil ich miernejším poklesom, len o dva rady. Pokles vykazovali aj koncentrácie vzdušných kvasiniek a plesní, ktoré so zvyšujúcou sa vzdialenosťou od farmy znižovali svoje počty o dva rady. Ich najvyššie koncentrácie v chove ako aj v okolí farmy sa zaznamenali na jar. Štatistická analýza vykazuje signifikantný význam poklesu koncentrácie mikroorganizmov so zvyšujúcou sa vzdialenosťou od zdroja na úrovni $P < 0,0001$. Korelačnú závislosť vykazovali mikroorganizmy k teplote ovzdušia ($r = 0,9524$) na jar vo vzdialenosti 100 metrov od farmy. Rovnaký korelačný vzťah k teplote vykazovali aj počty kvasiniek a plesní ($r = 0,8982$) pričom v chove bola korelácia ($r = 0,9393$) počas zimy tiež zaznamenaná. Analýza korelácie ostatných parametrov nebola signifikantná.

Diskusia:

Výsledky laboratorných analýz ovzdušia potvrdzujú pokles počtov mikroorganizmov súvisiacich s postupnou zmenou ročných období. Najvyššie koncentrácie aeróbných mikroorganizmov boli namerané v chove zvierat v rozmedzí hodnôt $2,8 \times 10^5$ - $1,3 \times 10^3$ KTJ/m³. Výsledky korešponujú s údajmi publikovanými Clauß (2020), ktorý vo svojej práci uvádza, že priemerný počet mezofilných baktérií v chove dojníc je 5×10^4 KTJ/m³. Nižšie počty koliformných baktérií súvisia s ich zvýšenou citlivosťou na environmentálne podmienky, čo sa odzrkadľuje na ich koncentrácií nameranej v okolí farmy. Počty kvasiniek a plesní v chove dosahovali rádovo hodnoty 10^5 KTJ/m³, ktoré o dva rady preyšujú výsledky Radha and Jyorji (2015). Priemerné počty aeróbných mikroorganizmov v chove vo vzorkách bioaerosólu sa nachádzajú v rozmedzí, ktoré vo svojej práci uvádzajú Silvana et al. (2010). Pokles mikroorganizmov so vzrastajúcou sa vzdialenosťou od farmy bol v hodnotách $1,6 \times 10^3$ - $1,3 \times 10^1$ KTJ/m³. Podobné zníženie uvádzajú aj Dungan et al. (2010), ktorí zaznamenali 200 m od farmy s 10 000-mi kusmi dojníc pokles o jednu radu vo vzorkách odoberaných proti vetre a pokles o dva rady po vetre. Mikroorganizmy aj v nízkych koncentráciách vytvárajú riziko ohrozenia zdravia, následkom čoho je potrebné dodržiavať ochranné opatrenia (ochranné pomôcky pre zamestnancov, filtre vo ventilácií).

Záver:

Z výsledkov vyplýva, že teplé ročné obdobia vplývajú na asociáciu mikroorganizmov pozitívne, pričom sa ich koncentrácia so zvyšujúcou sa vzdialenosťou od zdroja redukuje. Napriek tomu vzdušné mikroorganizmy stále predstavujú potenciálny zdroj kontaminácie životného prostredia. Tento výskum tvorí základ pre ďalšie štúdiá zamerané na vytýčenie a analýzu rizika ohrozenia zdravia pracovníkov farmy ako aj ľudí žijúcich v okolí farmy.

PodĎakovanie

Príspevok vznikol za podpory projektu VEGA MŠVVaŠ SR a SAV č. 2/0125/17.

Literatúra

Clauß, M. Emission of bioaerosols from livestock facilities - Methods and results from available bioaerosol investigations in and around agricultural livestock farming. *Thünen Working Paper 138a*. Braunschweig: Johann Heinrich von Thünen Institute of Agricultural Technology, 2020. 123 s. URL: <https://literatur.thuenen.de/digbib_extern/dn061898.pdf> [cit. 2020-04-21]

Radha, K.; Jyorji, T.J. Evaluation of air quality in a dairy cattle barn. *Indian Journal of Dairy Science*. 2015, vol. 68, no. 3, s. 274-277

Popescu S.; Borda C.; Hegedus I. C.; Spinu M.; Razvan S.; Diugan A. E. The air quality in Transylvanian dairy barn with tie stall. *ProEnvironment*. 2010, vol. 3, no. 6, s. 395-399

Dungan R. S. Board-invited review: fate and transport of bioaerosols associated with livestock operations and manures. *Jurnal of Anim Science*. 2010, vol. 88, no. 11, s. 3693-3706

Kontaktná adresa: Ingrid Mindžáková, MVDr., Ústav hygieny zvierat a ochrany životného prostredia, Katedra životného prostredia, veterinárskej legislatívy a ekonomiky, UVLF Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika, Ingrid.Mindzakova@student.uvlf.sk

Sérologická prevalence protilátek proti patogenu *Borrelia burgdorferi sensu lato* u koní v České republice

Antibodies to *Borrelia burgdorferi sensu lato* in horses from the Czech Republic

¹Kašpárková Nikola, ¹Bártová Eva, ²Šamonilová Eva, ³Žáková Alena

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

²Klinika chorob koní, Fakulta veterinární medicíny, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Česká republika

³Oddělení fyziologie a imunologie živočichů, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika

Summary

Lyme disease, caused by some strains of bacterial spirochetes *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Bbsl), is affecting not only humans but also domestic animals. In Europe, *B. afzelii*, *B. garinii* and *B. burgdorferi sensu stricto* are the primary pathogens in horses. The aim of the study was to detect anti-*Borrelia* IgM and IgG antibodies in horses from the Czech Republic and to compare the incidence in two groups of horses and between regions. In total, sera of 262 horses (247 clinically healthy horses and 15 horses hospitalized due to symptoms of encephalitis/meningoencephalitis) were examined by indirect sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. The total prevalence was 26 %, with 27% in clinically healthy horses (IgM in 21% and IgG in 7% and both IgM and IgG in 3% of horses) and with 20% in horses with clinical signs (IgM in 20% and IgG in 7% and both immunoglobulin groups in 7% of horses). The highest positivity was in the Zlín region (50%), Karlovy Vary region (42%) and Pardubice region (40%). Lyme disease should be taken into account in the differential diagnosis of a wide range of non-specific clinical symptoms, and appropriate diagnostic methods should be used to prove it.

Keywords: *Borreliosis; Equines; ELISA; Lyme diseases*

Úvod

Bakterie *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.) jsou hlavními etiologickými původci klíšťaty přenášené lymeské boreliózy v Evropě (Stanek et al., 2012). U koní toto onemocnění obvykle probíhá asymptomaticky, ale z některých studií jsou známy i výskyty koní s klinickými příznaky, kterými jsou např. meningitida, kraniální neuritida, radikuloneuritida, sporadické kulhání, laminitidy, oteklé klouby, citlivost svalů a úbytky hmotnosti (Browning et al., 1993; James et al., 2010). Od roku 1980 se hustota klíšťat jako vektorů této infekce zvýšila a rozšířily se po Evropě i do oblastí s vyšší nadmořskou výškou i šířkou. Lze tedy předpokládat, že změna klimatu v Evropě usnadňuje šíření infekce a zvýšený výskyt nemocí v dalších oblastech (Lindgren a Jaenson, 2006). Naproti tomu v některých oblastech, kde nejsou klimatické podmínky vhodné pro přežití klíšťat (velké horko a sucho), lymeská borelióza mizí. Protilátky proti *B. burgdorferi* s.l. byly v Evropě zjištěny např. u 48% koní ze Slovenska (Štefančíková et al., 2000) a u 26% koní z Polska (Štefančíková et al., 2008). V České republice nejsou k dispozici žádné údaje o séroprevalenci *B. burgdorferi* s.l. u koní. Koně se v naší zemi používají zejména pro sport, chov a rekreaci, a často tedy přicházejí do styku s vektory výše uvedené infekce, takže mohou být vystaveni riziku infekce. Proto bylo cílem této studie zjistit séroprevalenci *B. burgdorferi* s.l. u koní z různých lokalit České republiky.

Materiál a metody

Celkem bylo k sérologickému vyšetření použito 262 vzorků krve odebraných od koní (z *vena jugularis*) v letech 2008-2014. Tyto vzorky byly následně rozděleny do dvou skupin: první

skupina se skládala z 247 klinicky zdravých koní pocházejících z 11 krajů České republiky; druhá skupina zahrnovala séra 15 koní hospitalizovaných na klinice koní na VFU Brno, kteří vykazovali klinické příznaky boreliózy. K jednotlivým koním byly k dispozici údaje o pohlaví, věku, plemeni a kraji ze kterých pocházeli. Vzorky byly vyšetřeny modifikovanou enzymovou analýzou (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA, TestLine, Praha, ČR), která se běžně používá pro diagnostiku Lymfské boreliózy v humánní medicíně. Pozitivní kontrola byla získána od firmy Bioveta a.s. Séra koní negativních na antigen *Bbsl*, byla použita jako negativní kontrola. V případě IgM, byly vzorky s absorbcí $A \geq 0,54$ označeny za pozitivní, v případě IgG, byly za pozitivní označeny vzorky s absorbcí $A \geq 0,79$. Vzorky byly označeny za pozitivní, v případě že u nich byly detekovány jednotlivé typy protilátek IgM a IgG nebo obojí zároveň.

Výsledky a diskuze

Protilátky proti *B. burgdorferi* s.l. byly detekovány u 27% klinicky zdravých koní (1. skupina). V Evropě byla podobná prevalence zjištěna u koní z Dánska, Polska a Itálie, kde byla zjištěna séroprevalence 29% (Hansen et al., 2010), 26% (Štefančíková et al., 2008) a 24% (Ebani et al., 2012). Burbelo et al. (2011) zjistil mnohem vyšší prevalenci 75% u koní v USA. U koní z České republiky byly zjištěny rozdíly v prevalenci dle pohlaví (samci 10% samice 27% a kastrování samci 28%). Naproti tomu, Kiss et al. (2011) zjistili u koní z Rumunska vyšší prevalenci u samců (14%) oproti samicím (9%). Štefančíková et al. (2008) nezjistili rozdíly v prevalenci dle pohlaví. Vyšetření koně byli rozděleni do dvou věkových skupin. Vyšší prevalence byla zjištěna u koní ve věku 1-10 let (36%) oproti druhé skupině koní starších 10 let (22%). Tento výsledek je v rozporu s výsledky jiných studií, kde byla zjištěna vyšší prevalence u starších koní ve srovnání s mladšími (Štefančíková et al., 2000; Egenvall et al., 2001; Štefančíková et al., 2008; Hansen et al., 2010; Ebani et al., 2012). Zvířata se během života setkávají s klíšťaty infikovanými boreliemi stále častěji, je tedy pravděpodobné, že starší zvířata bývají častěji infikována a bývá u nich zjišťována vyšší prevalence (Egenvall et al., 2001). Rozdíl v prevalenci *B. burgdorferi* s.l. byl zjištěn i v rámci různých krajů (15-50%). Počet vzorků v jednotlivých krajích byl však malý a často byly zastoupeny vzorky pouze z jedné či dvou farem v jednom kraji. Prevalence dle různých lokalit se významně nelišila ani u koní ze Slovenska (Štefančíková et al., 2000), Švédska (Egenvall et al., 2001) a Itálie (Ebani et al., 2012). Demografické rozdíly v prevalenci *B. burgdorferi* s.l. lze s velkou pravděpodobností vysvětlit různými stupni výskytu klíšťat v určitých krajích (Egenvall et al., 2001).

V případě druhé skupiny koní s klinickými příznaky encefalitidy/meningoencefalitidy byla zjištěna nižší prevalence (20%) než u koní bez příznaků. Tito koně vykazovali zejména artropatie spojené s poruchami pohybu, což bývá popisováno ve spojitosti s boreliózou (Steele et al., 1987). Imai et al. (2011) popsali také neurologické příznaky odpovídající nervové formě lymfské choroby. Skutečnost, že pouze 3 koně ($n = 15$) byli séropozitivní, je v souladu s jinými studiemi, kdy zvířata s klinicky se vyskytujícím onemocněním často nevykazovala pozitivní výsledky při sérologickém vyšetření (Imai et al., 2011; Priest et al., 2012).

Závěr

Česká republika patří k oblastem s vysokým výskytem infikovaných klíšťat, je proto vhodné tuto skutečnost zohlednit při provádění diferenciálních diagnostik u pacientů s nespecifickými příznaky. Je také nezbytné, aby chovatelé věnovali zvýšenou pozornost klinickým příznakům u svých zvířat a včas vyhledali veterinární pomoc, aby mohla proběhnout odpovídající diagnostika a případná následná terapie.

Literatura

BROWNING, A.; CARTER, S.D.; BARNES, A.; MAY, C.; BENNETT, D. Lameness associated with *Borrelia burgdorferi* infection in the horse. *Veterinary Record*. 1993, vol. 132, s. 610–611.

BURBELO, P.D.; BREN, K.E.; CHING, K.H.; COLEMAN, A.; YANG, X.; KARIU, T.; IADAROLA, M.J.; PAL, U. Antibody profiling of *Borrelia burgdorferi* infection in horses. *Clinical and Vaccine Immunology* 2011, vol. 18, s. 1562–1567.

EBANI, V.V.; BERTELLONI, F.; PINZAUTI, P.; CERRI, D. Seroprevalence of *Leptospira* spp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Italian horses. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2012, vol. 19, s. 237–340.

EGENVALL, A.; FRANZÉN, P.; GUNNARSSON, A.; ENGVALL, E.O.; VÅGSHOLM, I.; WIKSTRÖM, U.B.; ARTURSSON, K. Cross-sectional study of the seroprevalence to *Borrelia burgdorferi* sensu lato and granulocytic *Ehrlichia* spp. and demographic, clinical and tick-exposure factors in Swedish horses. *Preventive Veterinary Medicine*. 2001, vol. 49, s. 191–208.

HANSEN, M.G.; CHRISTOFFERSEN, M.; THUESEN, L.R.; PETERSEN, M.R.; BOJESEN, A.M. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in Danish horses. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2010, vol. 52, s. 3.

IMAI, D.M.; BARR, B.C.; BERTONE, J.J.; FENG, S.; HODZIC, E.; JOHNSTON, J.M.; OLSEN, K.J.; BARTHOLD, S.W. Lyme Neuroborreliosis in 2 horses. *Veterinary Pathology*. 2011, vol. 48, s. 1151.

JAMES, F.M.; ENGILES, J.B.; BEECH, J. Meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuritis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2010, vol. 237, s. 1180–1185.

KISS, T.; CADAR, D.; KRUPACI, A.F.; BORDEANU, A.; BRUDASCA, G.F.; MIHALCA, A.D.; MIRCEAN, V.; GLICA, L.; DUMITRACHE, M.O.; SPINU, M. Serological reactivity to *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs and horses from distinct areas in Romania. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2011, vol. 11, s. 1259–1262.

LINDGREN, E.; JAENSON, T.G.T. Lyme borreliosis in Europe: influences of climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. *World Health Organization*. 2006, vol. 22, s. 1–35.

PRIEST, H.L.; IRBY, N.L.; SCHLAFFER, D.H.; DIVERS, T.J.; WAGNER, B.; GLASER, A.L.; CHANG, Y.F.; SMITH, M.C. Diagnosis of *Borrelia*-associated uveitis in two horses. *Veterinary Ophthalmology*. 2012, vol. 15, s. 398–405.

STANEK, G.; WORMSER, G.P.; GRAY, J.; STRLE, F. Lyme borreliosis. *Lancet* 2012, vol. 379, s. 461–473.

STEERE, A.C.; SCHOEN, R.T.; TAYLOR, E. The clinical evolution of Lyme arthritis. *Annals of Internal Medicine*. 1987, vol. 107, s. 725–731.

ŠTEFANČÍKOVÁ, A.; ADASZEK, Ł.; PEŤKO, B.; WINIARCZYK, S.; DUDIŇÁK, V. Serological evidence of *Borrelia Burgdorferi* sensu lato in horses and cattle from Poland and diagnostic problems of Lyme borreliosis. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2008, vol. 15, s. 37–43.

ŠTEFANČÍKOVÁ, A.; DERDÁKOVÁ, M.; ŠKARDOVÁ, I.; SZESTÁKOVÁ, E.; CISLÁKOVÁ, L.; KOVÁČOVÁ, D.; STANKO, M.; PETKO, B. Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in horses of east Slovakia. *Veterinární Medicina*. 2000, vol. 45, s. 227–231.

Kontaktní adresa: Nikola Kašpárková, Mgr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H18374@vfu.cz

Distribuce infekční mykotické dermatitidy u hadů způsobené *Ophidiomyces ophiodiicola*

Distribution of snake fungal disease caused by *Ophidiomyces ophiodiicola*

Příbyl Michal, Baláž Vojtech

Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Česká republika

Summary

This study confirms the occurrence of snake fungal disease in wild snakes in the Brno Reservoir area. The causative agent is the ascomycete *Ophidiomyces ophiodiicola*. The research was conducted on the most common species in the area, the dice snake (*Natrix tessellata*). Sampling began in April 2019. Altogether 67 smear samples were examined, 19 individuals showed clinical signs and 14 samples were confirmed positive by *O. ophiodiicola* specific qPCR. This study is intended to help protect wild snakes. This study was funded by the IGA VFU Brno.

Keywords: Snake Fungal Disease; *Ophidiomyces ophiodiicola*; *Natrix tessellata*; Brno Reservoir

Úvod

V posledních dekádách dochází v globálním rozsahu k nárůstu případů plísňových onemocnění postihujících populace volně žijících zvířat. V případě plazů se do popředí dostala mykóza volně žijících hadů označovaná „snake fungal disease“ (SFD).

Původcem SFD je askomyceta *Ophidiomyces ophiodiicola*. Onemocnění se projevuje mnoha symptomy od drobných deformací ventrálních štítků až po závažné destrukce kůže, kosterní svaloviny a může vést k úhynu postižených jedinců (Lorch et al., 2015).

SFD byla původně známá z hadů chovaných v zajetí ze Severní Ameriky, Austrálie a Evropy. *O. ophiodiicola* napadá široké hostitelské spektrum. Je potvrzena u čeledí Boidae, Pythonidae, Acrochordidae, Colubridae, Elapidae a Viperidae. Ve volné přírodě byla SFD poprvé popsána v roce 2006 v severovýchodní části USA. Způsobila zde výrazný pokles populace chřestýše lesního (*Crotalus horridus*) a v roce 2008 chřestýška malého (*Sistrurus catenatus*). Toto onemocnění je jedním z hlavních problémů ochrany volně žijících hadů v Severní Americe (Allender et al., 2011).

V letech 2010-2016 byl proveden průzkum výskytu SFD ve Velké Británii, kdy byl původce prokázán v 25 případech. Do studie byl zahrnut jeden suspektní vzorek z užovky podplamaté (*Natrix tessellata*) potvrzující přítomnost *O. ophiodiicola* v České republice (Franklinos et al., 2017). Druhým případem v kontinentální Evropě byl záchyt z užovky obojkové (*Natrix natrix*) v jižním Švýcarsku v roce 2018 (Meier et al., 2018).

Individuální a populační dopady SFD v Evropě zůstávají neobjasněny, stejně tak původ nákazy.

Na území České republiky se vyskytuje 5 druhů hadů 2 čeledí a většina z nich je podle vyhlášky MŽP č. 395/1992 Sb. hodnocena jako kriticky ohrožený druh. *O. ophiodiicola* je aktuálně zařazována do programů OIE. Dále je uvedena v Doporučení Bernské úmluvy č. 197/2017 pojednávajícím o prevenci šíření chorob obojživelníků a plazů. Z výše uvedeného jasně vyplývá nutnost získání nových poznatků a dat k rozšíření studia dané problematiky a napomoci tak řešení celosvětového problému úbytku populací volně žijících živočichů.

Hlavním druhem ze sledovaných hadů je užovka podplamatá (*N. tessellata*), hojně rozšířená na vodní nádrži Brno. Aktivita těchto užovek je na území České republiky pozorována od jarních měsíců, počátku dubna, do konce října v závislosti na teplotě prostředí (Moravec et al., 2015).

