

Závěrečné zprávy projektů ITA
realizovaných v roce 2021
prostřednictvím
Interní tvůrčí agentury VETUNI



VETUNI 2021

Vážení kolegové,

v roce 2021 úspěšně pokračovala činnost Interní tvůrčí agentury VETUNI (ITA VETUNI), jako jednoho z pilířů strategie rozvojového plánu tvůrčí činnosti na univerzitě. Aktivity ITA VETUNI a jejím prostřednictvím financovaných projektů pokračovaly přes překážky, které pro výzkumné aktivity, vědeckou spolupráci a kontakty představovala pokračující epidemie koronavirové infekce.

Agentura ITA je financována z prostředků MŠMT určených pro Dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace (DKRVO). Během třetího roku své existence financovala ITA celkem 12 projektů z obou fakult VETUNI a CEITEC VETUNI a umožnila tak vědeckým pracovníkům univerzity získat experimentální data a ověřovat vědecké hypotézy, které mohou být v budoucnosti rozpracovány do podoby projektů národních nebo mezinárodních grantových agentur.

Činnost Interní tvůrčí agentury VETUNI probíhá dle příslušné směrnice rektora VETUNI a je kontrolována komisí ITA VETUNI, složenou ze zástupců všech součástí univerzity. Tím je zaručena objektivita při rozdělování finančních prostředků na dlouhodobý koncepční rozvoj na VETUNI a jejich přidělování jednotlivým řešitelům.

Závěrečné hodnocení každého ročníku na konferenci ITA VETUNI je pak mechanismem kontroly správné realizace jednotlivých projektů ale také popularizace činnosti agentury v rámci univerzity. ITA VETUNI 2021 osvědčuje rozvoj vědecké a tvůrčí činnosti na univerzitě a je příkladem účelně investovaných finančních prostředků jako odpovědi univerzity na požadavek MŠMT o strategickém rozdělování prostředků určených na DKRVO.

Závěrem chci poděkovat všem členům Komise ITA VETUNI, sekretariátu VVZ a všem, kteří se zapojili do činnosti komise a úspěšné organizace letošní konference ITA VETUNI 2021.

prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.

prorektor pro vědu, výzkum a zahraniční vztahy
předseda Komise ITA VETUNI

Brno, prosinec 2021

Komise Interní tvůrčí agentury VETUNI

ITA VETUNI

prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.

předseda komise

prof. MVDr. Vladimír Večerek, CSc., MBA

místopředseda

Členové:

FVL doc. MVDr. Miša Škorič, Ph.D.

doc. MVDr. Markéta Sedlinská, Ph.D.

FVHE doc. MVDr. Petr Chloupek, Ph.D.

doc. MVDr. Josef Kameník, CSc., MBA

CEITEC prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.

prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.

Externí člen prof. MUDr. Petr Gál, Ph.D., MBA

Seznam projektů

ITA VETUNI řešených v roce 2021

Číslo projektu	Název projektu	Řešitel
2021ITA11	Infekční onemocnění zvířat chovaných ze záliby	prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.
2021ITA12	Komparativní genomika genů kódujících receptory přirozené imunity TLR u čeledi Equidae	prof. MVDr. RNDr. Petr Hořín, CSc.
2021ITA13	Diagnostika a léčba vybraných onemocnění a urgentních stavů zvířat zájmových chovů z pohledu aktuálních trendů ve veterinární medicíně.	doc. MVDr. Michal Crha, Ph.D.
2021ITA14	"Zdravotní poruchy u koní zaměřené na diagnostiku a prevenci atypické myopatie koní. Zvýšení efektivity aspirace ovariálních folikulů u skotu opakovaným výplachem. Zhodnocení metod extrakce spermií z varletní tkáně (TESE) u býků Diagnostika poruch metabolismu v intenzivních chovech skotu, jejich vliv na kvalitu kolostra a kolostrální imunitu, Vliv různých forem anestezie a analgezie na vybrané krevní parametry při kastraci selat v rámci zlepšení podmínek welfare "	doc. MVDr. Josef Illek, DrSc. Dipl. ECBHM
2021ITA15	Vliv antibiotik a nesteroidních antiflogistik na trávicí trakt a imunitní systém králíka	doc. MVDr. Vladimír Jekl, Ph.D., DipECZM
2021ITA21	Zoologická medicína: zdravotní problematika divokých zvířat, zvěře a ryb	prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D., dipl. ECZM