Materiál a metody

Sběr vzorků započal 12.4.2019 při výskytu prvních samců opouštějících zimoviště. Jedinci jsou ručně odchytáváni při procházení břehu Brněnské přehrady. Při manipulaci s každým jedincem používáme nové jednorázové rukavice pro zamezení šíření patogenu v populaci. Prohlédnutím celého povrchu hada hledáme abnormality na kůži (porušení, léze, poranění). Zvýšenou pozornost věnujeme ventrální části těla, okolí kloaky a přechodu hlavy v tělo. Nápadné léze vyfotografujeme pro pozdější posouzení. Vyšetřované jedince určíme do druhů, provedeme změření délky těla, zvážení tělesné hmotnosti a fotodokumentaci. Stírání kůže pomocí tamponů je jednoduchá a neinvazivní metoda. Při detekci specifických lézí (šedohnědé až oranžové krusty a deformace šupin) provedeme stěr pouze z těchto míst, který je pro vyšetření dostačující. V případě odchytu suspektně zdravého jedince provádíme stěry z náhodných míst, zejména ventrální plochy, případně výtěry krypt transversálně uložených ventrálních šupin. Sterilní stěrový tampon navlhčíme v deionizované vodě. Stěr provádíme ve směru od hlavy k ocasu a je opakován 5x, přičemž pokaždé pootočíme tampon pro využití celého jeho povrchu. Po provedeném stěru vložíme tampon do zkumavky se silikagelem. Unikátně označené vzorky skladujeme při -20 °C do vyšetření. Detekce přítomnosti *O. ophioidiicola* ve vzorcích je prováděna pomocí publikované molekulárně-genetické metody qPCR, které předchází izolace DNA pomocí běžného izolačního kitu (Bohuski et al., 2015). Po vyjmutí stěrového tamponu ze zkumavky oddělíme pomocí skalpelové čepelky polovinu buničité části. Po vložení do 2ml zkumavky opatřené o-kroužkem obsahující 100 mg keramických kuliček a 125 µl Prepman Ultra Sample Preparation Reagent provedeme cyklus několika homogenizací, centrifugací a ohřevu. Následně odebíráme supernatant a uchováváme při -80 °C. Pro qPCR používáme Roche Probes Mastermix, jehož směs je 5,75 µl H₂O, 0,5 µl ITS Primer-F, 0,5 µl ITS Primer-R, 0,25 µl SFD Probe, 0,5 µl BSA a 5 µl 10x zředěné DNA. Jako pozitivní kontrola a kvantifikační standard slouží gBlock fragment DNA (Bohuski et al., 2015). Samotná reakce a analýza probíhá v přístroji LightCycler480. Za pozitivní výsledek jsou považovány pouze vzorky s typickým sigmoidním růstem fluorescence.

Výsledky

Během sezóny v roce 2019 jsme získali vzorky z 67 jedinců užovky podplamaté (*N. tessellata*). Mezi jedinci převažovalo samčí pohlaví o délce jedinců v rozmezí 170-720 mm. Samičí pohlaví bylo zastoupeno v menší míře s délkou jedinců v rozmezí 530-940 mm. Počet 19 jedinců vykazovalo specifické kožní léze. 14 jedinců bylo pozitivně testováno na přítomnost *O. ophioidiicola*. Všichni nakažení jedinci vykazovali typické kožní léze. Další druhy vyskytující se na lokalitách vodní nádrže Brno – užovka obojková (*N. natrix*) a užovka hladká (*Coronella austriaca*) byly zaznamenány v řádech kusů jedinců. Všechny byly testovány na přítomnost patogenu s negativním výsledkem.

Diskuze

Výskyt askomycety *O. ophioidiicola* na testovaných jedincích potvrzuje záznam patogenu na užovce podplamaté (*N. tessellata*) na vodní nádrži Brno z roku 2016 (Franklinos et al., 2017). Poukazuje také na výskyt patogenu nejen na území Velké Británie, ale i v kontinentální Evropě ve větší míře, než byl záchyt 2 ojedinělých publikovaných nálezů. Všichni pozitivně testovaní jedinci spadají do rodu *Natrix*, z čehož vyplývá možná náchylnost rodu k tomuto onemocnění (Meier et al., 2018). Oba zástupci tohoto rodu mají podobné biologické vlastnosti, kdy zejména skupinové využívání břehů vodních ploch a společných hibernakul pravděpodobně přispívá k rozvoji onemocnění v populacích. Četnost lézí na pozorovaných jedincích se zvyšovala s jarní a podzimní aktivitou v souvislosti s hibernací hadů. Počet pozitivních samců výrazně převyšuje počet nakažených samic, což také podporuje domněnku přenosu patogenu zejména společným využíváním stejných prostor. Pozorované léze byly menšího rozsahu a nezpůsobovaly destrukce podobné záznamům v Severní Americe. Předpokládáme, že patogen postihující hady v České republice nemá fatální dopady na jejich populace.

Závěr

Závěrem je třeba podotknout, že již nyní můžeme potvrdit výskyt patogenu v populaci hadů na vodní nádrži Brno ve větším měřítku, než bylo doposud publikováno. Otázkou zůstává, do jaké míry je věnována pozornost zdravotnímu stavu volně žijících plazů. Z počátku naší laboratorní práce jsme se potýkali s problémy s detekcí patogenu ve vzorcích DNA. Za pomoci zahraničních kolegů, jejich

zaběhlých metod a vysoce odborného přístupu Mgr. Vojtecha Baláže, Ph.D., můžeme dnes bezpečně testovat další vzorky s jistými výsledky. S aktuální podporou Interní grantové agentury VFU Brno máme potřebné prostředky pro testování velkého počtu vzorků a posouváme tím náš výzkum na mnohem vyšší úroveň. Aktuální problematika plísňových chorob, zejména obojživelníků a netopýřů, je na velmi vysoké vědecké úrovni. Naší snahou je ve spolupráci zejména s Agenturou ochrany přírody a krajiny a Národním muzeem v Praze pozvednout význam našeho výzkumu a přispět tak k ochraně volně žijících hadů na území České republiky.

Poděkování

Studie je finančně podporována Interní grantovou agenturou VFU Brno, tímto bych jí rád vyslovil svůj dík. Dále bych rád poděkoval celému Ústavu ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel za teoretickou i praktickou výpomoc, především pak mému školiteli Mgr. Vojtechu Balážovi, Ph.D.. V neposlední řadě patří mé poděkování studentce Markétě Hábové, spoluřešitelce projektu IGA.

Literatura

ALLENDER, M.C. *et al.* *Chrysosporium* sp. infection in eastern massasauga rattlesnakes. *Emerg. Infect. Dis.* 2011, **17**, s. 2383–2384.

LORCH, J. M. *et al.* Experimental infection of snakes with *Ophidiomyces ophiodiicola* causes pathological changes that typify snake fungal disease. *MBio*. 2015, **6**, s. 1–9.

FRANKLINOS, L. H. V. *et al.* Emerging fungal pathogen *Ophidiomyces ophiodiicola* in wild European snakes. *Scientific Reports*. 2017, **7**, s. 1–7.

MEIER, G. *et al.* First case of Snake Fungal Disease affecting a free-ranging *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758) in Ticino Canton, Switzerland. *Herpetology Notes*. 2018, **11**, s. 885-891.

ALLAIN, S. *et al.* Emerging infectious disease threats to European Herpetofauna. *Herpetological Journal*. 2019, **29**, s. 189-206.

BOHUSKI, E. *et al.* TaqMan real-time polymerase chain reaction for detection of *Ophidiomyces ophiodiicola*, the fungus associated with snake fungal disease. *BMC Veterinary Research*. 2015, 11(1).

MORAVEC, J. *et al.* *Fauna ČR*. 1. Praha: Academia, 2015, s. 384.

Kontaktní adresa: Michal Příbyl, MVDr., Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H18003@vfu.cz

Forgotten parasites? *Hepatozoon* spp. from Iranian reptiles

¹Zechmeisterová Kristína, ^{1,2}Široký Pavel

¹Dpt. of Biology & Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

²CEITEC – Central European Institute of Technology,
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

Summary

Hundreds of hemogregarine species are known but just a fraction of them is molecularly characterised. Until the molecular characterisation is complete, many of these parasites are ignored. Besides, morphological similarity within the hemogregarine group undermine the reliability of morphology-based taxonomic positions of individual species. In this preliminary study, we are exploring possibilities of identification of blood parasites with already existing species.

Keywords: Iran; Haemoparasites, *Hepatozoon*; Reptiles

Introduction

Reptiles are the most abundant group of the tetrapods infected by hemogregarines of the genus *Hepatozoon*. As members of the phylum Apicomplexa, *Hepatozoon* species are obligate intracellular parasites. In their complex life cycle, specific life-stages invade the internal organs and the erythrocytes of their vertebrate host. In the erythrocytes of the reptiles, trophozoites and gametocytes take their place. To close the parasite life cycle, a hematophagous invertebrate is needed for evolving of infectious oocysts and transmission to the new vertebrate host (Smith, 1996; Telford, 2009).

During the last century, plenty of hemogregarine species were described based often on the poor morphology of intraerythrocytic stages. Later, with the tools of molecular biology, many reevaluations, redescriptions, and generic allocations within hemogregarines have been done. The genetic features important for the complex diagnosis are still missing for the vast majority of hemogregarines. In present work, a complex approach is applied to characterise hemogregarines in two reptiles from Iran, the snake *Zamenis longissimus* and the lizard *Pseudopus apodus*. On the base of our findings, initial differential diagnosis is suggested.

Material and Methods

Free-living reptiles were captured during June 2016 in the Northern Iran: three individuals of the snake *Z. longissimus* and one individual of the lizard *P. apodus*. Blood collection was performed from the ventral tail vein. Air-dried blood smears were fixed with absolute methanol and stained with Giemsa stain. Blood smears were microscopically examined for parasite morphometry and morphology. Parasitaemia intensity was estimated as the percentage of infected erythrocytes found in approximately 10^4 erythrocytes. From ethanol-preserved blood samples, genomic DNA was extracted using a commercial kit. Parasites DNA was detected by primers EF/ER targeting a 1500 bp long fragment of the nuclear 18S rRNA gene (Kvičeroová *et al.*, 2008). Obtained sequences were phylogenetically analysed (Mr Bayes, PhyML).

Results

Microscopically, intraerythrocytic gamonts were observed in 2/3 *Z. longissimus* and 1/1 *P. apodus* with parasitaemia 1.1, 1.4 and 0.03 % respectively. Gamonts found in the blood of *Z. longissimus* (Fig. 1A) had an elongate shape and were folded in the capsule. Gamonts nuclei were indistinct. Infected erythrocytes showed a zone of dehaemoglobinisation and hypertrophy of the cytoplasm. The gamonts were positioned tightly parallel to the nuclei and measured 13.2

× 3.8 μm on average. In the blood smear of *P. apodus*, broadly elongate gamonts enclosed in the thin capsule were observed (Fig. 1C). Gamonts nuclei were well-demarcated and positioned centrally. Two cytoplasmic inclusions with diameter 1 μm were regularly seen next to the gamont nucleus. No effect on the host cell was observed. Gamonts measured 13.2 × 4 μm on average.

Sequence and phylogenetic analyses based on 18S rDNA fragment revealed that present isolates are unique members of the genus *Hepatozoon* (Fig. 2).

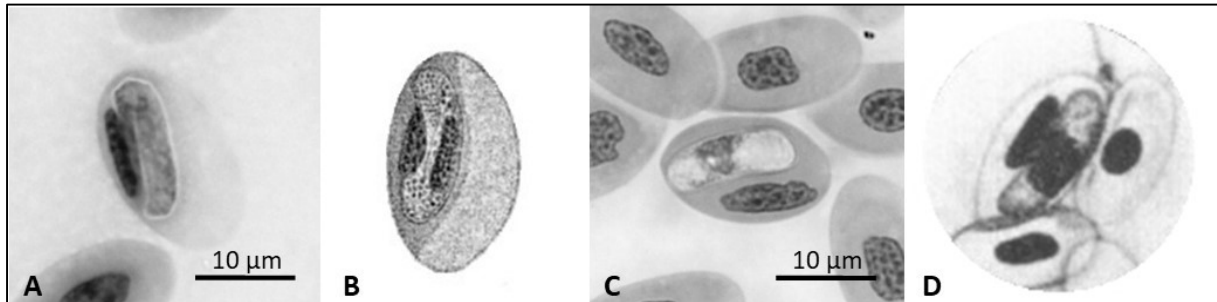


Figure 1. Intraerythrocytic stages (gamonts) of *Hepatozoon* spp. A Gamont of *Hepatozoon* sp. found in the blood of *Z. longissimus* by present study. B *Hepatozoon colubri* in the blood of *Zamenis longissimus*, a drawing adapted from Börner (1901), scalebar was not provided. C Gamont of *Hepatozoon* sp. found in the blood *P. apodus* by present study. D *Hepatozoon ophisauri* in the blood of *Pseudopus apodus* observed by Finkelstein (1908), scalebar was not provided.

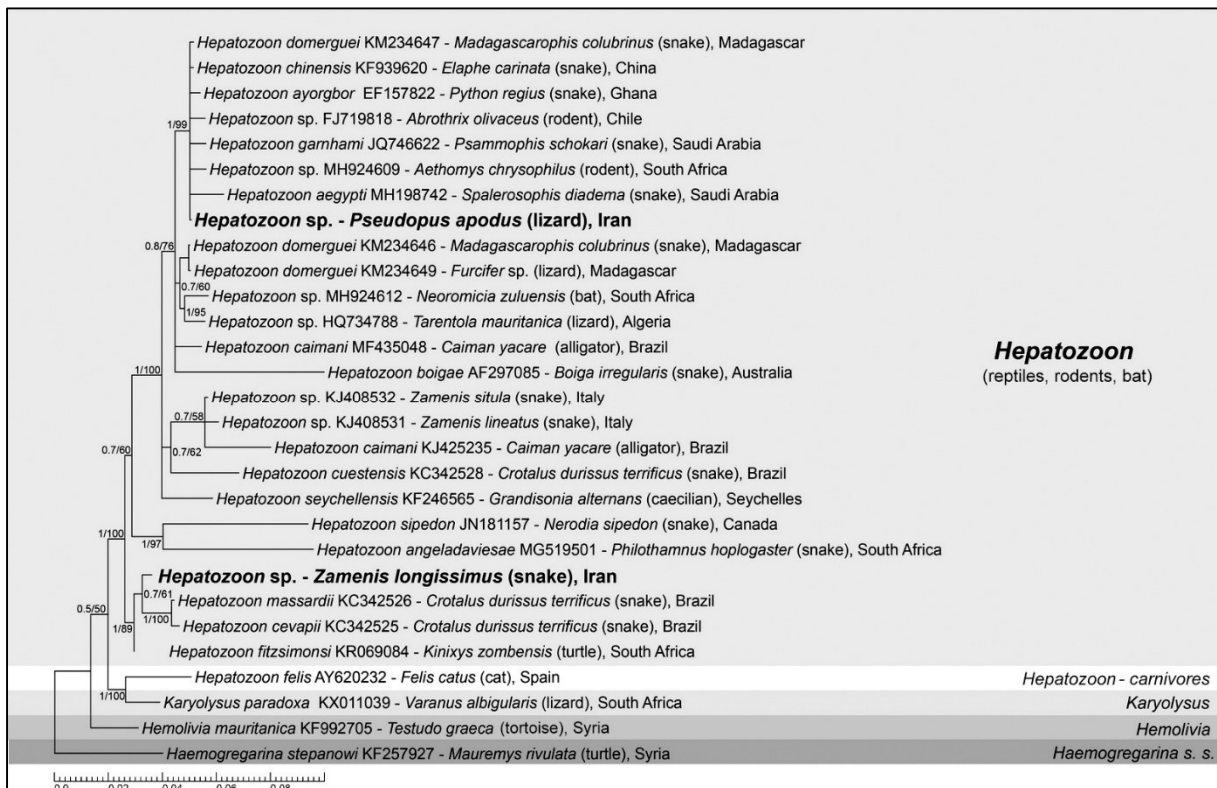


Figure 2. Phylogenetic tree of hemogregarines showing our two unique isolates (marked in bold) as related to the known *Hepatozoon* species.

Discussion

From the Middle East, only two *Hepatozoon* species are characterised morphologically and genetically: *Hepatozoon aegypti* Bashtar, Boulos and Mehlhorn, 1984 and *Hepatozoon garnhami* (Saoud, Ramdan, Mohammed and Fawzi, 1996) from Egypt, both genetically and morphologically different from present isolates. By thorough literature review of decades to century-old records, plenty of hidden hemogregarine species of reptiles from the Middle East have been uncovered. For now, more than 40 species descriptions have been considered as relevant for differential diagnosis. After a morphological comparison and considering geographical and biological traits of the parasites and their vertebrate hosts, two *Hepatozoon* species appear to be sharing the most of particular features with the present findings. *Hepatozoon* sp. found in the blood of *Z. longissimus* is suspected to be *Hepatozoon colubri* (Börner, 1901) (Fig. 1B) and *Hepatozoon* sp. found in the blood of *Pseudopus apodus* is suspected to be *Hepatozoon ophisauri* (Tartakovskii, 1913) (Fig. 1D) (Börner, 1901; Finkelstein, 1908; Tartakovskii, 1913). Further thorough study is needed for confirmation of these preliminary results.

Conclusions

Generally, it is not appropriate to determine *Hepatozoon* species based on morphology due to their similarity. In this case, both observed parasite species seem to be morphologically specific, i.e. dehaemoglobinisation zone and tight connection with the host cell nucleus or cytoplasmatic inclusions. These features (or their combination) are very rare or were not found in relevant hemogregarine species, what facilitates the species identification process.

Many of hemogregarines are, as it were, forgotten, noted in old but valuable papers only. *Hepatozoon colubri* and *H. ophisauri* are two species firstly described more than a century ago. Now, they are candidates for upcoming taxonomic reevaluation, after which they could reliably complement biodiversity and the phylogenetic mosaic of the genus *Hepatozoon*.

References

- BÖRNER, C. Untersuchungen über Hämosporidien. Ein Beitrag zur Kenntniss des Genus *Haemogregarina* Danilewsky. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*. 1901, vol. 69, s. 398–416.
- FINKELSTEIN, N. J. Parasites endoglobulaires du sang chez les animaux à sang froid du Caucase. *Archives des Sciences Biologique*. 1908, vol. 13, s. 132–164.
- KVIČEROVÁ, J.; PAKANDL, M.; HYPŠA, V. Phylogenetic relationships among *Eimeria* spp. (Apicomplexa, Eimeriidae) infecting rabbits: evolutionary significance of biological and morphological features. *Parasitology*. 2008, vol. 135, s. 443–452.
- TARTAKOVSKII, Mikhail Gavrilovich. Gemogregariny. In *Obyasnenia k exponatam laboratorii na Vserossiyskoy Gigienicheskoy vystavke v g. S. Petersburg. Seljskohozyaystvenno-Bakteriologicheskoy Laboratorii, Otdelenie protozoologii*. S. Petersburg: Glavnoe upravlenie zemleustrojstva i zemledelija, Departament' Zemledelija, 1913. s. 63–67.
- TELFORD, Sam. *Hemoparasites of the Reptilia: Color Atlas and Text*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2009. 394 s. ISBN 978-1-4200-8040-7.
- SMITH, T. G. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *Journal of Parasitology*. 1996, vol. 82, s. 565–585.

Corresponding author: Kristína Zechmeisterová, MVDr., Dpt. of Biology & Wildlife Diseases, FVHE UVPS Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H17325@vfu.cz

Is more dangerous to go to the zoo or to parks in Brno? Detection of infectious agents of selected zoonotic diseases.

¹Pittermannová Pavlína, ¹Kašpárková Nikola, ²Černíková Lenka, ³Žáková Alena,
¹Bártová Eva

¹Dpt. of Biology & Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

²Department of virology and serology, State Veterinary Institute Prague, Czech Republic

³Department of Comparative Animal Physiology and General Zoology, Faculty of Science,
Masaryk University Brno, Czech Republic

Summary

Wildlife animals and ticks play an important role in maintaining and spreading zoonoses in nature but also in captive animals. The aim of this study was to find out and compare prevalence of *Rickettsia* sp. and *Anaplasma phagocytophilum* in ticks in ZOO Brno and in surrounding area during years 2014-2018. In total, 166 and 390 ticks were collected in ZOO Brno and in surrounding area (parks in Bystrc and Pisárky), respectively. Pathogens were detected by PCR. In ZOO Brno, *Rickettsia* sp. was detected in four (5.7%) samples and *A. phagocytophilum* in one (1.4%) sample. In surrounding area, *Rickettsia* sp. was detected in 23 (20%) samples and *A. phagocytophilum* in four (3.5%) samples. In addition, *B. burgdorferi* s.l. was detected in 11 (15.7%) samples from ZOO Brno. The results of our study show that there is the higher risk of transmission of zoonotic infections in surrounding areas compared to the ZOO Brno.