2021ITA22	Hodnocení úrovně ochrany a welfare zvířat ovlivněných lidskou činností	prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D.
2021ITA23	"Suplementace výživy a její dopad na zdravotní stav, parametry vnitřního prostředí a produkční ukazatele vybraných druhů hospodářských zvířat"	doc. MVDr. Radka Dobšíková, Ph.D.
2021ITA24	Vliv nanočástic začleněných do aktivních a biodegradabilních filmů a obalů na jejich funkční a technologické vlastnosti	doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.
2021ITA25	Vybrané mikrobiologické aspekty zdravotní nezávadnosti a kvality potravin a pokrmů	doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.
2021ITA26	Dynamické změny v biotopech – od radioizotopové zátěže, přes migrace zvířat, až k šíření nákaz.	prof. MVDr. Pavel Široký, Ph.D.
2021ITA31	One Health Concept a choroby domácích a volně žijících zvířat	prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2021
(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu: 2021ITA11

2. Název projektu: Infekční onemocnění zvířat chovaných ze záliby

3. Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.

Fakulta/celoškolské pracoviště: FVL, **Ústav infekčních chorob a mikrobiologie**

E-mail: celerv@vfu.cz

Telefon: 541562281

4. Řešitelský kolektiv:

složení řešitelského týmu: (akademičtí pracovníci a jejich příslušnost k ústavům nebo klinikám fakulty nebo výzkumným skupinám CEITEC, studenti DSP) a forma zapojení každého člena řešitelského týmu

Prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D., úvazek na FVL 1,0, 12 publikací za posledních 5 let, h index 11. úvazek na projektu 1.0

MVDr. Martina Masaříková, Ph.D., 21 publikací celkem, h-index 9, 12 publikací za posledních 5 let. úvazek na projektu 1.0

MVDr. Ludmila Kohoutová, úvazek 0,75; 9 publikací celkem, h index 5, 3 publikace za posledních 5 let. úvazek na projektu 1.0

MVDr. Dobromila Molinková, Ph.D., úvazek na FVL 1,0, 5 publikací za posledních 5 let, h index 1. úvazek na projektu 1.0

MVDr. Dana Lobová, Ph.D., úvazek na FVL 1,0, 3 publikace za posledních 5 let, h index 10. úvazek na projektu 1.0

Doc. MVDr. Miša Škorič, Ph.D. úvazek na FVL 1,0, 13 publikací za posledních 5 let, h index 12. úvazek na projektu 1.0

MVDr. Lucia Frgelecová, Ph.D. úvazek na FVL 1,0, 4 publikace za posledních 5 let, h index 4. úvazek na projektu 1.0

DSP studenti:

Mgr. Zuzana Úlehlová 2.ročník DSP

Mgr. Lucie Hrubá 1. ročník DSP

MVDr. Aneta Angelova 2. ročník DSP

5. V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu:

Tento návrh je společným projektem Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie a Ústavu patologické morfologie a parazitologie, Fakulty veterinárního lékařství. Do řešení projektu nejsou zapojeny další součásti VETUNI.

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Navrhovaný projekt zapadá do rámce výzkumu VETUNI stanoveného prioritami soutěže na projekty podporované prostřednictvím ITA VETUNI pro rok 2021, tj. problematika původců infekčních onemocnění a nálezů zvířat. Zároveň projekt zapadá rámcově do výzkumné činnosti řešitelského týmu složeného z pracovníků Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie a Ústavu patologické morfologie a parazitologie.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Cílem projektu bylo podpoření výzkumných aktivit Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie a Ústavu patologické morfologie a parazitologie ve výzkumné oblasti sledování vybraných patogenních původců u zvířat chovaných ze záliby. V případě předkládaného projektu se jednalo o bakteriální infekce ježků a dále o kalicivirové onemocnění koček. V obou případech budou v rámci projektu využity nejen tradiční ale především pokročilé diagnostické a analytické metody původců onemocnění, založených na analýzách genomů patogenů nebo jejich částí a následně doplněné o odpovídající patologicko-anatomické vyšetření.

Dílčí cíle projektu budou směřovány do následujících oblastí:

Dílčí cíl: Infekční onemocnění ježků se zoonotickým potenciálem

Cílem studie byl monitoring prevalence původců bakteriálních zoonóz osidlujících gastrointestinální systém ježků chovaných v zajetí a analýza možného rizika přenosu infekce na člověka.