Keywords: *Rickettsia* sp.; *Anaplasma phagocytophilum*; *Borrelia burgdorferi* s.l.; ticks; zoo; prevalence; PCR; Real-time PCR

Introduction

Ticks play an important role in maintaining and spreading of zoonoses in nature but also in captive animals. They are reservoirs of infection and vectors of diseases called „vector-borne disease“, caused e.g. by *Rickettsia* sp., *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* s.l. These bacterial infections can cause health problems to the animals and humans. *Rickettsia helvetica* is widespread in the Czech Republic. In case of infection, there are non-specific clinical signs like rash, meningitis, and inflammation of the heart muscle. *Anaplasma phagocytophilum* causes granulocyte ehrlichiosis. *Borrelia burgdorferi* s.l. is the cause of the disease called Lyme disease, which is the most common tick-borne infection in the Czech Republic. According to a report by the State Institute of Public Health, the incidence of this disease increased by 61% in 2016 compared to the previous year. There is information about prevalence of selected zoonotic diseases in ticks, however data on prevalence in zoo animals and area of zoo are missing. It can be supposed that there will be much higher risk of vector-borne infection due to the higher species spectrum, higher concentration of animals and direct contact between animals and humans.

The aim of our study was to find out and compare prevalence of *Rickettsia* sp. and *A. phagocytophilum* in ticks at ZOO Brno and in areas around zoo during years 2014-2018. In addition, detection of *B. burgdorferi* s.l. in ticks was performed at ZOO Brno.

Material and Methods

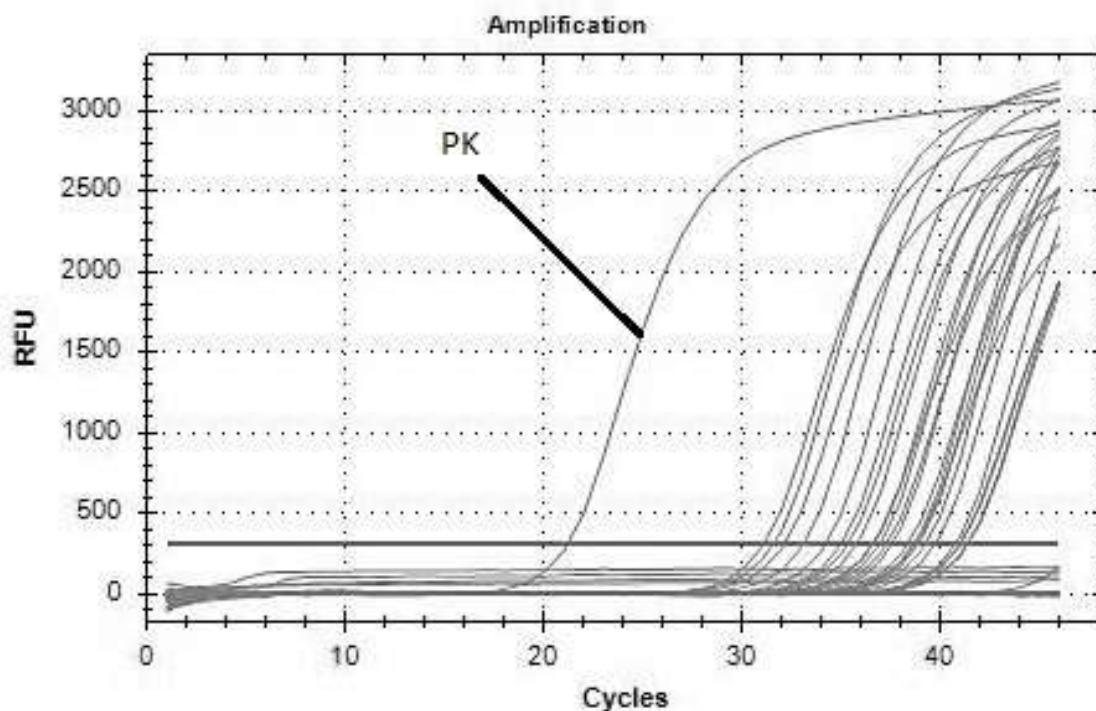
During years 2014-2018, ticks were collected by flagging in area of ZOO Brno along the sidewalks where visitors of zoo are moving, around children playground and close to enclosure of llamas, horses, and birds. For comparison the prevalence, ticks were collected also in surrounding area (parks in Bystrc and Pisárky), where a lot of people are usually walking. In total, 166 and 390 ticks were collected in ZOO Brno and in surrounding area, respectively. All

of ticks were identified as *Ixodes ricinus*. Ticks from ZOO Brno were divided into 70 samples and ticks from parks into 115 samples, according to developmental stage (nymph, adult) and gender (male, female).

The DNA from ticks was isolated by NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Bacteria *Rickettsia* sp. was detected by simple PCR using primers CS 78 and CS 323 to amplify gene *gltA* (Labruna et al., 2004) and *A. phagocytophilum* was detected by nested PCR using primers *ge3a* and *ge10r* in the first step and *ge9f* and *ge2* in the second step to detect gene 16S rRNA (Massung et al., 1998). *Rickettsia* sp. and *A. phagocytophilum* positive samples were purified and confirmed by sequencing (Macrogen, Amsterdam, the Netherlands). Bacteria *B. burgdorferi* s.l. was detected by real time PCR using primers *p16Swt-fwd* and *p16Swtrev* to amplify gene *Borrelia* 16S rRNA (O'Rourke et al., 2013).

Results and Discussion

In the case of ZOO Brno, *Rickettsia* sp. was detected in four (5.7%) samples and *A. phagocytophilum* in one (1.4%) sample. In surrounding area, *Rickettsia* sp. was detected in 23 (20%) samples and *A. phagocytophilum* in four (3.5%) samples. In addition, *B. burgdorferi* s.l. was detected in 11 (15.7%) samples from ZOO Brno. The results of our study show that there is the higher risk of transmission of infections in surrounding area compared to the ZOO Brno. Regarding the direct detection of zoonotic pathogens in ticks, our results from ZOO Brno are the case of *B. burgdorferi* s.l. lower, but in the case of *Rickettsia* sp. comparable to the results from study carried out in the Czech Republic in recent years. Honig et al. (2017) detected *B. burgdorferi* s.l. by PCR/ESI-MS in 21% and *Rickettsia* sp. in 4% of ticks *I. ricinus* collected in southern Bohemia. The prevalence of *Rickettsia* sp. in ticks from surrounding area of the ZOO Brno was much higher compared to the results of Honig et al. (2017). In contrast, prevalence of *A. phagocytophilum* in our study was lower compared to 5.1% prevalence in ticks from South-West Slovakia (Svitáková et al., 2015) detected by real-time PCR.



Graph 1. Detection of *B. burgdorferi* s.l. by real-time PCR.

Positive samples were amplified to the 37th cycle. RFU - relative fluorescence units, cycles - number of cycles in real-time PCR, PK - positive control of *B. burgdorferi* s.l.

Conclusion

In this study, current data on the prevalence of selected zoonotic pathogens in vectors (ticks) in the ZOO Brno and surrounding area of Brno were obtained. Zoo animals and people (staff and visitors) in zoo and visitors of parks are in a risk of zoonotic infections (*Rickettsia* sp., *A. phagocytophilum* and *B. Burgdorferi* s.l.), that is why they should do preventive measures to minimize the risk of infection.

Acknowledgement

I would like to thank Mgr. Vendula Sychrová for coordination of the collection of ticks in the ZOO Brno.

References

- HONIG, V.; CAROLAN, H.E.; VAVRUSKOVA, Z.; MASSIRE, C.; MOSEL, M.R.; CROWDER, C.D.; ROUNDS, M.A.; ECKER, D.J.; RUZEK, D.; GRUBHOFFER, L.; LUFT, B.J.; ESHOO, M. W. Broad-range survey of vector-borne pathogens and tick host identification of *Ixodes ricinus* from Southern Czech Republic. *FEMS Microbiology Ecology*. 2017, vol. 93, no. 11, s. 129.
- LABRUNA, M.B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M.C.; BOUYER, D.H.; MCBRIDE, J.W.; PINTER, A.; POPOV, 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. 42, 90–98.
- MASSUNG, R.F.; SLATER, K.; OWENS, J.H.; NICHOLSON, W.L.; MATHER, T.N.; SOLBERG, V.B.; OLSON, J.G. Nested PCR assay for detection of granulocytic Ehrlichiae. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998, vol. 36, s. 1090–1095.
- O'ROURKE, M.; TRAWEGER, A.; LUSA, L.; STUPICA, D.; MARASPIN, V.; BARRETT, P.N.; STRLE, F.; LIVEY, I. Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in erythema migrans skin lesions using internally controlled duplex real time PCR. *PLoS ONE*. 2013, vol. 8, no. 5, s. 63968.
- SVITÁLKOVÁ, Z.; HARUŠTIAKOVÁ, D.; MAHRÍKOVÁ, L.; BERTHOVÁ, L.; SLOVÁK, M.; KOCIANOVÁ, E.; KAZIMÍROVÁ, M. *Anaplasma phagocytophilum* prevalence in ticks and rodents in an urban and natural habitat in South-Western Slovakia. *Parasites & Vectors*. 2015, vol. 8, no. 1, s. 276.

Contact address: Pavlína Pittermannová, MVDr., Dpt. of Biology & Wildlife Diseases, FVHE UVPS Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H17007@vfu.cz

Of mice and men – zoonotic diseases in rodent and insectivore reservoir hosts

¹Balážová Alena, ²Jiroušová Eva, ²Baláž Vojtech

¹Dpt. of Biology & Wildlife Diseases, ²Dpt. of Ecology & Diseases of Zoo Animals, Game, Fish and Bees, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

Summary: This study shows results of zoonotic pathogens survey in 7 rodent and 5 insectivore species from a single rural locality. Total of 504 samples was collected and screened using various PCR and qPCR assays. We searched for zoonotic pathogens present and for preferential reservoir hosts of each pathogen. We found *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, *Rickettsia* sp., *Leptospira interrogans*, *Bartonella* spp. and *Babesia* sp. to be present on our study site, no samples tested positive for *B. miyamotoi*. Prevalence of each pathogen and each reservoir host taxon were calculated.

Keywords: zoonosis, prevalence, Lyme disease, leptospirosis, anaplasmosis, babesiosis, rickettsiosis, field mouse, bank vole, common vole, white-toothed shrew

Introduction

Rodents are important reservoir hosts of many zoonotic diseases, in Central Europe we recognize more than 20 zoonoses with rodent reservoirs (Han et al., 2015). Some of these diseases cause severe health impacts (i.e. tick-borne encephalitis or tularemia), while other usually manifest with mild symptoms, but even within those there are cases of serious health problems and fatal cases (i.e. Silva-Pinto et al., 2014). Rural and recreational areas are particularly important in case of rodent-borne diseases, because pathogens from wild, synanthropic and domestic animals are in close contact with each other and also with humans (Sharareh et al., 2017).

Our sampling site (village Salaš) is being studied as part of field education of veterinary students. We have continual record of numbers and species of collected rodents and insectivores, as well as samples from each animal. This material allowed detailed survey of zoonotic pathogens present on the site, their host preferences and prevalence. The pathogens examined in this study were bacteria *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* and *B. miyamotoi*, *Rickettsia* sp., *Leptospira interrogans*, *Bartonella* spp. and protozoan *Babesia* sp.

Material and Methods

The study site is located in village Salaš in Chřiby Mountains (GPS coordinates 49°08'22.2"N 17°21'35.1"E). Since autumn 2014 we annually do field trips to the site to study and collect small mammals as part of practical education of UVPS Brno students. The animals are trapped using baited spring mouse traps. Trapping effort changes between years, on the average we do 1200 trap/nights every year. Every acquired animal was dissected, examined macroscopically and samples of macroscopic parasites and tissues were collected. Tissue samples (liver, heart, kidney, spleen and muscle) were stored in pure 95% ethanol. Over the six years of the study we have processed 504 animals belonging to 7 rodent species (*Apodemus agrarius*, *A. flavicolis*, *A. sylvaticus*, *Microtus arvalis*, *Mus musculus*, *Myodes glareolus*, *Rattus norvegicus*) and 5 insectivore species (*Sorex araneus*, *Sorex minutus*, *Crocidura suaveolens*, *Crocidura leucodon*, *Neomys fodiens*). Two species of field mice (*Apodemus flavicolis* and *A. sylvaticus*) are not easily determined unambiguously and are thus referred to as “*Apodemus* sp.”

DNA of each individual was isolated from mixture of tissues to increase likelihood of detecting pathogens with various predilection organs. DNA was isolated using commercial kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Germany). *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. and *Babesia* sp. presence was detected using in lab developed assays (Balážová et al., *in prep.*).

In case of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* sp. duplex qPCR with specific probes assay was used. *Babesia* spp. was detected using qPCR with primers designed in our lab detecting *Babesia* s. stricto and mastermix with SYBR Green. This dye allows further examination of positive results and positive samples verification by melt temperature of amplified fragments. *Borrelia burgdorferi* a and *B. miyamotoi* were detected using simplex qPCR. *B. burgdorferi* assay was performed following Leutenegger et al. (1999), in case of *B. miyamotoi* we used primers and probe as described in Sato et al. (2014). Presence of *Leptospira interrogans* was detected by duplex PCR (Ahmed et al., 2012) with further visualisation of products on 1.5% agarose gel. For *Bartonella* spp. standard PCR (Schorn et al, 2011) was used.

Results and Discussion

The most abundant rodent species collected were field mice (*Apodemus flavicollis*, *A. sylvaticus*, 297 animals), and bank voles (*Myodes glareolus*, 125 animals), in insectivores the most common were white-toothed shrews (*Crocidura suaveolens*, 25 animals). In these taxa we also found the highest diversity of pathogens (see tab. 1). We collected only 8 common voles (*Microtus arvalis*), likely due to the habitat preferences of the species (the locality is within forested area), but even in those few animals we found 3 target pathogens (*Leptospira interrogans*, *Borrelia burgdorferi* and *Bartonella* spp.).

Table 1. Zoonotic pathogens found in small mammal species.

	<i>Apodemus</i> sp.	<i>Apodemus</i> <i>agrarius</i>	<i>Myodes</i> <i>glareolus</i>	<i>Microtus</i> <i>arvalis</i>	<i>Sorex</i> <i>araneus</i>	<i>Sorex</i> <i>minutus</i>	<i>Crocidura</i> <i>suaveolens</i>	<i>Crocidura</i> <i>leucodon</i>
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	×	×	×			×		
<i>Rickettsia</i> sp.	×	×	×				×	×
<i>Babesia</i> s. str.	×	×	×				×	
<i>Leptospira interrogans</i>	×	×	×	×				
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	×	×	×	×				×
<i>Borrelia miyamotoi</i>								
<i>Bartonella</i> sp.	×	×	×	×	×		×	

The results clearly show differences in prevalence of various pathogens among reservoir host species (see tab. 2). Relatively high prevalence (12 %) of *Leptospira interrogans* was found in bank voles (*Myodes glareolus*). This corresponds quite well with findings from Germany (Fisher et al., 2017), where *Leptospira* spp. prevalence in bank voles was 7.8 %. However, prevalence of *Leptospira* in field mice was much higher in Germany than in our study. *Anaplasma phagocytophilum* seems to prefer field mice (*Apodemus* spp.) on our study site. The main reservoirs for *Borrelia burgdorferi* s.l. on this locality are striped field mice (*Apodemus agrarius*) and probably also common voles (*Microtus arvalis*). We cannot say this with certainty due to limited number of samples (we had 3 positive in 8 total, prevalence 37.5 %). This could confirm the role of common vole as important reservoir host of Lyme disease in Central Europe as suggested by Tkadlec (2019). *B. miyamotoi* was not found in any tested sample. Very interesting and novel finding is high prevalence (24 %) of *Rickettsia* spp. in lesser white-toothed shrews (*Crocidura suaveolens*), which could be revealing new potential reservoir for these pathogens. High prevalence of various *Bartonella* species in both insectivore and rodent hosts is not surprising, as similar results are known from other studies (i.e. Obiegala et al., 2019).

Table 2. Prevalence of found pathogens in the most abundant reservoir species.

	<i>Apodemus sp.</i>	<i>Apodemus agrarius</i>	<i>Myodes glareolus</i>	<i>Crocidura suaveolens</i>
<i>Anaplasma</i> (%)	8.75 (26/297)	6.25 (2/32)	4.80 (6/125)	-
<i>Rickettsia</i> (%)	7.07 (21/297)	6.25 (2/32)	1.60 (2/125)	24.00 (6/25)
<i>Babesia</i> (%)	5.05 (15/297)	3.13 (1/32)	1.60 (2/125)	4.00 (1/25)
<i>Leptospira interrogans</i> (%)	5.72 (17/297)	3.13 (1/32)	12.00 (15/125)	-
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.(%)	9.06 (27/297)	25.00 (8/32)	2.40 (3/125)	-
<i>Bartonella</i> spp. (%)	72.73 (216/297)	50.00 (16/32)	56.00 (70/125)	12.00 (3/25)

Acknowledgement

This work was supported by IGA 220/2019/FVHE UPVS Brno.

Literature

- 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. *Malaysian Journal of Medical Sciences*. 2012, vol. 19, no. 3, p. 9-16.
- BALÁŽOVÁ, A.; BALÁŽ, V.; ŠIROKÝ, P. Duplex qPCR assay for detection and quantification of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. In prep.
- FISHER, S.; MAYER-SCHOLL, A.; IMHOLT, C.; SPIERLING, N.G.; HEUSER, E.; SCHMIDT, S.; REIL, D.; ROSENFELD, U.M.; JACOB, J.; NÖCKLER, K.; ULRICH, R.G. *Leptospira* Genomespecies and Sequence Type Prevalence in Small Mammal Populations in Germany. *Vector-borne and zoonotic diseases*. 2018, vol. 20, no. 20.
- HAN, B.A.; SCHMIDT, J.P.; BOWDEN, S.E.; DRAKE, J.M. Rodent reservoirs of future zoonotic diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015, vol. 112, no. 22, p. 7039-7044.
- LEUTENEGGER, C.M.; PUSTERLA, N.; MISLIN, C.N.; WEBER, R.; LUTZ, H. Molecular Evidence of Coinfection of Ticks with *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato and the Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999, vol. 37, no. 10, p. 3390-3391.
- OBIEGALA, A.; JESKE, K.; AUGUSTIN, M.; KRÓL, N.; FISHER, S.; MERTENS-SCHOLZ, K.; IMHOLT, C.; SUCHOMEL, J.; HEROLDOVA, M.; TOMASO, H.; ULRICH, R.G.; PFEFFER, M. Highly prevalent bartonellae and other vector-borne pathogens in small mammal species from the Czech Republic and Germany. *Parasites Vectors*. 2019, vol. 12, no. 332.
- SATO, K.; TAKANO, A.; KONNAI, S.; NAKAO, M.; ITO, T., KOYAMA, K.; KAWABATA, H. Human infections with *Borrelia miyamotoi*, Japan. *Emerging infectious diseases*. 2014, vol. 20, no. 8, p. 1391–1393.
- SCHORN, S.; PFISTER, K.; REULEN, H. et al. Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Parasites Vectors*. 2011, vol. 4, p. 135.
- SHARAREH, N.; SABOUNCHI, N.S.; ROOME A.; SPATHIS R.; GARRUTO, R.M. Model-based risk assessment and public health analysis to prevent Lyme disease. *Royal Society Open Science*. 2017, vol. 4, no. 11.
- SILVA-PINTO, A.; DE LURDES SANTOS, M.; SARMENTO, A. Tick-borne lymphadenopathy, an emerging disease. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2014, vol. 5, no. 6, p. 656-659.
- TKADLEC, E.; VÁCLAVÍK, T.; ŠIROKÝ, P. Rodent host abundance and climate variability as predictors of tickborne disease risk 1 year in advance. *Emerging Infectious Diseases*. 2019, vol. 25, p. 1738-1741.