Dílčí cíl: Kalicivirové onemocnění koček a genetická variabilita jeho původce

Cílem této dílčí části projektu byl stanovit odolnost kaliciviru koček při kontaminaci různých povrchů (plast, keramický povrch) a při různých teplotách imitující prostředí při indoor a outdoor chovu koček. Dále byla analyzována rezistence tohoto viru při použití různých dezinfekčních prostředků.

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany):

Detekce zoonotických patogenů u ježků

V průběhu roku 2021 byla shromážděna sbírka 200 vzorků trusu ježků západních a východních, jeden vzorek vždy reprezentoval jednoho jedince. Trus byl vyšetřen bakteriologickou kultivací, definitivní druhová identifikace kolonií s charakteristickou morfologií byla realizována metodou MALDI-TOF.

Vedle průkazu nejvýznamnějších zoonotických enteropatogenů v trusu ježků jsme se zaměřili na identifikaci izolátů *E. coli* vykazujících fenotyp rezistence k antimikrobiálním látkám vyhrazených pro terapii život ohrožujících infekcí člověka.

U izolátů rezistentních k některému z testovaných antimikrobik byly hledány geny kódujících daný fenotyp rezistence metodou PCR, především epidemiologicky významnější geny rezistence lokalizované na plasmidech, u nichž je vysoká pravděpodobnost horizontálního přenosu mezi bakteriemi prostřednictvím konjugace. Izoláty s fenotypem rezistence k jednomu či více antibiotikům byly vyšetřeny na přítomnost genů, které tento fenotyp rezistence kódují.

E. coli vykazující nejrizikovější fenotyp a genotyp rezistence byly postoupeny k celogenomovému sekvenování pro posouzení jejich klonální příbuznost s izoláty humánní provenience.

Odolnost kalicivirů a herpesvirů koček ve vnějším prostředí a vůči desinfekci

K testování přežitelnosti byly vybrány dva typy materiálu – glazurovaný keramický obklad a plastová destička (PVC). Tyto materiály bývají často používány k výrobě misek pro kočky (plastová miska, keramická miska s glazurou). Z důvodu odlišných podmínek chovu koček byly experimenty prováděny při dvou různých teplotách. Pro imitaci indoorového způsobu chovu byla zvolena pokojová teplota 20 °C. U outdoorového typu chovu teplota prostředí kolísá (noci či zimní měsíce jsou chladnějším obdobím). Proto byla jako druhá teplota pro testování zvolena teplota 8 °C. Po kontaminaci povrchů byly vzorky přeživšího viru odebírány jako stěry v 6hodinových intervalech po dobu 48 hodin. Dále bylo testováno přežití virů v 5 % a 10 % chlornanu sodném, 5 % a 10 % kyselině octové a přípravku na bázi alkoholu (40% ethanol, 20% 2-propanolu). Jednotlivá ředění dezinfekce byla aplikována na dva testované povrchy a ve stejném objemu k nim byla přidána virová suspenze. Bylo zvoleno 5 časových intervalů (1 minuta, 5 minut, 10 minut, 20 minut, 30 minut) a po jejich uplynutí byl proveden stěr suchým tamponem. Stěry všech koncentrací obou virů s desinfekcemi byly infikovány buňky CRFK, které byly kultivovány v termostatu při 37 °C s atmosférou obohacenou o 5% oxidu uhličitého. Po 48hodinové kultivaci byl pod inverzním mikroskopem pozorován cytopatický efekt.

Dosažené výsledky projektu (max. 1/2 strany):

Kultivací na selektivních bakteriologických médiích nebyl u 199 z 200 ježků prokázán ani jeden z nejvýznamnějších humánních a animálních enteropatogenů, na které jsme se zaměřili, tedy konkrétně žádný ze zástupců rodu *Salmonella* ani druhů *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*. Z trusu jednoho ježka jsme za anaerobních podmínek izolovali *C. difficile* a protože k poškození sliznice střeva člověka a zvířat dochází až účinkem toxinů této bakterie a jen určité procento klostridií tyto toxiny skutečně tvoří, zaměřili jsme se na identifikaci genů, které toxiny *C. difficile* kódují. Metodou PCR jsme potom u našeho izolátu identifikovali geny pro toxiny A a B *C. difficile* (*tcdA*, *tcdB*), geny pro binární toxin *C. difficile* (*cdtA*, *cdtB*) nalezeny nebyly.