Contact address: Alena Balážová, Mgr., Dpt. of Biology & Wildlife Diseases, FVHE UVPS Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, aja.balazova@seznam.cz

Spatial and numerical responses of Red Kites *Milvus milvus* to the Common Vole *Microtus arvalis* population outbreak

¹Dostál Marek, ²Tkadlec Emil, ³Raab Rainer, ⁴Horál David, ⁵Matušík Hynek,
¹Rymešová Dana, ¹Literák Ivan

¹ Dpt. of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

² Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science,
Palacký University Olomouc, Czech Republic

³ Technisches Büro für Biologie Mag. Dr. Rainer Raab, Deutsch-Wagram, Austria

⁴ Nature Conservation Agency of the Czech Republic, Regional Office Brno, Czech Republic

⁵ Czech Society for Ornithology, Czech Republic

Summary

Predator behaviour can be determined by many factors such as prey availability, individual and habitat characteristics, and intraspecific or interspecific factors. Using satellite telemetry, we document the pattern of spatial responses of the Red Kites (*Milvus milvus*) to increasing availability of its dominant prey, the Common Vole (*Microtus arvalis*), from 2018 to the beginning of 2020 in the Břeclav District, Czech Republic. We found a relationship between the population density of Common Voles and home range size of Red Kites. Home range sizes decreased between the winters of 2018 and 2019 when prey density increased to a medium level. Based on the data of three censuses (January 2018, 2019 and 2020) focused on wintering Red Kites at communal roosts in the same region, we analysed the numerical response of these raptors to vole density. Wintering numbers of Red Kites did not respond to increasing prey density until it increased to the highest level in winter 2020. These results suggest that spatial and numerical responses of Red Kites differ in sensitivity to increases in vole density and are therefore triggered at different periods of the vole population cycle.

Keywords: Birds of prey; communal roosting; home range size; population density; prey availability; Rodentia

Introduction

Predators, both mammalian and avian, can respond to variation in food resource availability through a series of changes triggered by prey density. Individual responses include changes in foraging and spatial behaviour, such as changes in predation rates and home range size. At the population-level, predators can respond numerically by changing their breeding success and population density (Gilg et al. 2006).

The Common Vole (*Microtus arvalis*) represents an important prey item in the diet of Red Kites (*Milvus milvus*; Horák 2013). In 2019, a huge population outbreak of the Common Vole was observed across Europe including the Czech Republic (Jacob et al. 2020). Prior to that, vole population densities were relatively low in 2017 and steadily increased in 2018, allowing us to observe differences in sensitivity of different responses to changes in food availability. Therefore, the objective of this three-year study is to document the patterns of spatial and numerical responses of wintering Red Kites to increasing vole population densities from winter 2018 throughout winter 2020.

Material and Methods

Our study area was situated in the Břeclav District in southern Moravia, Czech Republic. Three individuals of Red Kites were tagged as pulli whilst in the nest and fitted with GPS/GSM loggers in 2016. These individuals occupied the study area during the study period, from 2018 to the beginning of 2020, continuously. Monthly home range (HR) sizes were determined as 95% Minimum Convex Polygons in km² using the ArcGIS software. Data on the numbers of

wintering Red Kites in January 2018, 2019 and 2020 were obtained by direct censuses by a team of local birdwatchers at four (2018) and five (2019, 2020) communal roosts, respectively. Vole population densities were monitored using a burrow index in forage fields in the Břeclav District, which is publicly available from the Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture, Brno. Common Vole densities in winters 2017/2018, 2018/2019 and 2019/2020 were considered as low, medium and high, respectively. We applied two generalized linear mixed models (GLMM) to analyse the variation in 1) log-transformed HR size and 2) the numbers of wintering Red Kites throughout three winters. The best-supported model was selected according to the lowest Akaike's information criterion for small sample size (AICc). A difference in AICc (ΔAICc) between a model with predictor and intercept-only model greater than two was considered as strong evidence for a particular model. The R package blme was used to fit the GLMMs.

Results

The mean index of vole density differed considerably between the winters 2017/2018, 2018/2019 and 2019/2020 (Fig. 1). The model for HR with predictor obtained large support ($\Delta\text{AICc} = 5.6$) over the model without it, suggesting that HR sizes decreased between the winter of 2017/2018 and 2018/2019 when prey densities increased to a medium level (Fig. 1b). In numerical response analysis, the data also provided support to the GLMM with predictor ($\Delta\text{AICc} = 48.94$). As suggested by Fig. 1c, wintering numbers of Red Kites did not respond to increasing prey densities until the densities of the Common Vole increased to the highest level in the winter of 2019/2020.

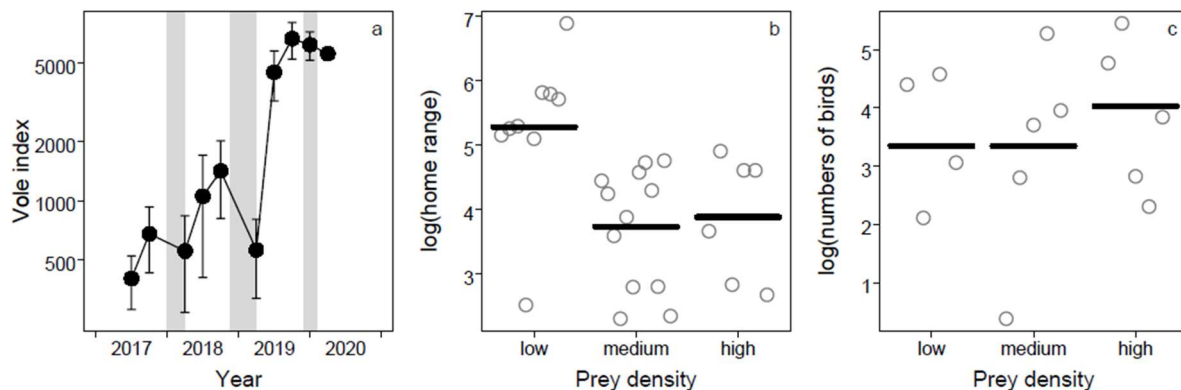


Figure 1. (a) Population density of the Common Vole in the Břeclav District during the study period (2018–2020). Vole density is plotted on a log scale. The shaded bars indicate winter periods used in the study. (b) Log-transformed home range sizes of three Red Kites plotted in response to increasing population densities of the Common Vole within non-breeding periods in winter 2017/2018 (low density), 2018/2019 (medium) and 2019/2020 (high). (c) Numbers of wintering Red Kites plotted in response to increasing Common Vole population densities in winters 2017/2018 (low density), 2018/2019 (medium) and 2019/2020 (high).

Discussion

We found that spatial responses of Red Kites to increasing prey availability occurred at medium densities one year earlier than the numerical response of wintering Red Kites. The number of roosting Red Kites did not change until the prey densities were high. These results suggest that there is a time lag between spatial and numerical response of Red Kites to increasing vole availability.

HR sizes of Red Kites have been studied by various authors (Nachtigall et al. 2003; Pfeiffer & Meyburg 2015) but no one focussed on changes in HR size relative to changing prey

availability. The Red Kite is a highly social species in winter, with large numbers gathering every evening at communal roost sites, often returning to the same site for many years (Carter and Grice 2000). In the Břeclav District, numbers of wintering Red Kites at communal roosting sites were clearly linked to peak vole population densities but not to medium pre-peak population densities. In western Finland, numbers of European Kestrels (*Falco tinnunculus*), Short-eared Owls (*Asio flammeus*) and Long-eared Owls (*Asio otus*) responded regularly to changes in *Microtus* vole population density (Korpimäki and Norrdahl 1991). Densities of wintering Red-tailed Hawks (*Buteo jamaicensis*) and Rough-legged Buzzards (*Buteo lagopus*) were greater in habitats that had higher densities of Meadow Voles (*Microtus pennsylvanicus*; Baker and Brooks 1981). Although all these studies confirm that numerical responses to variation in food availability are common in raptors, none have been designed specifically to reveal differences in prey densities at differing thresholds needed to trigger responses at the individual- and population-level.

Conclusion

Different types of responses may have diverse sensitivity to changes in prey availability. Our results suggest that individual spatial HR responses of Red Kites are more sensitive to changes in food availability and have a lower threshold prey density than numerical responses at the population-level. Our study shows that detailed investigations of predator responses during prey population outbreaks may provide further insights into adaptive responses by predators at different prey population densities.

Acknowledgements

We would like to thank Péter Spakovszky who tagged the birds with telemetry loggers. We thank Petr Berka, Gašpar Čamlík, Manuel Denner, Pavel Forejtek, Johannes Laber, Marek Palička, Ján Svetlík, Vlasta Škorpíková, Pavel Štěpánek and Pavel Trávníček, who were local observers at communal roosts.

References

- BAKER J.A.; BROOKS R.J. Distribution patterns of raptors in relation to density of Meadow Voles. *Condor*. 1981, vol. 83, iss. 1, p. 42–47.
- CARTER I.; GRICE P. Studies of re-established Red Kites in England. *British Birds*. 2000, vol. 93, iss. 7, p. 304–322.
- GILG O.; SITTLER B.; SABARD B.; HURSTEL A., SANÉ R.; DELATTRE P.; HANSKI I. Functional and numerical responses of four lemming predators in high arctic Greenland. *Oikos*. 2006, vol. 113, iss. 2, p. 193–216.
- HORÁK P. Srovnání složení potravy luňáka hnědého (*Milvus migrans*) a luňáka červeného (*Milvus milvus*) na jižní Moravě v době výchovy mláďat. *Crex*. 2013, vol. 32, p. 54–64.
- JACOB J.; IMHOLT CH.; CAMINERO-SALDANA C.; COUVAL G.; GIRAUDOUX P.; HERRERO-CÓFRECES S.; HORVÁTH G., LUQUE-LARENA J.J.; TKADLEC E.; WYMENGA E. Europe-wide outbreaks of Common Voles in 2019. *Journal of Pest Science*. 2020, vol. 93, iss. 2, p. 703–709.
- KORPIMÄKI E.; NORRDAHL K. Numerical and functional responses of Kestrels, Short-eared Owls, and Long-eared Owls to Vole densities. *Ecology*. 1991, vol. 72, iss. 3, p. 814–826.
- NACHTIGALL W.; STUBBE M.; HERRMANN S. Aktionsraum und Habitatnutzung des Rotmilans (*Milvus milvus*) im Winter – eine telemetrische Studie im Nordharzvorland. *Journal of Ornithology*. 2003, vol. 144, iss. 3, p. 284–294.
- PFEIFFER T.; MEYBURG B. GPS tracking of Red Kites (*Milvus milvus*) reveals fledgling number is negatively correlated with home range size. *Journal of Ornithology*. 2015, vol. 156, iss. 4, p. 963–975.

Contact address: Dostál Marek, Mgr., Dpt. of Biology & Wildlife Diseases, FVHE UVPS Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, dostalm@vfu.cz

Biotopové preference celosvětově ohroženého rarioha velkého *Falco cherrug* v místech dočasného usídlení v Panonské pánvi

Habitat preferences within temporary settlements areas of the globally endangered Saker Falcon *Falco cherrug* in the Pannonian Basin

¹Rozsypalová Lenka, ²Raab Rainer, ²Spakovszky Péter, ¹Rymešová Dana, ¹Škrábal Jan, ¹Literák Ivan

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

²Technisches Büro für Biologie Mag. Dr. Rainer Raab, Deutsch-Wagram, Austria

Summary

Habitat preferences were studied in one juvenile and five adult Saker Falcons *Falco cherrug* equipped with GPS/GSM loggers (KITE-L, Ecotone, Poland). Adult birds were tagged from 2014 until 2017 in Austria. Juvenile was tagged before release from a rescue centre in the Czech Republic. We defined their temporary settlement areas (TSAs, sites where the individual stayed for minimum of 10 nights within a 20 km diameter circle) and calculated home ranges (HR) in each TSA as minimum convex polygons 95 % (MCP95). We assessed habitat availability by determining proportions of areas in nine habitat types within HRs and explored habitat utilization by calculating the proportion of GPS locations within each habitat type. There was a significant negative correlation between proportion of arable land (AL) and HR size ($r_p = -0.528$, $P < 0.05$, $n = 14$). The frequency of locations in AL reached over 97 % of the total number of GPS locations within HRs. Habitat utilization was non-random when assessing proportion of locations to proportion of habitat areas in each TSA ($\lambda = 0.091$, $P < 0.05$, $n = 14$). The ranking matrix from compositional analysis confirmed the significant preference for AL. Saker Falcons preferred to roost on high-voltage pylons than on trees. Satellite telemetry can be a useful tool for both monitoring of the critical period for birds after releasing from rescue stations and evaluating the factors that may limit the population density of this globally endangered raptor.

Keywords: home range; compositional analysis; high voltage pylons; rescue centre

Úvod

Raroh velký (*Falco cherrug*) je kriticky ohroženým dravcem, jehož areál hnízdního rozšíření pokrývá lesostepní pásmo Eurasie. Populace rarioha velkého evropského (*Falco cherrug cherrug* Gray, 1834, dále nazýván „rarioh“) může být rozdělena na východní evropskou populaci a centrální evropskou populaci (populaci Panonské nížiny), které od sebe geograficky oddělují Karpaty (Prommer a kol. 2014). K typickým hnízdním biotopům rarioha patřily staré lesy v říčních nížinách, nebo na úpatí hor v blízkosti otevřených ploch (Hudec & Šťastný 2005, Škorpíkova a kol. 2019). Po snížení početnosti populace rarioha ve 20. století (Chavko a kol. 2014, Bagyura a kol. 2019), probíhalo v Panonské nížině v období 1977–2014 několik programů zaměřených na ochranu tohoto druhu (Bagyura a kol. 2012, Bagyura a kol. 2019, Chavko a kol. 2014). Součástí byla také instalace hnízdních budek na sloupy velmi vysokého napětí, která pomohla zvýšit hnízdní úspěšnost (Bagyura a kol. 2012, Chavko a kol. 2014). Mladí ptáci se po opuštění hnízda vydávají i mimo areál hnízdního rozšíření a mají tendenci omezit svůj pohyb na několik míst dočasného usídlení (temporary settlement areas, TSA; Prommer & Bagyura 2008, Gamauf & Dosedel 2012, Prommer a kol. 2012, Nemček a kol. 2016). Tato strategie pomáhá mláďatům překonat kritické období, kdy musí čelit výzvě hledání potravy v neznámé krajině a zlepšovat svoji loveckou techniku (Soutullo a kol. 2008). Dospělí ptáci hnízdící v Panonské nížině jsou především stálí, jen někteří jedinci se v zimních měsících vydávají na ne příliš vzdálená zimoviště (Prommer a kol. 2012).

Cílem této studie bylo definovat biotopové preference rarohů v místech dočasného usídlení v Panonské pánvi pomocí moderní telemetrie a získat data použitelná pro budoucí ochranné aktivity zaměřené na tento druh.

Materiál a metody

Biotopové preference byly studovány u 1 mladého a 5 dospělých rarohů velkých pomocí GPS/GSM satelitní telemetrie. Mladá samice byla označena kroužkem (CB 52431) a vysílačkou (Kite-L, Ecotone, Polsko) v záchranné stanici Buchlovice (2016, ČR). Pět dospělých ptáků (2 samice LY 00698, D 5093, 3 samci JC 57518, D 4643, D 5534) bylo odchyceno a označeno v přírodě v Rakousku (2014–2017). GPS pozice ptáků byly sbírány podle individuálního nastavení (obvykle jedna pozice za 6 hodin). Data jsme analyzovali pomocí GIS (ArcGis 10.1, Esri, Redlands, USA, extenze Spatial Analyst, HRT, ArcMET) v projektovaném souřadnicovém systému WGS 84 UTM zóna 33. Velikost domovského okrsku (HR) v místě dočasného usídlení (TSA) jsme definovali jako 95% minimální konvexní polygon (MCP) z bodů vybraných následující metodou: 1) vyhledali jsme místa, kde označený pták zůstal po dobu minimálně 10 nocí v kruhu o průměru 20 km, 2) přidali jsme k nim denní pozice, mimo těch, kdy pták nocoval následující noc více než 10 km od středu původního shluku nočních lokalit. Pomocí rastrové vrstvy Corine (Copernicus 2018, 100 × 100 m) jsme získali 9 **biotopových kategorií** a vypočítali **dostupnost** každé kategorie jako procento její plochy (km²) v rámci každého HR a **využití** jako procento počtu GPS lokací vyskytujících se v dané biotopové kategorii v rámci HR. Pro statistické výpočty jsme použili software Unistat 6.5. (Unistat Ltd., GB). Pro kompoziční analýzu jsme použili R 3.6.1 a balík AdehabitatHS (Aebischer a kol. 1993).

Výsledky a diskuse

Šest rarohů jsme sledovali v období 2014–2019, získali jsme celkem 16 101 lokací (min 196, max 6950, průměrně 2684) a 14 TSA (min 1, max 4, průměrně 2). Velikosti HR mladého raroha (4 TSA) se pohybovaly od 43,2 (TSA 4) do 223,7 (TSA 2) km², s průměrem 106,9 km², u dospělých (10 TSA) se pohybovaly od 18,3 do 163,4 km², s průměrem 70 km². Významná negativní korelace byla mezi velikostí HR a podílem orné půdy v HR ($r_P = -0,528$; $P = 0,026$; $n = 14$). V biotopu orná půda se patrně nachází dostatečně velká denzita kořisti, kterou dospělí rarozi lokálně využívají, a proto je velikost domovského okrsku tím menší, čím více orné půdy obsahuje.

TSA se nacházela v nížinách kolem 200 m n. m. ve zvlněné zemědělské krajině mezi menšími obcemi, nebo na okraji měst. Orná půda (AL) dominovala ve všech HR s jednou výjimkou (TSA 3 u jedince CB 52431). Na orné půdě se nacházelo přes 97 % z počtu lokací v jednotlivých HR. Kompoziční analýza potvrdila nenáhodné využití biotopů na základě lokací ve srovnání s procentem plochy biotopů ($\lambda = 0,091$; $P < 0,05$; $n = 14$). Matice pořadí ukázala významnou preferenci AL oproti všem ostatním biotopům, v TSA byly pro nocování využívány z 92 % sloupy velmi vysokého napětí a ze 7,2 % stromy na okrajích lesů. Stožáry velmi vysokého napětí se zdají být důležitými prvky pro rarozy v otevřené krajině Panonské nížiny a jsou jimi využívány zejména k odpočinku a hnízdění.

Závěr

V biotopu orná půda se patrně nachází dostatečně velká denzita kořisti, kterou dospělí rarozi lokálně využívají, a proto je velikost domovského okrsku tím menší, čím více orné půdy obsahuje. Stožáry velmi vysokého napětí se zdají být důležitými prvky pro rarozy v otevřené krajině Panonské nížiny a jsou jimi využívány zejména k odpočinku a hnízdění. Získaná data je možné využít při přípravě programů na ochranu druhu, pro vyhodnocení faktorů majících

vliv na hustotu populace tohoto globálně ohroženého dravce, či k analýze přežívání ptáků vypouštěných ze záchranných stanic.

Poděkování

Rádi bychom poděkovali Ivetě Bedáňové, Janu Homolkovi, Davidu Horalovi, Šimonu Krejčímu, Hynku Matušíkovi, Connoru Panterovi, Lubomíru Peške, Karlu a Martinu Tomeškovi and Manuelu Wojtovi za spolupráci na této studii.

Literatura

AEBISCHER J. N., ROBERTSON P. A., KENWARD R. E. Compositional analysis of habitat use from animal radio-tracking data. *Ecology*. 1993, vol. 74, no. 5, s. 1313–1325.

BAGYURA J., SZITTA T., HARASZTHY L., VISZLÓ L., FIDLÓCZKY J. & PROMMER, M. Results of the Saker Falcon (*Falco cherrug*) conservation programme in Hungary between 1980–2010. *Aquila*. 2012, vol. 119, s. 105–110.

BAGYURA J., PROMMER M., Cserkészt T., VÁCZI M. & TÓTH, P. Behind the population changes of the Saker Falcon (*Falco cherrug*) in Hungary in the past 12 years, in particular with regard to the period between 2007 and 2018. *Heliaca*. 2019, vol. 15, s. 49–66.

COPERNICUS 2018. CORINE raster layers 2018. European Environment Agency. Dostupné z: <https://land.copernicus.eu/pan-european/corine-land-cover/clc2018>. Staženo 10. dubna 2019.

GAMAUF A., DOSEDEL R. Satellite telemetry of Saker Falcons (*Falco cherrug*) in Austria: juvenile dispersal at the westernmost distribution limit of the species. *Aquila*. 2012, vol. 119, s. 65–78.

CHAVKO J., SLOBODNÍK R., DEUTSCHOVÁ L., LIPTÁK J., MIHÓK J., OBUCH J., NEMČEK V. The Saker Falcon (*Falco cherrug*) population, diet and nest boxes in Slovakia: LIFE-project report 2011–2014. *Slovak Raptor Journal*. 2014, vol. 8, no. 2, s. 73–86.

HUDEK K., ŠŤASTNÝ K. (eds). Fauna ČR. Ptáci 2/I. Praha: Academia, 2005. ISBN 978-80-200-1114-5

NEMČEK V., UHRIN M., CHAVKO J., DEUTSCHOVA L., MADERIČ B., NOGA M. Habitat structure of temporary settlement areas of young Saker Falcon *Falco cherrug* females during movements in Europe. *Acta Ornithologica*. 2016, vol. 51, no. 1, s. 93–103.

PROMMER, M. & BAGYURA, J. Dangerous journeys of Sakers of the Carpathian basin. In SIELICKI J., MIZERA T. (eds). Peregrine falcon populations – status and perspectives in the 21st century. Turul, Warsaw. 2008., s. 443–452.

PROMMER M., BAGYURA J., CHAVKO J., UHRIN M. Migratory movements of central and eastern European Saker Falcons (*Falco cherrug*) from juvenile dispersal to adulthood. *Aquila*. 2012, vol. 119, s. 111–134.

SOUTULLO A., CADAHÍA L., URIOS V., FERRER M., NEGRO J.J. Habitat use by juvenile Golden Eagles *Aquila chrysaetos* in Spain. *Bird Study*. 2008, vol. 55, s. 236–240.

ŠKORPÍKOVÁ V., HORAL D., BERAN V., ČAMLÍK G. The Saker Falcon (*Falco cherrug*) population in the Czech Republic in 2011–2018. *Heliaca*. 2019, vol. 15, s. 10–18.

Kontaktní adresa: Lenka Rozsypalová, MVDr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H18004@vfu.cz

Insect ectoparasites from wild passerine birds in the Azore Islands

¹Ošlejšková Lucie, ¹Sychra Oldřich, ¹Kounková Šárka, ²Gustafsson Daniel R.,
³Resendes Roberto, ³Rodríguez Pedro, ¹Literák Ivan

¹Dpt. of Biology & Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

²Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resources, Guangdong Public Laboratory of Wild
Animal Conservation and Utilization, Guangdong Institute of Applied Biological Resources
Haizhu District, Guangzhou, China

³CIBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, InBIO Laboratório Associado, Polo
dos Açores, Universidade dos Açores, Ponta Delgada, Portugal

Summary

Wild passerine birds (Passeriformes) from three islands of the Archipelago of the Azores were examined for ectoparasites. Two species of louse-flies *Ornithomya avicularia* and *Ornithoica turdi* (Diptera: Hippoboscidae), three species of fleas *Ceratophyllus gallinae*, *Ceratophyllus* sp. and *Dasypsyllus gallinulae* (Siphonaptera: Ceratophyllidae), and 11 species of chewing lice belonging to the genera *Menacanthus*, *Myrsidea* (Phthiraptera: Menoponidae), *Ricinus* (Phthiraptera: Ricinidae), *Brueelia*, *Guimaraesiella*, *Philopterus*, *Sturnidoecus* and *Turdinirmus* (Phthiraptera: Philopteridae) were found on 114 birds of six species. *Guimaraesiella tovoornikae* and *Myrsidea sylviae* from *Sylvia atricapilla* will be redescribed. Parasitological parameters such as prevalence and geographic distribution of recorded ectoparasites are discussed.

Keywords: Chewing lice; Phthiraptera; flea; Siphonoptera; louse-fly; Hippoboscidae; Passeriformes

Introduction

A total of 384 species of birds have been recorded in the Azores. It includes endemic sedentary birds, species introduced or escapes from captivity as well as migrating non-breeding species and occasional vagrants from either the European or American continent. Currently, only 37 bird species and subspecies regularly breed and seven other species occasionally nest in the Azores, including 16 (36%) species and subspecies of passerine birds. Contrary to high number of potential hosts only 19 species of chewing lice (Phthiraptera) mainly from marine birds, 1 species of louse-fly (Hippoboscidae) and 4 species of fleas (Siphonaptera) have been reported from Azores (Borges et al., 2010).

Material and Methods

In 2013, a total of 266 sedentary passerine birds of 8 species were examined for ectoparasites on three islands of the Azores archipelago (São Miguel, Santa Maria, Graciosa). Ectoparasites were collected by visual examination and using the fumigation chamber method with visual search of the head (Clayton & Drown, 2001). Ectoparasites were stored in 96% ethanol. Chewing lice and fleas were subsequently slide-mounted in Canada balsam as permanent slides, following the technique in Palma (1978), for proper identification. Identification of the ectoparasites was based on available papers. For statistical analyses, Fisher's exact test (for prevalences) and bootstrap 2-sample t-test (for intensities and abundances) were used. Calculations were made in Quantitative Parasitology 3.0 (Rozsa et al., 2000).

Results and Discussion

A total of 16 (6.0%) birds of 5 species were parasitized by 19 fleas of three species: *Ceratophyllus gallinae* (Schrank, 1803), *Ceratophyllus* sp., and *Dasypsyllus gallinulae* (Dale, 1878). To date *C. gallinae* and *D. gallinulae* are known only from São Miguel (Borges et al.,

2010). Our records represent the first finding of these species also on Santa Maria and Graciosa, respectively.

A total of 29 (10.9%) birds of 4 species were parasitized by 43 louse-flies of two species: *Ornithomya avicularia* (Linnaeus, 1758) and *Ornithoica turdii* (Olivier in Latreille, 1811). *Ornithoica turdi* from *F. coelebs*, *E. rubecula*, *T. merula* on each of the three islands explored. *O. avicularia* from *F. coelebs*, *P. domesticus*, *T. merula* on São Miguel and Graciosa. According to their life cycles, louse-flies of both species were more abundant in September. It is in accordance with Chvála (1980) who mentioned that imagoes of these species occur mainly during the autumn (from August to October). Only three individuals (one *O. turdi* and two *O. avicularia*) were collected in April.

A total of 91 (34.2%) birds of 5 species were parasitized by 11 species of chewing lice. *Menacanthus eurysternus* is extremely euryxenous generalist with cosmopolitan distribution (Martinu et al., 2015). Our record confirms its occurrence also in the archipelago of the Azores. Interesting case of very high infestation (over 1350 individuals) by this hematophagous species was recorded on one male of *Fringilla coelebs* in post-breeding period (September) in Graciosa. Such a high infestation can be expected on bird in bad health status or with reduced ability of preening or scratching (Price et al., 2003). Surprisingly examined male was apparently in good condition, coloured as other examined males without visible injury, deformation of the bill or legs. We can only speculate that it may have been weakened by some disease or an internal parasite.

Myrsidea sylviae was described by Sychra & Literak (2008) on the base of single male and female from *Sylvia atricapilla* in the Czech Republic. Moreover, both specimens were found on different host individuals in different part of the year (female on one of 75 examined birds in August 2015 and male on one of 110 examined birds in April 2007). Despite this species differs from other *Myrsidea* species in Europe, existence of only two individuals made its status and association with *S. atricapilla* questionable. However, recently Literak et al. (2015) found strong population of *M. sylviae* on *S. atricapilla* in Azores. It confirms that this bird is really natural host of this louse species. We present also morphometric characteristics of *M. sylviae* to increase knowledge of its intraspecific variability.

Similarly, *Guimaraesiella tovornikae* was described as *Brueelia tovornikae* by Balat (1981) on the base of few specimens found on *S. atricapilla* in the Czech Republic. Recently, we redescribed all *Brueelia sensu lato* described by Balat (Gustafsson et al., 2019) with one exception – *G. tovornikae* – because type specimens of this species were not available for us at that time. We would like to present redescription of *G. tovornikae* based on Balat's type series and also on material from *S. atricapilla* from Azores to increase the knowledge of its intraspecific variability too.

Other species from *Brueelia* complex recorded in Azores, i. e. *B. kluzi*, *G. amsel*, *G. tristis* and *T. merulensis* are strictly host-specific lice known from their hosts from different countries of Europe (Gustafsson & Bush, 2017, Gustafsson et al., 2019). To date no chewing louse from passerines was reported from Portugal (Tomás et al., 2016).

Conclusion

Up to now there are only scarce data about occurrence of insect ectoparasites from Azore islands. Our results update our knowledge about diversity and geographical distribution of chewing lice, fleas and louse-flies on passerine birds of three Macaronesian islands of the Azores. Our records represent new westernmost distributional limit for almost all of recorded species, demonstrating the importance of parasitological research in the area.

References

- BALÁT, F. A contribution to the knowledge of biting lice (Mallophaga) found on passerines (Passeriformes). *Folia Parasitologica* (Praha). 1981, vol. 28, p. 273–282.
- BORGES, P.A.V.; COSTA, A.; CUNHA, R.; GABRIEL, R.; GONÇALVES, V.; MARTINS, A.F.; MELO, I.; PARENTE, M.; RAPOSEIRO, P.; RODRIGUES, P.; SANTOS, R.S.; SILVA, L.; VIEIRA, P. & VIEIRA, V. (Eds.) A list of the terrestrial and marine biota from the Azores. Princípiá, 2010, 429 pp.
- CHVÁLA, M. Blood-sucking flies and botflies – Diptera. Fauna CSSR 22 (In Czech.). Academia. Praha, 1980, 540 p.
- CLAYTON, D.H.; DROWN, D.M. Critical evaluation of five methods for quantifying chewing lice (Insecta: Phthiraptera). *Journal of Parasitology*. 2001, vol. 87, p. 1291–1300.
- GUSTAFSSON, D.R.; BUSH, S.E. Morphological revision of the hyperdiverse *Brueelia*-complex (Insecta: Phthiraptera: Ischnocera: Philopteridae) with new taxa, checklists and generic key. *Zootaxa*. 2017, no. 4313, p. 1–443.
- GUSTAFSSON, D. R.; OŠLEJŠKOVÁ, L.; NAJER, T.; SYCHRA, O.; ZOU, F. Redescriptions of thirteen species of chewing lice in the *Brueelia*-complex (Phthiraptera, Ischnocera, Philopteridae), with one new synonymy and a neotype designation for *Nirmus lais* Giebel, 1874. *Deutsche Entomologische Zeitschrift (neue Folge)*. 2019, vol. 66, no. 1, pp. 17–39.
- MARTINU, J.; SYCHRA, O.; LITERÁK, I.; CAPEK, M.; GUSTAFSSON, D.L. ; STEFKA, J. Host generalists and specialists emerging side by side: an analysis of evolutionary patterns in the cosmopolitan chewing louse genus *Menacanthus*, *Int. J. Parasitol.* 2015, vol. 45, p. 63–73.
- LITERÁK, I.; SYCHRA, O.; RESENDES R.; RODRÍGUES, P. Chewing lice in Azorean blackcaps (*Sylvia atricapilla*): A contribution to parasite island syndromes. *Journal of Parasitology*. 2015, vol. 101, no. 2, p. 252-254.
- PRICE, R.D.; HELLENTHAL, R.A.; PALMA, R.L.; JOHNSON, K.P.; CLAYTON, D.H. The Chewing Lice: World Checklist and Biological Overview. Illinois Natural History Survey Special Publication 24. 2003, 501 pp.
- RÓZSA, L; REICZIGEL, J; MAJOROS, G. Quantifying parasites in samples of hosts. *Journal of Parasitology*. 2000, vol. 86, p. 228–232.
- SYCHRA O.; LITERÁK I. *Myrsidea sylviae* (Phthiraptera, Menoponidae), a new species of chewing louse from *Sylvia atricapilla* (Passeriformes, Sylviidae). *Deutsche Entomologische Zeitschrift*. 2008, vol. 55, p. 241–243.
- TOMÁS, A.; PALMA, R.L.; REBEL, M.T.; DA FONSECA, I.P. Chewing lice (Phthiraptera) from wild birds in southern Portugal. *Parasitology International*. 2016, vol. 65, no. 3, p. 295–301.

Contact address: Lucie Ošlejšková, Mgr., Dpt. of Biology & Wildlife Diseases, FVHE UVPS Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, oslejskoval@vfu.cz

Visualization of digestive tract of ticks

^{1,2} Ondruš Jaroslav, ^{1,2} Široký Pavel, ³ Novobilský Adam

¹Dpt. of Biology & Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

²CEITEC Veterinary and Pharmaceutical University Brno, Czech Republic

³Department of Pharmacology and Immunotherapy, Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Summary

There are numerous techniques to visualize anatomy of ticks, yet none allows to observe the whole digestive tract of fully engorged ticks in its natural and intact state. Micro-computed tomography (micro-CT) uses X-rays to create a three-dimensional reconstruction of a viewed object. Even though micro-CT is a non-invasive method, soft biological tissues need to undergo preparation procedure prior scanning in order to gain contrast. Used contrasting techniques e. g. dehydration and immersion in a liquid metal solution are not optimal in case of fully engorged ticks due to the caused shrinkage of specimen and the slow, uneven penetration of a contrasting agent into their sizable bodies. In this study, we aim to visualize the digestive tract of engorged ticks unaffected by any contrasting procedure utilizing micro-CT.

Keywords: Ticks; anatomy; micro-CT

Introduction

Ticks are troublesome parasites that increase their weight and volume over 100 times during feeding (Sauer *et al.*, 1995). Correspondingly, their organs intensively change in size and structure. The most notable transformation undergo the midgut and the salivary glands, major organs both greatly involved in transmission of numerous tick-borne pathogens. State-of-the-art tools and innovative study approaches are necessary to further expand the knowledge of the anatomy and physiology of engorged ticks.

Micro-CT allows non-invasive visualization of internal structures of small animals. For detailed reviews see Ritman (2011); du Plessis *et al.* (2017) and O'Sullivan *et al.* (2018). In short, during scanning of the object of interest, two-dimensional projections are captured from various angles using X-rays. These projections are then used to reconstruct a three-dimensional model reflecting the X-ray attenuation of its components. Eventually, reconstructed model can be used to view both external and internal structures of the specimen. However, soft biological samples consist mostly of water, which attenuate X-rays poorly. Therefore, it is necessary to increase the contrast. Several approaches e. g. exposure of the sample to a contrasting agent or its dehydration (O'Sullivan *et al.*, 2018) are available. However, these are not suitable for visualization of anatomy of fully engorged ticks, due to the slow penetration of a contrasting element into the sizeable body of a tick and the specimen's shrinkage occurring during the dehydration. Thus, despite micro-CT is a noninvasive imaging method, engorged ticks still need to undergo preparation procedures which reshape or shrink their bodies (Starck *et al.*, 2018).

In this study, we describe a novel approach for visualization of the tick digestive tract without the structure modifying effect of traditional preparation procedures employing artificial *in vitro* feeding and micro-CT.

Materials and Methods

Questing adult ticks were collected by flagging from vegetation in a mixed forest located in Brno, Czech Republic in April 2019. Ticks were placed into 50 ml Falcon Tubes respecting sex together with 5 blades of the grass, where they remained until the start of the feeding.

Next, *in vitro* feeding system was assembled according to Kröber and Guerin (2007). From 9 to 12 females and the same number of males were put into each of 12 feeding chambers. Next, chambers were inserted into the standard 6-well culture plates and filled with 3.0 ml of bovine blood treated with heparin (15 U/ml). The blood was collected at a local slaughterhouse, supplied with 100 U/ml Nystatin, 1 mM Adenosine 5'-triphosphate (ATP), 4 g/ml Glucose and 5 µg/ml Gentamicin and stored at 4 °C until use. All chemicals used were purchased at Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany. Gold nanoparticles (Au-NP) were pipetted into the blood before each of the blood exchanges, which were done approximately every 12 hours for the whole course of feeding.

Prior scanning, ticks were put into scanning tubes and scanned on Bruker microCT SkyScan 1276 (Bruker, Kontich, Belgium) at 40 kV, 100 µA without filter, with resolution 4032 × 2966 px, pixel size 4.0 µm, step and shoot mode with rotation step 0.06 degrees, 2944 projections.

Results

Totally, 20 females engorged on bovine blood supplied with Au-NP. Tick digestive tract was clearly visualized (Fig. 1). No negative effect of Au-NP on feeding, survival or oviposition of ticks was observed. Also, no significant differences of the Au-NP concentrations on numbers of engorged ticks ($p>0.99$) or average bodyweights ($p>0.91$) among both groups were noted.

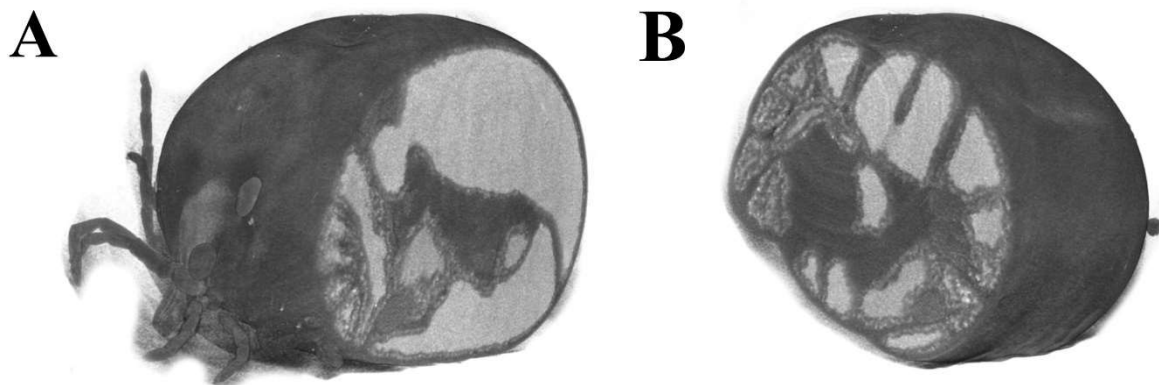


Figure 1. Reconstructed sections through body of *I. ricinus* female artificially fed *in vitro* on blood enriched with Au-NP. (A) Sagittal and (B) transaxial view.

Discussion

Several guidelines employing traditional contrasting procedures of small animals showing various staining protocols exploiting e. g. phosphotungstic acid, phosphomolybdic acid, iodine, potassium iodide, mercuric chloride or osmium tetroxide are available (Metscher, 2009; Pauwels *et al.*, 2013). Nonetheless, these approaches cannot be used in case of engorged ticks due to their sizeable and soft bodies. Similarly, feeding on laboratory rodents intravenously injected with a contrasting agent is not suitable due to the rapid clearance of contrasting agents from their blood (Nebuloni *et al.*, 2013). *I. ricinus*, however, need to feed for approximately a week. Therefore, we developed a new protocol utilizing the hematophagous nature of ticks and employed gold nanoparticles with stealth properties provided by a layer of polyethylene glycol, that bypass the negative effects of traditional contrasting procedures. Interestingly, even though toxicity is one of the major properties that need to be considered in terms of each contrasting agent (Nebuloni *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014), no toxic effect was observed in our study.

Conclusions

We described a new approach of imaging the digestive tract of engorged females *I. ricinus* employing micro-CT. For the first time, we allowed ticks to feed on the blood enriched with golden nanoparticles. This method is suitable for studying the dynamics, changes or abnormalities of the midgut engorgement, caused, for instance, by adding an extra substance or drug into the blood meal. In addition, this may be the first step to achieve visualization of all organs of engorged ticks in the native state unaffected by any preparation contrasting procedures.

Acknowledgement

This study was supported by grants IGA 201/2019/FVHE and CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000495.

References

- du PLESSIS, Anton, Chris BROECKHOVEN, Anina GUELPA a Stephan Gerhard le ROUX, 2017. Laboratory X-ray micro-computed tomography: A user guideline for biological samples. *GigaScience*. **6**, 1–11.
- KRÖBER, Thomas a Patrick M. GUERIN, 2007. An *in vitro* feeding assay to test acaricides for control of hard ticks. *Pest Management Science*. **63**, 17–22.
- LI, Xiang, Nicolas ANTON, Guy ZUBER a Thierry VANDAMME, 2014. Contrast agents for preclinical targeted X-ray imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **76**, 116–133.
- METSCHER, Brian D., 2009. MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues. *BMC Physiology*. **9**, 11.
- NEBULONI, Laura, Gisela A. KUHN a Ralph MÜLLER, 2013. A comparative analysis of water-soluble and blood-pool contrast agents for *in vivo* vascular imaging with micro-CT. *Academic Radiology*. **20**, 1247–1255.
- O’SULLIVAN, James D. B., Julia BEHNSEN, Tobias STARBORG, Andrew S. MACDONALD, Alexander T. PHYTHIAN-ADAMS, Kathryn J. ELSE, Sheena M. CRUICKSHANK a Philip J. WITHERS, 2018. X-ray micro-computed tomography (μ CT): an emerging opportunity in parasite imaging. *Parasitology*. **145**, 848–854.
- PAUWELS, E., D. van LOO, P. CORNILLIE, L. BRABANT a L. van HOOREBEKE, 2013. An exploratory study of contrast agents for soft tissue visualization by means of high resolution X-ray computed tomography imaging. *Journal of Microscopy*. **250**, 21–31.
- RITMAN, Erik L., 2011. Current status of developments and applications of micro-CT. *Annual Review of Biomedical Engineering*. **13**, 531–552.
- SAUER, R., L. MCSWAIN, A. S. BOWMAN a R. C. ESSENBERG, 1995. Tick salivary gland physiology. *Annual Review of Entomology*. **40**, 245–267.
- STARCK, J. Matthias, Lisa MEHNERT, Anja BIGING, Juliana BJARSCH, Sandra FRANZ-GUESS, Daniel KLEEBERGER a Marie HÖRNIG, 2018. Morphological responses to feeding in ticks (*Ixodes ricinus*). *Zoological Letters*. **4**, 20.

Contact address: Jaroslav Ondruš, MSc., Dpt. of Biology & Wildlife Diseases, FVHE UVPS Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, ondrusj@vfu.cz

Druhová skladba a detekcia hostiteľskej krvi pakomárikov *Culicoides* v zvernici s raticovou a pernatou zverou

Species composition and detection of host blood of *Culicoides* midges in wildpark with hoofed game and feather game

Kasičová Zuzana, Komorová Petronela, Schreiberová Andrea, Halán Miloš,
Kočišová Alica

Ústav parazitológie, Katedra epizootológie a parazitológie,
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Slovenská republika

Summary

In our study we followed the species composition and physiological state of *Culicoides* in the wildpark with hoofed game and feathered game. We have captured 1937 specimens of 14 species of *Culicoides*. The highest number was recorded in *C. obsoletus* / *C. scoticus*, namely 1470 individuals (90.24%). We have also confirmed a presence of the vectors of avian hemosporidia (*C. festivipennis* and *C. circumscriptus*). By using the PCR method based on a segment of the mitochondrial cytochrome b gene from engorged females of *C. obsoletus* / *C. scoticus*, *C. lupicaris*, *C. furcillatus* and *C. salinarius*. We have identified the host species *Lepus europaeus* (European Hare).

Keywords: *Culicoides*, blood meal, blood detection, cyt b

Úvod

Pakomáriky *Culicoides* sú malé dvojkrídlovce parazitujúce na rôznych druhoch zvierat. Sú vektormi protozoí, helmintov a vírusov (Mellor a kol., 2000). Ich vývinový cyklus pozostáva zo 4 štádií. Pre produkciu vajíčok je dôležité nacicanie sa samičky krvou hostiteľa, ktorá slúži ako zdroj proteínov potrebných pre produkciu vajíčok (Wittmann a Baylis, 2000). Faunu Slovenska tvorí doposiaľ 64 druhov zaznamenaných pakomárikov (Sarvašová a kol., 2017). Medzi skupiny pakomárikov s najvyššou abundanciou patria *Obsoletus* komplex (*C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi*) a *Pulicaris* komplex (*C. pulicaris*, *C. punctatus*, *C. newsteadi*, *C. lupicaris*, *C. bysta*).

Materiál a metódy

Druhovou skladbu pakomárikov *Culicoides* sme sledovali v zvernici s raticovou a pernatou zverou (48 ° 45'00 " N 21 ° 21'00 " E) počas dvoch sezón 2018 a 2019. Odchyt pakomárikov sme robili svetelným lapačom modelu CDC 1212 a konzervovali v 70% alkohole a uskladňovali pri teplote od 4 do 8 °C. Pakomáriky sme diagnostikovali podľa základných morfológických znakov podľa dostupných kľúčov (Mathieu a kol. 2012). Z nacicáných samičiek sme izolovali DNA diagnostickým kitom Qiagen blood & tissues (Nemecko). Na detekciu hostiteľskej krvi bola robená PCR metóda na základe segmentu mitochondriálneho génu (cyt b). Použili sme primery cyt bb 1 (5'-CCA TCM AAC ATY TCA DCA TGA TGA AA-3') a cyt bb 2 (5'-GCH CCT CAG AAT GAY ATT TGK CCT CA-3').

Výsledky

Počas dvoch sezón 2018 a 2019 sme diagnostikovali 1937 kusov 14 druhov pakomárikov *Culicoides* a to: *C. obsoletus/scoticus*, *C. punctatus*, *C. lupicaris*, *C. pulicaris*, *C. bysta*, *C. festivipennis*, *C. riouxi/C. segnis*, *C. clastieri*, *C. circumscriptus*, *C. salinarius*, *C. deltus*, *C. pictipennis*, *C. tauricus/C. slovacus*, *C. furcillatus*. (Tabuľka 1).

Tabuľka 1. Počet pakomárikov odchytených v rokoch 2018–2019.

Druh	2018	2019
<i>C. obsoletus/scoticus</i>	1470	279
<i>C. punctatus</i>	44	1
<i>C. lupicaris</i>	55	1
<i>C. pulicaris</i>	4	1
<i>C. byšta</i>	2	-
<i>C. festivipennis</i>	11	4
<i>C. riouxi/segnis</i>	3	-
<i>C. clastieri</i>	1	-
<i>C. circumscriptus</i>	1	1
<i>C. salinarius</i>	2	1
<i>C. deltus</i>	1	-
<i>C. pictipennis</i>	5	-
<i>C. tauricus/ slovacus</i>	28	-
<i>C. furcillatus</i>	22	-
Spolu	1649	288

Na PCR analýzu sme použili nacicané samičky pakomárikov *C. obsoletus/C. scoticus* (vzorka č. 1, 2, 3, 5), *C. lupicaris* (vzorka č. 4), *C. furcillatus* (vzorka č. 6), *C. salinarius* (vzorka č. 7). Samičky ostatných druhov pakomárikov nebolo možné vyšetriť, keďže neboli nacicané krvou. Výsledné produkty sme analyzovali na 1 % agarózovom géli (Obrázok 1). Veľkosť PCR produktu bola 350 bp. Zdrojom hostiteľskej krvi po sekvenácii bol druh *Lepus europeus* (Zajac poľný) vo všetkých vzorkách.



Obrázok 1: Vyhodnotenie PCR produktov na 1% agarózovom géli.

Diskusia

Doposiaľ sa cicaním pakomárikov *Culicoides* na hostiteľoch venovala menšia pozornosť v porovnaní s inými skupinami vektorov (Börstler a kol. 2018). Prežívavce boli hlavným zdrojom hostiteľskej krvi nacicaných samičiek pakomárikov *Culicoides* v Európe (Lassen a kol. 2012). Avšak, hostiteľmi môžu byť aj iné druhy cicavcov ako sú ľudia, kone, svine atď. V roku 2019 bol v zvernici nižší počet bažantov ako v roku 2018. Na druhej strane v roku 2019 bolo viac daždivých dní v porovnaní s predchádzajúcim rokom. Tieto faktory sa prejavili na abundancii pakomárikov, keďže v roku 2019 sme zaznamenali o 1361 kusov menej pakomárikov. Entomologické prieskumy v Holandsku, Nemecku, Francúzsku a Belgicku zaznamenali pakomáriky z *Obsoletus* komplexu za dominantné vo svojich štúdiách (Clausen a kol. 2009). To sa potvrdilo aj v našej práci, keďže sme zachytili 1749 kusov (90,29 %) druhu *C. obsoletus/ C. scoticus*.

Záver

V našom sledovaní sme potvrdili prítomnosť 14 druhov pakomárikov v zvernici s raticovou zverou. Zaznamenali sme prítomnosť druhov *C. festivipennis*, *C. salinarius*, *C. circumscriptus* a *C. pictinipennis*, ktoré sú vektormi hemosporídií. PCR analýzou sme zistili, že odchytené pakomáriky v našej štúdií parazitovali na cicavcoch druhu *Lepus europeus* (Zajac poľný).

Pod'akovanie

Táto práca realizovaná v rámci riešenia grantovej úlohy VEGA 1/0043/19.

Literatúra

BÖRSTLER, J.; JÖST, H.; GARMS, R.; KRÜGER, A.; TANNICH, E.; BECKER, N. Host-feeding patterns of mosquito species in Germany. *Parasit Vectors*. 2016, vol. 9, s. 318.

CLAUSEN, H.P.; STEPHAN, A.; BARTSCH, S.; JANDOWSKY, A.; HOFFMANN-KOHLER, P.; SCHEIN, E.; MEHLITZ, D.; BAUER, B. Seasonal Dynamics of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae, *Culicoides* spp.) on dairy farms of Central Germany during the 2007/2008 epidemic of bluetongue. *Parasitol. Res.* 2009, Vol. 105. s. 381–386.

LASSEN, S.B.; NIELSEN, S.A.; KRISTENSEN, M. Identity and diversity of blood meal hosts of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides* Laitreille) in Denmark. *Parasitol Vectors*. 2012, doi:10.1186/1756-3305-5-143.

MATHIEU, B.; CETRE-SOSSAH, C.; GARROS, C.; CHAVERNAC, D.; BALENGHIEN, T.; CARPENTER, S.; SETIER-RIO, M.L.; VIGNES-LEBBE, R.; UNG, V.; CANDOLFI, E.; DELÉCOLLE, J.C. Development and validation of IIKC: an interactive identification key for *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) females from the Western Palearctic region. *Parasites and Vectors*. 2012, Vol. 13.

MELLOR, P.S. ; BOORMAN, J. ; BAYLIS, M. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu. Rev. Entomology*. 2000, Vol. 45. s. 307–340.

SARVAŠOVÁ, A.; KOČIŠOVÁ, A.; CANDOLFI, E.; MATHIEU, B. Description of *Culicoides* (*Culicoides*) *bysta* n. sp., a new member of the *Pulicaris* group (Diptera: Ceratopogonidae) from Slovakia. *Parasites & Vectors*. 2017, vol. 10, s.1–14.

WITTMANN, E.J.; BAYLIS, M. Climate Changes: Effects on *Culicoides*-Transmitted Viruses and Implications for the UK. *The Veterinary Journal*. 2000, Vol. 160, s. 107–117.

Kontaktná adresa: Zuzana Kasičová, MVDr., Ústav parazitológie, Katedra epizootológie a parazitológie, UVLF Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika, zuzana.kasicova@student.uvlf.sk

Vliv probiotik na imunitní odpověď pstruha duhového

Influence of probiotics on the immune response in rainbow trout

^{1,2}Minářová Hana, ^{1,3}Palíková Miroslava, ³Mareš Jan, ²Kudláčková Hana,
²Pojezdal Lubomír, ^{1,2}Hodkovicová Nikola, ²Machát Radek, ⁴Blahová Jana,
⁵Mudroňová Dagmar, ²Faldyna Martin

¹Ústav ekologie a chorob zooloživřat, zvěře, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Česká republika

²Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno, Česká republika

³Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, ČR

⁴Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Česká republika

⁵Katedra mikrobiologie a imunologie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Slovensko

Summary

Probiotics are widely used to stimulate the fish immune response and increase resistance to diseases. In this study, the effect of continual and cyclic feed supplementation of probiotics on the immune response was investigated. Head kidney samples were taken, and the lymphocyte transformation test was performed. This method was also applied to the samples taken after the subsequent experimental challenge with *Aeromonas salmonicida*, and to the samples taken after vaccination with a commercial vaccine against *Yersinia ruckeri*. In the latter, in addition to non-specific stimulation, the cells were also specifically stimulated with the antigen isolated from the vaccine. Plasma levels of specific antibodies were also measured. With both specific and non-specific stimulation, the proliferative response increased with time. No statistically significant effect of probiotic supplementation on lymphocyte proliferation was observed, the groups fed with probiotics showed only slightly higher response to specific stimulation after vaccination compared to the control. However, a significant increase in levels of specific antibodies was observed in the probiotic-fed groups after vaccination.

Keywords: *Lactobacillus*; *Oncorhynchus mykiss*; *Aeromonas salmonicida*; vaccine; proliferation

Úvod

Výživa je jedním ze základních faktorů ovlivňujícím zdraví ryb. Imunitní systém a odolnost ryb vůči patogenům je možné podpořit krmnými aditivy, především probiotiky či imunostimulanty. V současné době je jejich použití velice časté v souvislosti se snahou o omezení aplikace antibiotik a jejich nahrazení přírodními látkami. Probiotika působí na nespecifickou i specifickou imunitní odpověď a na střevní mikroflóru (Wu et al., 2017; Chauhan & Singh, 2019), jejich pozitivní účinky jsou však stále předmětem diskuzí. U probiotik je zásadní i jejich dávkování, předávkování může vést k imunosupresi (Sakai, 1999). Bakterie *Aeromonas salmonicida* způsobující furunkulózu je častým původcem onemocnění v chovech lososovitých ryb a příčinou značných ekonomických ztrát. Dalším významným patogenem pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) je i bakterie *Yersinia ruckeri* způsobující bakteriální hemoragickou septikémii. K posouzení vlivu probiotik na aktivitu imunitního systému mohou být využity experimentální infekce (Fečkaninová et al., 2017) či vakcinace (Soltani et al., 2019). Cílem této studie bylo ověření vlivu kontinuálního a cyklického přídavku probiotik v krmivu na imunitní systém ryb s následnou experimentální infekcí *A. salmonicida*. U další skupiny ryb byl rovněž posouzen vliv na specifickou aktivaci imunitního systému po vakcinaci komerční vakcínou proti *Y. ruckeri*.

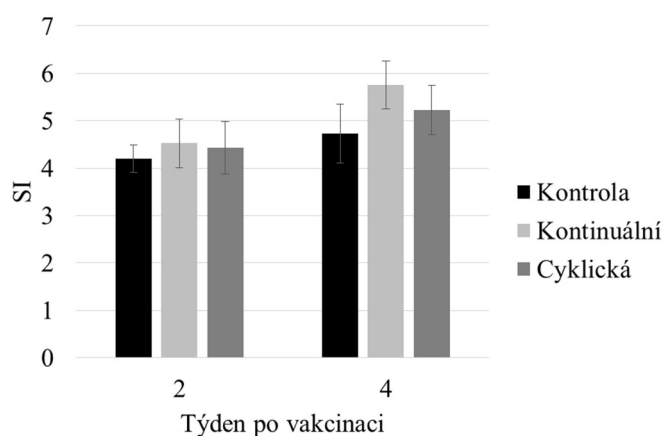
Materiál a metody

Pstruzi duhová (*Oncorhynchus mykiss*) byli rozděleni do tří skupin v duplikátech – kontrola, kontinuální a cyklická administrace probiotik v krmivu (celkem šest nádrží o objemu 1000 litrů

v recirkulačním systému na Mendelově univerzitě v Brně). Ryby měly po 14 dnech adaptace průměrnou hmotnost $108,90 \pm 14,88$ g a celkovou délku $18,85 \pm 0,94$ cm ($395,60 \pm 77,02$ g a $27,54 \pm 1,66$ cm na konci experimentu). Voda měla průměrnou teplotu $17,87$ °C, nasycení kyslíkem $8,08$ mg/l ($87,54$ %), pH $7,00$, $N-NH_4^+$ $0,69$ mg/l, $N-NO_2^-$ $0,18$ mg/l a Cl^- $126,73$ mg/l. Ryby byly krmeny třikrát denně (v dávce $2,68$ % hmotnosti ryb) komerčním krmivem firmy Biomar. Na povrch granulí byl nanesen autochtonní probiotický kmen *Lactobacillus* spp. (10^7 – 10^8 KTJ/g) izolovaný z trávicího traktu zdravých pstruhů. Vzorky byly odebrány po 7 týdnech od začátku krmného experimentu. Následně byla část ryb převezena na Veterinární a farmaceutickou univerzitu v Brně, kde proběhla experimentální infekce *Aeromonas salmonicida* (kmen 89409; $7,33 \times 10^5$ v 1 ml imerze po dobu 30 minut) s odběry po 1 a 3 týdnech. U zbylé části ryb byla provedena vakcinace koupelí proti *Yersinia ruckeri* (AQUAVAC® RELERA™) s odběry po 2 a 4 týdnech. Z každé skupiny byly odebrány vzorky z 10 ryb (celkem 30) s výjimkou odběrů po infekci vzhledem ke zvýšené mortalitě ($n = 5$ – 8). Vzorky hlavové ledviny byly za sterilních podmínek protlačeny sítkem a dvakrát propláchnuty odstředěním v PBS (fosfátový pufr; 10 min, 450 g). Mononukleární buňky byly následně izolovány centrifugací na denzitním gradientu (Percoll; 40 min, 800 g), propláchnuty, spočítány a resuspendovány v kultivačním médiu (L-15 s přidavkem antibiotik) na požadovanou koncentraci (4×10^5 buněk/jamku). Buněčná suspenze byla napipetována v triplikátech do 96-jamkové mikrotitrační destičky společně s inaktivovaným fetálním bovinním sérem (10 %) a mitogenem (100 µg/ml fytohemaglutinin) v celkovém objemu 200 µl. Po vakcinaci byly buňky kromě nespecifické stimulace stimulovány i antigenem izolovaným z použité vakcíny. Po uplynutí inkubační doby (6 dnů, 15 °C) byla proliferační aktivita buněk vyhodnocena pomocí komerčního ELISA kitu (BrdU; Roche), a byly vypočteny stimulační indexy (SI) – poměry stimulovaných a nestimulovaných buněk (negativní kontrola bez mitogenu). U vakcinovaných ryb byly rovněž odebrány vzorky plazmy a změřeny hladiny specifických protilátek proti *Y. ruckeri* (ELISA).

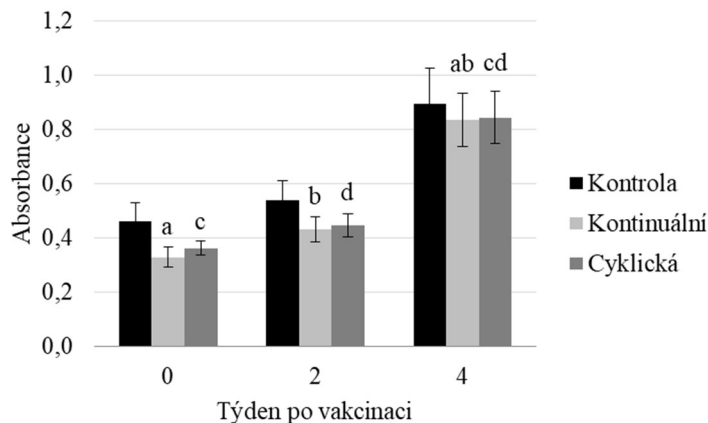
Výsledky a diskuze

V rámci celého experimentu byl pozorován nárůst proliferační aktivity lymfocytů s časem, který pravděpodobně souvisí se stářím ryb a rozvojem jejich imunitního systému. Mezi jednotlivými krmnými skupinami nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly ani v případě experimentální infekce či vakcinace. V případě specifické stimulace byl však nárůst aktivity imunitního systému po vakcinaci výraznější u skupin s přidavkem probiotik v krmivu ve srovnání s kontrolou (Graf 1).



Graf 1: Proliferační aktivita lymfocytů – specifická stimulace po vakcinaci.

V předchozích studiích byl popsán pozitivní vliv probiotik během infekcí způsobených bakterií *Aeromonas salmonicida* (Fečkaninová et al., 2017). V našem experimentu byly na počátku infekce u nestimulovaných buněk skupin s přidavkem probiotik naměřeny poměrně vysoké hodnoty proliferace, což může značit vyšší aktivitu jejich imunitního systému. Po vakcinaci byl u skupin krmených probiotiky pozorován statisticky významný nárůst hladiny protilátek 2 týdny po vakcinaci (Graf 2). Byl tedy zaznamenán pozitivní vliv probiotik na specifickou imunitní odpověď. Pozitivní efekt probiotik po vakcinaci proti *Yersinia ruckeri* pozoroval u pstruha duhového i Soltani et al. (2019).



Graf 2: Specifické protilátky.

Závěr

Během této studie nebyl prokázán statisticky významný vliv přidavku probiotik v krmivu na proliferaci lymfocytů, byl však zaznamenán pozitivní vliv na produkci protilátek po vakcinaci.

Poděkování

Tato studie vznikla v rámci projektu PROFISH CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000869, který je podpořený z Evropského fondu pro regionální rozvoj v rámci operačního programu VVV MŠMT.

Literatura

- CHAUHAN, A.; SINGH, R. Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach. *Symbiosis*. 2019, vol. 77, s. 99–113.
- FEČKANINOVÁ, A.; KOŠČOVÁ, J.; MUDROŇOVÁ, D.; POPELKA, P.; TOROPILOVÁ, J. The use of probiotic bacteria against *Aeromonas* infections in salmonid aquaculture. *Aquaculture*. 2017, vol. 469, s. 1–8.
- SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. 1999, vol. 172, s. 63–92.
- SOLTANI, M.; PAKZAD, K.; TAHERI-MIRGHAED, A.; MIRZARGAR, S.; SHEKARABI, S.P.H.; YOSEFI, P.; SOLEYMANI, N. Dietary Application of the Probiotic *Lactobacillus plantarum* 426951 Enhances Immune Status and Growth of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Vaccinated Against *Yersinia ruckeri*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2019, vol. 11, s. 207–219.
- WU, R.Y.; JEFFREY, M.P.; JOHNSON-HENRY, K.C.; GREEN-JOHNSON, J.M.; SHERMAN, P.M. Impact of prebiotics, probiotics, and gut derived metabolites on host immunity. *LymphoSign Journal*. 2017, vol. 4, s. 1–24.

Kontaktní adresa: Hana Minářová, MVDr., Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H16003@vfu.cz

Teplotně závislá proliferace netopýřích makrofágů jako indikátor vrozené imunity

Temperature-dependent proliferation of bat macrophages as an indicator of innate immunity

¹Němcová Monika, ¹Seidlová Veronika, ²Zukal Jan, ¹Pikula Jiří

¹Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Česká republika

²Ústav biologie obratlovců Akademie věd ČR, v. v. i., Brno, Česká republika

Summary

Macrophages are an important part of the non-specific mechanisms of the immune system. The main role of these cells is eliminate foreign particles by phagocytosis. A number of macrophages therefore play an important role in maintaining animal health. However, the number of blood cells, including monocytes as macrophages precursors, as well as function of other components of the immunity, varies depending on the intensity of the metabolism. Bats are characterized by significant changes in metabolic intensity, including body temperature. Therefore, the aim of this study was determinate proliferation of bat derived macrophage cell line. Cells were cultured at three different temperatures to simulate bats body temperature during hibernation (8 °C), daily torpor (17.5 °C) and euthermia (37 °C). Number of viable cells was established each 24 h for 6 days. This study demonstrate, bat macrophage cell line can proliferate at low temperatures, but the growth is significantly lower than at 37 °C. However, at low temperatures cells develop according to the same pattern and differ only in the distribution of macrophages. At 8 °C the cells develop almost only in suspension and at 17.5 °C the number of adherent cells increases. Thus, our results show that macrophages can survive conditions of decreased body temperature and are prepared to protect the body from pathogenic agents during metabolic depression period and immediately after entry into the euthermia.

Keywords: macrophage cell line; proliferation; hibernation; immunity suppression

Úvod

Netopýrovití patří mezi jediné savce schopné aktivního letu. Tato schopnost je však spojena s vysokou metabolickou rychlostí. Z důvodu úspory energie se v průběhu evoluce u některých druhů vyvinula schopnost vědomě měnit intenzitu metabolismu včetně tělesné teploty. U netopýřů mírného pásma, tak můžeme pozorovat každoroční cykly spojené s hibernací, během zimního období a tzv. denním torporem, během období aktivity (Geiser a Ruf, 1995). Pokles intenzity metabolismu však oproti mnohým výhodám nese i určitá rizika. Během období snížené tělesné teploty dochází k poklesu funkcí imunitního systému (Bouma, 2010). Klesá například počet bílých krevních buněk, včetně monocytů (Kuznetsová, 2016), které jsou prekurzory makrofágů. Makrofágy přitom hrají důležitou roli v eliminaci cizorodých částic pomocí fagocytózy (Mandal, 2019). Dochází rovněž ke změnám buněčného metabolismu, což lze sledovat díky buněčným kulturám. Právě experimentální sledování na úrovni buněk pomocí *in vitro* metod má v dnešní době velký potenciál nejen z hlediska vědeckého, ale i co se týče otázky etického cítění (Vejražka, 2008) a legislativy. Netopýři se totiž řadí mezi kriticky ohrožené druhy a jsou přísně chráněni právními předpisy České republiky (Zákon č. 114/1992).

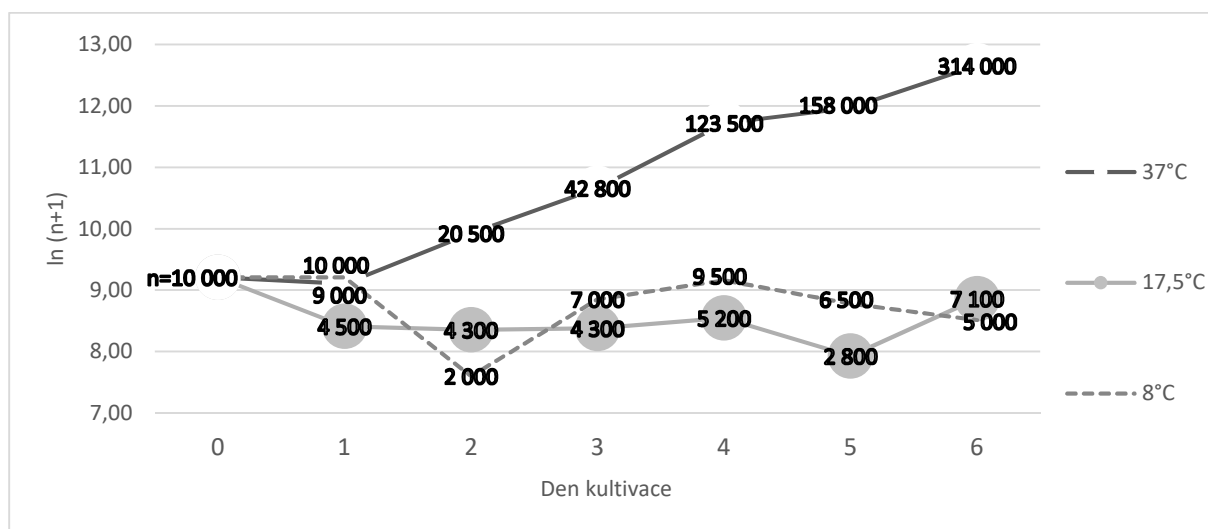
Materiál a metodika

Pro experimenty byla použita buněčná linie netopýřích makrofágů získána a immortalizována postupem, který uvádí He *et al.*, 2014. Během experimentu byly buňky kultivovány v médiu DMEM-F12 1:1 s přidavkem 10 % fetálního bovinního séra a penicilinu 100 IU/ml a streptomycinu 100 µg/ml (Biosera, Boussens, France) při 5% obsahu CO₂ v atmosféře. Buňky

byly vystaveny třem různým kultivačním teplotám, které měly simulovat podmínky organismu netopýrů, a to během intenzivního metabolismu (37 °C) a útlumu během hibernace (8 °C) nebo denní strnulosti (17,5 °C) (Geiser a Ruf, 1995). Po třech dnech kultivace bylo staré médium vyměněno za nové. Test začal s 10 000 buňkami v jedné jamce v 6-jamkových destičkách. Buňky byly počítány každých 24 hodin po dobu 6 dní. Buňky byly počítány v počítačích mřížkách vždy ve 4 opakováních (4 jamkách). Buňky adherované ke kultivačnímu povrchu a buňky volně v suspenzi byly počítány zvlášť. Za živé buňky byly považovány pouze ty, které měly během počítání kulatý tvar.

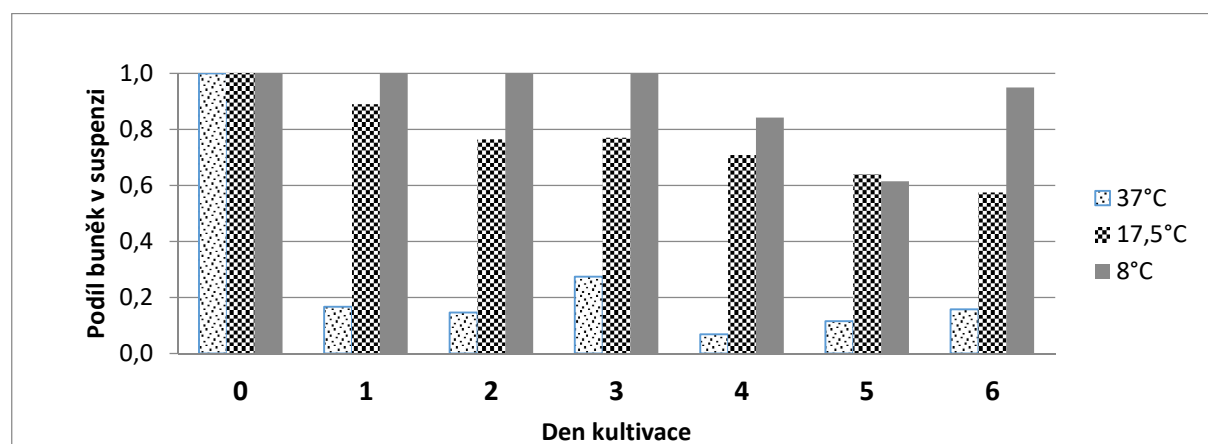
Výsledky

Celkový počet kultivovaných buněk byl statisticky významně ovlivněn inkubační teplotou. Teplota 37 °C vedla k nejvyšší rychlosti růstu kultury (Graf I).



Graf I. Vývoj počtu buněk při kultivaci ve sledovaných teplotách.

Buňky (adherované k povrchu vs. volně v suspenzi) se vyvíjely při různých kultivačních teplotách odlišným způsobem (Graf II). Při teplotě 8 °C se buňky vyvíjely téměř pouze v suspenzi a jen malé množství bylo adherované k povrchu kultivační destičky. Při teplotě 17,5 °C počet buněk v suspenzi kontinuálně klesal.



Graf II: Podíl buněk v suspenzi při kultivaci ve sledovaných teplotách.

Diskuze

In vitro testování je založeno na simulaci podmínek uvnitř organismu. Nejrychlejší růst jsme sledovali při teplotě 37 °C, podobně jako u buněčných kultur jiných savčích druhů (Stephenson, 1966). Je zřejmé, že pokud je metabolismus aktivní, všechny metabolické procesy, včetně proliferace a remodelace tkání, jsou také plně aktivní (Carey *et al.*, 2003). Nízké teploty mohou indukovat některé morfologické změny v b. kultuře. V optimálních kultivačních podmínkách (v této studii 37 °C), buňky adherují k povrchu kultivačních desek. V nižších teplotách zůstávají buňky v suspenzi a kulatém tvaru (Tamura *et al.*, 2006).

Závěr

Počet leukocytů, včetně monocytů jako prekurzorů makrofágů, během hibernace klesá. Proto je i počet makrofágů ve srovnání s aktivním metabolismem nižší (Kuznetsová, 2016). Makrofágy jsou však schopny podmínky snížené tělesné teploty přežít *in vivo* (Maniero, 2005) a podle našich výsledků rovněž *in vitro*, a mohou tak být připraveny chránit organismus proti patogenům okamžitě po probuzení ze stavů strnulosti (Bouma, 2010; Carey *et al.*, 2003).

Poděkování

Poděkování patří Interní grantové agentuře VFU Brno za poskytnutý příspěvek (IGA VFU Brno 221/2019/FVHE), bez něhož by tato studie nemohla vzniknout.

Literatura

- BOUMA, H. R., et al. Hibernation: the immune system at rest? *Journal of leukocyte biology*, 2010, 88.4: 619-624.
- CAREY, H. V., et al. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiological reviews*, 2003, 83.4: 1153-1181.
- GEISER, F. and RUF, T. Hibernation versus daily torpor in mammals and birds: physiological variables and classification of torpor patterns. *Physiological Zoology*, 1995, 68.6: 935-966.
- HE, X., et al. Establishment of *Myotis myotis* cell lines-model for investigation of host-pathogen interaction in a natural host for emerging viruses. *PloS one*, 2014, 9.10.
- KUZNETSOVA, E. V., et al. Seasonal changes in blood cells and biochemical parameters in the Mongolian hamster (*Allocricetulus curtatus*). *Biology Bulletin*, 2016, 43.4: 344-349.
- MANDAL, A. [online] Macrophage Function, News medical life sciences, dostupné z: <https://www.news-medical.net/life-sciences/Macrophage-Function.aspx>, [5. 4. 2020].
- MANIERO, G. D. Ground squirrel splenic macrophages bind lipopolysaccharide over a wide range of temperatures at all phases of their annual hibernation cycle. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 2005, 28.4: 297-309.
- STEPHENSON, N. G. Effects of temperature on reptilian and other cells. *Development*, 1966, 16.3: 455-467.
- TAMURA, Y., et al. Neuroprotective effects of hibernation-regulating substances against low-temperature-induced cell death in cultured hamster hippocampal neurons. *Brain research*, 2006, 1108.1: 107-116.
- VEJRAŽKA, M. *Buněčné kultury. Molekulární medicína a biotechnologie: soubor přednášek. 1. vyd. Praha: Galén pro I. LF UK v Praze. ISBN 978-807262-535-2, 2008.*

Kontaktní adresa: Monika Němcová, Mgr., Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H18002@vfu.cz

Hematologické a biochemické parametry u vybraných druhů netopýrů z oblasti Palearktu

Haematological and biochemical parameters in selected species of bats from the Palearctic

¹Kubičková Aneta, ¹Heger Tomáš, ¹Kaňová Miroslava, ¹Linhart Petr,
¹Němcová Monika, ¹Píkula Jiří, ¹Sedláčková Jana, ¹Seidlová Veronika, ²Zukal Jan,
¹Band'ouchová Hana

¹Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Česká republika
²Ústav biologie obratlovců, Akademie věd ČR, Brno, Česká republika

Summary

The aim of this study was to evaluate haematological and biochemical parameters in two sibling species of bats; Greater Mouse-eared bat and Lesser Mouse-eared bat. The total of 53 females were caught and sampled during the hibernation and swarming period and the impact of species and physiological status on blood parameters was assessed.

Keywords: *Myotis myotis*; *Myotis blythii*; hibernation; swarming; blood parameters

Úvod

Netopýři představují velmi specifickou skupinu savců a podléhají přísné ochraně. V rámci péče o tyto živočichy v záchranných centrech je potřeba znát referenční hodnoty hematologických a biochemických parametrů. Tyto hodnoty však u klinicky zdravých hmyzožravých netopýrů v podstatě nejsou k dispozici. V současnosti jsou netopýři v centru pozornosti zejména jako rezervoár velkého množství patogenů, zejména RNA virů, ale i bakterií, parazitů a plísní (Calisher et al., 2006; Mühlendorfer, 2013). Specifikem této skupiny savců jsou fyziologické adaptace, které jim v oblasti mírného pásma umožňují se vyrovnat se změnami klimatických podmínek během roku. Kromě aktivního letu, je to především schopnost řízeně snížit aktivitu metabolismu v průběhu zimy, kdy není k dispozici hmyz, potravní zdroj hmyzožravých netopýrů. Stav hibernace sestává ze série torporů, které jsou v asi dvoutýdenních intervalech přerušovány krátkou periodou buzení. Tento hypometabolický stav umožňuje šetření nasbírané energie z období před hibernací, ale rovněž je provázen celou řadou fyziologických změn, které se mohou odrážet i v hematologických a biochemických parametrech krve (Bouma et al., 2010). Cílem této práce je ověření vlivu druhové příslušnosti a metabolického stavu na vybrané hematologické a biochemické ukazatele.

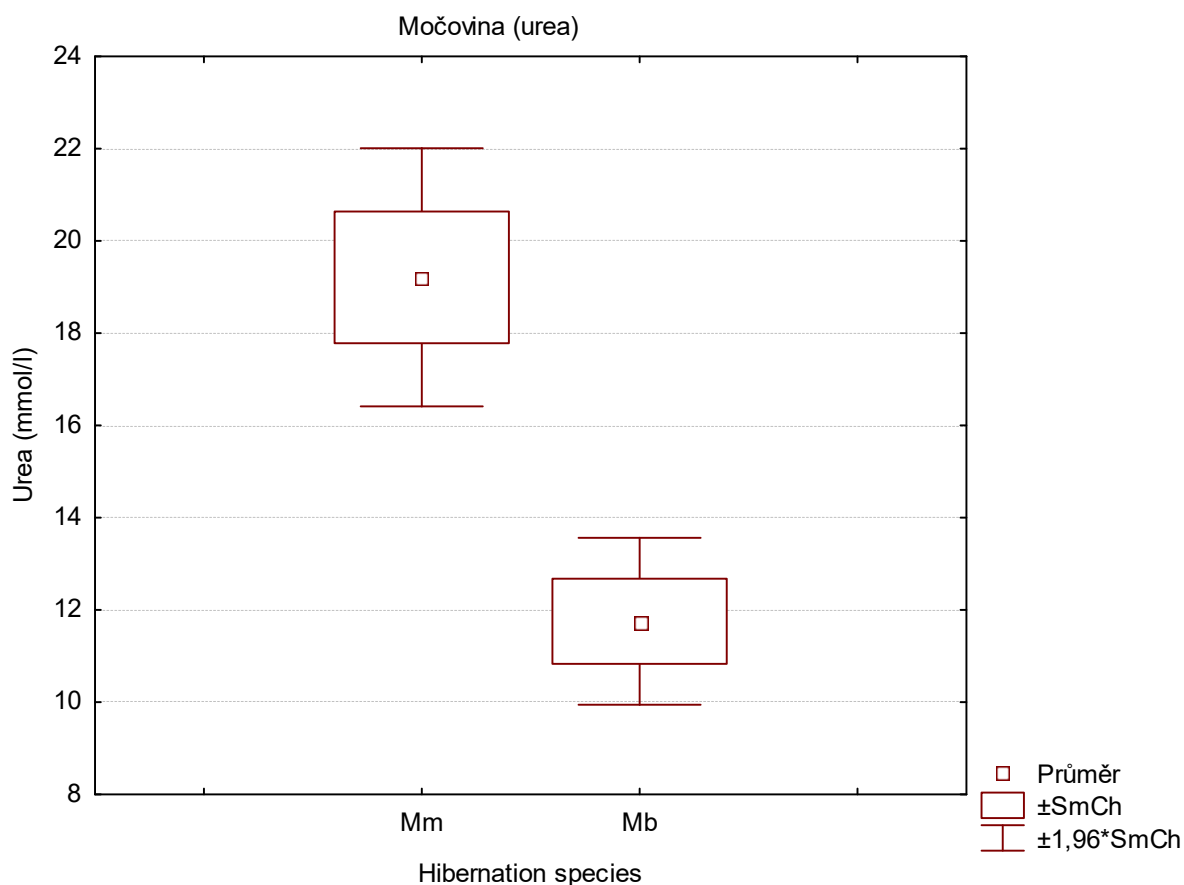
Materiál a metody

V ČR byly odebrány vzorky krve netopýrů, kteří byli odchyceni pomocí nárazových sítí v rámci odchytů, které provedli pracovníci Ústavu biologie obratlovců AV ČR (povolení AOPK ČR č.j. 01662/MK/2012 S/00775/MK/2012, č.j. 866/JS/2012). Odběr vzorků v dalších zemích probíhal na základě povolení č. 645 / 13.08 / 2015, 153 / 11.07 / 2016, WPN-I-6205.10.2015.AI a usnesení č. 14/2018. Na konci hibernace jsme odebrali vzorek krve od netopýrů velkých (*Myotis myotis*) z Polska (n=9) a netopýrů východních (*Myotis blythii*) z Arménie (n=20) a během swarmingu odchycených netopýrů velkých z ČR (n=12) a netopýrů východních z Bulharska (n=12). Do studie byly zařazeny pouze samice, protože na některých lokalitách nebyli odchyceni žádní samci. Netopýřům byl odebrán vzorek krve z *v. saphena*, místo odběru bylo ošetřeno tkáňovým lepidlem, aby nedošlo k nechtěným ztrátám krve. Před vypuštěním byly netopýřům doplněny tekutiny a energie perorální aplikací roztoku glukózy. Biochemické parametry krve byly zpracovány přímo v terénu mobilním biochemickým analyzátozem

VetScan iSTAT 1 (Abaxis, USA). Byly změřeny následující parametry: Na⁺, K⁺, Cl⁻, tCO₂, pCO₂, HCO₃⁻, pH, acidobazická rovnováha, močovina, glukóza, hemoglobin a hematokrit. Získané výsledky byly zpracovány pomocí programu Statistica pro Windows. Vzorky byly odebrány celkem od 53 samic výše zmíněných dvou sesterských druhů netopýrů.

Výsledky

V rámci analýzy výsledků měření krevních parametrů byla ověřena normalita dat. Data s normálním rozdělením byla hodnocena pomocí nepárového t-testu a v případě močoviny i pomocí ANOVA. Nenormálně rozložená data byla hodnocena pomocí Kruskal-Wallis ANOVA. Vliv druhu na krevní parametry byl zjištěn pouze u močoviny, kde byly zjištěny vyšší hodnoty u netopýra velkého ($p=0,009$). U dat získaných během swarmingu a na konci hibernace byly zjištěny rozdíly u většiny parametrů. V případě draslíku, chloridů a močoviny byly ve srovnání se swarmingem v rámci hibernace zjištěny nižší hodnoty ($p<0,001$), v případě pCO₂ ($p=0,002$), tCO₂, HCO₃ a BE ($p<0,001$) byly zjištěny v rámci hibernace hodnoty vyšší. U močoviny byl následně testován vliv obou faktorů (druh, fyziologický status). Vliv druhu na tento parametr byl zjištěn pouze v rámci období hibernace ($p<0,001$).



Graf 1. Vliv druhu netopýra na hodnoty močoviny v krvi odebrané na konci hibernace (Mm – netopýr velký (*Myotis myotis*), Mb – netopýr východní (*Myotis blythii*), $p<0,001$).

Diskuze

Netopýr velký (*Myotis myotis*) a netopýr východní (*Myotis blythii*) jsou sesterské druhy s podobnou stavbou těla i způsobem života (Arlettaz et al., 1997). Dokazují to i naše výsledky, které v podstatě kromě rozdílů v hodnotách močoviny neprokázaly žádné další odlišnosti v hodnotách krevních parametrů. Naopak zásadní rozdíly byly zjištěny mezi vzorky

odebranými na konci hibernace a během swarmingu (podzimního rojení). Zdá se tedy, že fyziologické změny v průběhu roku významně ovlivňují krevní parametry stejně jako je tomu i u jiných savců, kteří využívají torpor (Franco et al., 2013). Zejména jsme zjistili rozdíly v parametrech acidobazické rovnováhy a s nimi souvisejících iontech. Jediný parametr, který byl ovlivněn také druhem netopýra, byla močovina. Při důkladné analýze jsme však zjistili, že tento vliv se uplatňuje pouze během hibernace. Domníváme se tedy, že zde mohou hrát roli i podmínky na konkrétním zimovišti, protože mikroklima na obou lokalitách se významně lišilo. Pokud vezmeme období swarmingu jako dobu, kdy se netopýři nachází ve fyziologickém stavu, srovnatelném s ostatními teplokrevnými savci, pak je třeba jako změněné hodnotit výsledky z období hibernace. Změny, které jsou v krvi hibernujících zvířat ve srovnání se swarmingem patrné, s největší pravděpodobností odpovídají posthyperkapnické kompenzaci respirační acidózy. Ta je způsobena sníženou dechovou frekvencí a hromaděním CO₂ a následně organismus reaguje kompenzací této acidózy zvýšením hladiny bikarbonátu a množství bazí (Banga a Khilnani, 2009). Vzhledem k této kompenzaci je tak udržováno stabilní pH a tudíž jsme u tohoto parametru nezjistili rozdíl oproti swarmingu.

Závěr

Naše výsledky ukazují, že v rámci blízkce příbuzných druhů netopýřů s podobnou ekologií je zřejmě možné využívat případné referenční hodnoty bez ohledu na druh. Pokud tedy pro jeden druh budou referenční hodnoty známe, lze je aplikovat i na jiné blízkce příbuzné druhy. Co je však nutné zohlednit je období, kdy je netopýř odchycen, protože změny spojené s ročním obdobím mají výrazný vliv na řadu krevních parametrů.

Poděkování

Práce byla financována v rámci projektu IGA 239/2015/FVHE a grantu GA ČR č. 17-20286S.

Literatura

CALISHER, C. H.; CHILDS, J. E.; FIELD, H. E.; HOLMES, K. V.; SCHOUNTZ, T. Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006, vol. 19, no. 3, s. 531-545.

MÜHLDORFER, K. Bats and Bacterial Pathogens: A Review. *Zoonoses and Public Health*. 2013, vol. 60, s. 93-103.

BOUMA HR, STRIJKSTRA AM, BOEREMA AS, DEELMAN LE, EPEMA AH, HUT RA, KROESE FG, HENNING RH. Blood cell dynamics during hibernation in the European Ground Squirrel. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2010, vol. 136, s. 319-323.

ARLETTAZ, R.; PERRIN, N.; HAUSSER, J. Trophic resource partitioning and competition between the two sibling bat species *Myotis myotis* and *Myotis blythii*. *Journal of Animal Ecology*, 1997, vol. 66, s. 897-911

Franco, M.; Contreras, C.; Nespolo, R. F. Profound changes in blood parameters during torpor in a South American marsupial. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2013, vol. 166, no. 2, s. 338–342.

BANGA, A.; KHILNANI, G. C. Post-hypercapnic Alkalosis is Associated with Ventilator Dependence and Increased ICU stay. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 2009, vol. 6, s. 437–440.

Kontaktní adresa: Aneta Kubičková, Mgr., Ústav ekologie a chorob zoolivních zvířat, zvěře, ryb a včel, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H18376@vfu.cz

Phagocyte activity reflects mammalian homeo- and hetero-thermic physiological states

¹Heger Tomáš, ¹Band'ouchová Hana, ¹Seidlová Veronika, ¹Němcová Monika, ¹Papežíková Ivana, ¹Piaček Vladimír, ²Zajíčková Renata, ^{2,3}Zukal Jan, ¹Pikula Jiří

¹Dpt. of Ecology & Diseases of Zooanimals, Game, Fish and Bees,

University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

²Institute of Vertebrate Biology of the Czech Academy of Sciences v.v.i, Brno, Czech Republic

³Department of Botany and Zoology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Summary

To better understand innate immunity mediated by phagocytes in bats, we measured respiratory burst and haematology and blood chemistry parameters in heterothermic bats (*Myotis myotis*) and (*Nyctalus noctula*) and homeothermic laboratory mice (*Mus musculus*). Bats displayed similar electrolyte levels and time-related parameters of phagocyte activity, but differed in blood profile parameters related to metabolism and red blood cell count. Greater mouse-eared bats differed from mice in all phagocyte activity parameters and had the lowest phagocytic activity overall, while noctules had the same quantitative phagocytic values as mice. Our comparative data indicate that phagocyte activity reflects the physiological state and blood metabolic and cellular characteristics of homeothermic and heterothermic mammals

Keywords: bat; torpor; innate immunity; blood; phagocytosis; respiratory burst

Introduction

Phagocytosis is a protective mechanism linking innate and adaptive immune responses (Thomas DC, 2017). The primary function of phagocytes is to recognise, engulf and destroy pathogenic agents, infected or dead cells and foreign particles. Phagocytes produce potent microbicidal agents, such as reactive oxygen and nitrogen species (ROS, RNS), phagocytes gain energy from the catabolism of glucose and thereby considerably increase the uptake of oxygen (Thomas DC, 2017). Physiological characteristics associated with the role of low hibernation body temperature in phagocyte respiratory burst response include 1) a decrease in the level of blood glucose (Bandouchova *et al.*, 2018); 2) lowered oxygen availability for phagocyte respiratory burst due to lowered venous and arterial blood partial pressure of oxygen, a higher oxygen affinity to haemoglobin (Musacchia *et al.*, 1971), and long periods of apnoe (Geiser *et al.*, 2011); 3) torpor induced leukopenia/neutropenia (Bouma *et al.*, 2010); and 4) altered activity of complement factors (Hecht *et al.*, 2015).

In light of the above, heterotherms provide an interesting model for examining immune system function. Given that many parameters impacting phagocyte respiratory burst are altered during torpor, we predict lowered phagocyte respiratory burst performance in heterothermic animals compared with homeotherms. We performed a functional comparative study to confirm this by sampling blood from heterothermic bats (*Myotis myotis*), (*Nyctalus noctula*) and laboratory mice (*Mus musculus*), evaluating phagocyte activity in combination with standard haematology and blood chemistry as predictors of both time-related and quantitative parameters of respiratory burst.

Material and Methods

Eleven cave-hibernating bats (greater mouse-eared bat *Myotis myotis*) and 12 rock-crevice and/or tree-hole hibernating bats (common noctula *Nyctalus noctula*) were sampled soon after the hibernation period in 2018. Blood was also collected from the saphenous vein of 14 adult BALB/c laboratory mice without anaesthesia. Phagocyte RB activity was measured using

chemiluminescence enhanced by luminol (Papezikova *et al.*, 2016) The measuring temperatures were set at 25°C and 38°C to simulate variability in the physiological state of bats arousing and re-warming from hibernation torpor to homeothermy. An i-STAT portable clinical analyser for veterinary use (EC8+ diagnostic cartridge, Abaxis, Union City, CA, USA) was used to measure blood profile parameters based on electrochemical sensing technologies. Blood cell counts were enumerated using a Nihon Kohden MEK-5208K cell counter (Nihon Kohden Corporation, Tokyo, Japan). A Romanowsky-stained blood smear was prepared to count white blood cell differential. Based on the chemiluminescence data, we calculated the following fundamental respiratory burst parameters: time-to-start of response (T_{start}), time-to-peak response (T_{peak}), time-to-end of response (T_{end}), peak intensity (Peak) and total capacity (Integral, I). The total capacity value was also adjusted to the white blood cell count (Adjusted Integral, AI). Statistical analysis was performed in Statistica for Windows v. 13.3 or in R software using the support package mass.

Results and Discussion

Table 1. Differences in blood profile and phagocyte activity parameters measured in (*Myotis myotis*), (*Nyctalus noctula*) and laboratory BALB/C mice (*Mus musculus*).

Log-transformed variable	Analysis of variance								LSD post-hoc comparisons			Remark
	SS	df	MS	SS	df	MS	F	p	Mmyo vs Nnoc	Mmyo vs Mus	Nnoc vs Mus	
Hct (L/L)	0.27	2	0.14	0.04	33	0.00	101.31	0.000	0.021	< 0.001	< 0.001	Species-specific
Hb (g/L)	0.27	2	0.14	0.04	33	0.00	101.64	0.000	0.019	< 0.001	< 0.001	Species-specific
Na (mmol/L)	0.00	2	0.00	0.00	33	0.00	23.73	0.000	ns	< 0.001	< 0.001	Homeotherm differs from heterotherms
K (mmol/L)	0.22	2	0.11	0.07	33	0.00	52.81	0.000	ns	< 0.001	< 0.001	Homeotherm differs from heterotherms
Cl (mmol/L)	0.01	2	0.00	0.01	33	0.00	24.84	0.000	< 0.001	ns	< 0.001	Heterotherm species differ
Urea (mmol/L)	3.48	2	1.74	0.53	33	0.02	108.08	0.000	< 0.001	< 0.001	< 0.001	Species-specific
Glu (mmol/L)	0.99	2	0.49	0.38	33	0.01	42.41	0.000	< 0.001	0.005	< 0.001	Species-specific
tCO₂ (mmol/L)	0.01	2	0.00	0.13	32	0.00	1.16	0.327	ns	ns	ns	
WBC	0.51	2	0.25	1.09	33	0.03	7.72	0.002	0.007	ns	< 0.001	Heterotherm species differ
T_{start}	12.92	2	6.46	2.08	33	0.06	102.69	0.000	ns	< 0.001	< 0.001	Homeotherm differs from heterotherms
T_{peak}	2.60	2	1.30	0.13	33	0.00	328.98	0.000	< 0.001	< 0.001	< 0.001	Species-specific
T_{end}	0.07	2	0.04	0.17	32	0.01	7.07	0.003	ns	0.002	0.005	Homeotherm differs from heterotherms
Peak	1.49	2	0.74	3.28	33	0.10	7.47	0.002	0.013	< 0.001	ns	Heterotherm species differ
Integral	1.19	2	0.60	4.06	33	0.12	4.84	0.014	0.022	0.006	ns	Heterotherm species differ
Adjusted Integral	1.52	2	0.76	2.20	33	0.07	11.36	0.000	ns	< 0.001	0.002	Homeotherm differs from heterotherms

Legend: Hct = haematocrit, Hb = haemoglobin, Na = sodium, K = potassium, Cl = chloride, Urea = blood urea nitrogen, Glu = glucose, tCO₂ = total dissolved carbon dioxide, WBC = white blood cell count, T_{start} = time-to-start of phagocyte respiratory burst response, T_{peak} = time-to-peak of phagocyte respiratory burst response, T_{end} = time-to-end of phagocyte respiratory burst response, Peak = peak intensity of phagocyte respiratory burst, Integral = total phagocyte capacity, Adjusted Integral = total phagocyte capacity recalculated for the white blood

cell count; *Mmyo* = *Myotis myotis*, *Nnoc* = *Nyctalus noctula* and *Mus* = *Mus musculus*, *ns*=non-significant. Post-hoc comparisons were used to evaluate species-specific differences in parameters.

With the exception of total dissolved carbon dioxide (tCO₂), the three mammal species in this study differed in all blood profile and phagocyte respiratory burst parameters (Table 1), with post-hoc comparisons confirming species-specific differences in different parameters. The two bat species had similar electrolyte levels (Na, K) and time-related parameters of phagocyte activity (T_{start}, T_{end}), but differed in blood profile parameters related to metabolism (Urea, Glu) and red blood cell count (Hct, Hb) (Table 1). While heterothermic *N. noctula* bats had the same quantitative values (Peak, Integral) as laboratory mice, heterothermic *M. myotis* differed in all phagocyte activity parameters (Table 1).

In the present study, heterothermic bats displayed significantly lower blood glucose levels than the laboratory mice. Interestingly, a negative relationship between glucose and time-related phagocyte activity parameters was observed. This finding suggests either a low glucose level threshold for respiratory burst or a switch of fuel sources from carbohydrates to fatty acids in hypoglycaemic torpid bats (Hecht *et al.*, 2015).

Conclusion

In this study, we provide comparative functional data suggesting that phagocyte activity, as an essential mechanism of innate immunity, reflects the physiological state and blood metabolic and cellular characteristics of homeothermic and heterothermic mammals.

Acknowledgments

This study was supported by the Czech Science Foundation (Grant No. 17-20286S).

References

- Bandouchova H, Bartonicka T, Berkova H, Brichta J, Kokurewicz T, Kovacova V, *et al.* Alterations in the health of hibernating bats under pathogen pressure. *Sci Rep-UK*. 2018;8:6067.
- Bouma HR, Carey HV, Kroese FGM. Hibernation: the immune system at rest? *J Leukocyte Biol*. 2010;88:619-624.
- Geiser F. Hibernation: Endotherms in eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester (2011). doi:10.1002/9780470015902.a0003215.pub2
- Hecht AM, Braun BC, Krause E, Voigt CC, Greenwood AD, Czirják GÁ. Plasma proteomic analysis of active and torpid greater mouse-eared bats (*Myotis myotis*). *Sci Rep-UK*. 2015;5:16604.
- Musacchia X, Volkert W. Blood gases in hibernating and active ground squirrels: HbO₂ affinity at 6 and 38 C. *Am J Physiol*. 1971;221:128-130.
- Papezikova I, J. Mares, L. Vojtek, P. Hyrsl, Z. Markova, A. Simkova, J. Bartonkova, S. Navratil, and M. Palikova. 2016. Seasonal changes in immune parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and brook trout x Arctic charr hybrids (*Salvelinus fontinalis* x *Salvelinus alpinus alpinus*), *Fish Shellfish Immunol* 57:400–405.
- Thomas DC. The phagocyte respiratory burst: historical perspectives and recent advances. *Immunol Lett*. 2017;192:88-96.

Contact address: Tomáš Heger, MVDr., Dpt. of Ecology & Diseases of Zooanimals, Game, Fish and Bees, FVHE UVPS Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, heger4@gmail.com

The investigation of binding the conazole fungicide prothioconazole with human serum albumin. Spectroscopic approach.

¹Golianová Katarína, ²Jutková Annamária, ²Verebová Valéria, ^{2,3}Staničová Jana

¹Department of Biophysics, Faculty of Science, P.J. Šafárik University, Kosice, Slovak Republic

²Department of chemistry, biochemistry and biophysics, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Košice, Slovak Republic

³Department of Biophysics and Informatics, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Summary

The worldwide use of pesticides leads to massive effect on aquatic ecosystems and human health. This study is expected to provide an important insight to the interactions of transport protein human serum albumin with conazole fungicide prothioconazole (PTC). After exposure of the human body, fungicides penetrate into bloodstream, may interact with plasma proteins and induce some alteration of the protein structure and function. The binding of PTC with human serum albumin has been studied via spectroscopic methods including absorbance, fluorescence and circular dichroism.

Keywords: fungicide; interaction; human serum albumin

Introduction

Conazole fungicides, one category of broad spectrum fungicides, are widely applied in agriculture and medicine. The widespread use of conazoles has generated detrimental effect on aquatic ecosystems and human health (Prousek 2001). This study is expected to provide an important insight into the interaction of transport protein human serum albumin with conazole fungicide prothioconazole. Systemic fungicide prothioconazole (2-[2-(1-Chlorocyclopropyl)-3-(2-chlorophenyl)-2-hydroxypropyl]-1,2,4-triazole-3-thione) is a representative of triazoles developed to protect rice and wheat (2). Its mode of action is based on stopping production of new fungi spores and inhibits the biosynthesis of existing hostile cells (Dong et al. 2019).

Material and Methods

For the investigation of binding and thermodynamic parameters, spectroscopic methods have been used including: absorbance, fluorescence spectrophotometry and circular dichroism.

Results and Discussion

Prothioconazole slightly binds to HSA, but effectively quenches the fluorescence of albumin via static mechanism (Figure 1). In prothioconazole/HSA complex, the preferential binding occurs at site I of albumin and thermodynamic parameters indicate hydrogen bonds play the major role in binding (Xu and Ritieni 2007). Via alteration in three-dimensional fluorescence and circular dichroism spectral properties (not shown) it was concluded that prothioconazole could induce slight conformational and some microenvironmental changes in albumin molecule.

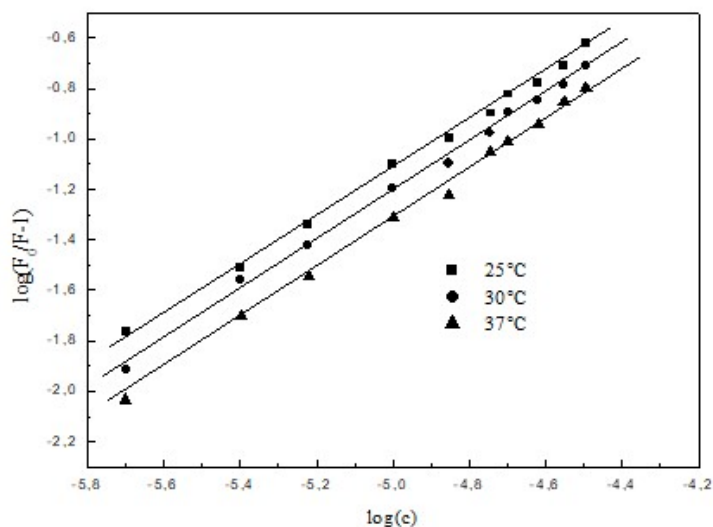


Figure 1. Hill plots of prothioconazole/HSA complex by three different temperatures.

Conclusion

Studies of the interaction between pesticides and target mammalian proteins are important steps toward an understanding of pesticide's toxicity. Our results show only slight binding conazole fungicide prothioconazole to HSA. The investigation of secondary structure show slight conformational changes after binding prothioconazole to HSA.

Acknowledgement

This work was supported by research grants from the Slovak Grant Agency VEGA No. 1/0176/16.

References

- PROUSEK, J., (2001). Rizikové vlastnosti látok. *STU Bratislava*, 247s.
- DONG, Xu, et al. (2019). Dissipation of prothioconazole and its metabolite prothioconazole-desithio in rice fields and risk assessment of its dietary intake. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67.23: 6458-6465.
- Xu, X.; Nicholson, P.; Ritieni, A., (2007). Effect of fungal interactions among *Fusarium* head blight pathogens on disease development and mycotoxin accumulation. *International journal of food microbiology*, 119.1-2:67-71

Contact address: Katarína Golianová, RNDr., Katedra Biofyziky, Ústav fyzikálnych vied, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Šrobárová 2, 040 01 Košice, katarina.zelonkova@student.upjs.sk

Editace:	prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D. doc. MVDr. Bohumíra Janštová, Ph.D. doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.
Název:	XXII. konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí. Sborník příspěvků
Ústav:	Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie
Počet stran:	158
Vydání:	1.
Rok vydání:	2020
Vydavatel:	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

ISBN 978-80-7305-846-3