Z trusu dvou set ježků jsme kultivací na selektivních médiích pro enterobakterie izolovali 600 *E. coli*, každého jedince tedy reprezentovaly tři izoláty. Diskovým difúzním testem byla prokázána rezistence alespoň k jednomu ze třinácti vyšetřovaných antimikrobik u 56 kmenů pocházejících z trusu 22 jedinců (11 %).

Multirezistenci, tedy rezistenci ke třem a více antibiotikům, jsme prokázali u 38 izolátů původem z 16 (8 %) ježků, dva jedinci (1 %) byli kolonizováni *E. coli* rezistentními dokonce k deseti

antimikrobikům současně (ampicilin, cefalotin, chloramfenikol, ciprofloxacín, gentamicin, kys. nalidixová, streptomycin, směs sulfonamidů, sulfametoxazol trimetoprim, tetracyklin).

Felinní kalicivirus vykazoval schopnost replikace po 48 hodinách při teplotě 8 °C na obou povrchích. FHV 102-1 vykazoval schopnost replikace do 6 hodin. Kalicivirus zůstával replikace schopný i po 30minutové expozici 5% roztokem chlornanu sodného a kyseliny octové. Naopak 10% roztoky inaktivovaly kalicivirus do 1 minuty, 5% roztok chlornanu sodného inaktivoval herpesvirus do 1 minuty, 5% roztok kyseliny octové do 5 minutách. Přípravek na bázi alkoholu začal být účinný až po 1 minutě působení u obou virů.

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Navrhovaný projekt přinesl prioritní informace o výskytu zoonotických bakteriálních patogenů u ježků v ČR a dále informace o přežívání některých respiračních virových patogenů koček ve vnějším prostředí a dále o jejich citlivosti vůči dezinfekčním činidlům.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

- The zoonotic potential of *Clostridioides difficile* from hedgehogs living in anthropogenic areas. Do poloviny roku 2022. Anaerobe, IF 3,4
- Stanovení přežitelnosti virových respiračních patogenů koček, Acta Veterinaria Brno.

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	1 020 600,00	1 020 600,00
Služby	60 000,00	62 741,67
Cestovné	30 000,00	0,00
Další provozní náklady	583 897,00	611 155,33
Doplňkové náklady	254 174,00	254 174,00
Celkem	1 948 671,00	1 948 671,00

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

(komentář k čerpání finančních prostředků na řešení projektu – slovní popis v členění jednotlivých položek nákladů a konkrétní výčet, na co byly prostředky využity, komentář a zdůvodnění případných změn a rozdílů oproti schválenému rozpočtu projektu)

Osobní náklady:

Osobní náklady byly čerpány na složky mzdy a odměny členů řešitelského týmu z řad akademických pracovníků. Dále byly čerpány na stipendia studentů doktorského studia, kteří pracovali na různých částech řešení projektu. Osobní náklady byly čerpány přesně dle návrhu projektu.

Služby:

Služby byly čerpány v úhrnné hodnotě 62 741,67 Kč (sekvenování, opravy a udržování, licence)

Cestovné:

Částka určená na cestovné 30 000,00 Kč nebyla čerpána v důsledku cestovních restrikcí v roce 2021. V souladu se směrnicí byla převedena do „Další provozní náklady“ ve výši 27 258,33 Kč a „Služby“ ve výši 2 741,67 Kč.

Další provozní náklady:

Další provozní náklady byly čerpány na pořízení laboratorních potřeb (platové mikropipety, sérologické pipety, petriho misky, zkumavky typu eppendorf a falcon), kultivačních médií pro pěstování bakterií, enzymy pro uskutečňování PCR a qPCR reakcí, izolační kity na virovou i bakteriální DNA, pipety,

Doplňkové náklady:

Doplňkové náklady ve výši 254 174,- Kč byly čerpány přesně podle návrhu projektu.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě doložte výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

9. Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VETUNI bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu: prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu **odpovědného za čerpání prostředků:** prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.

Přednosta ústavu nebo kliniky, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu nebo klinice, respektive celoškolském pracovišti, které řídí.

Datum, jméno a podpis

přednosty ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

prof. MVDr. František Tremel, CSc.

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:

Ing. Vladimír Kohoutek

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Doc. MVDr. Michal Crha, Ph.D.

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2021

1. Identifikační číslo projektu: 2021ITA12

2. **Název projektu:** *Komparativní genomika genů kódujících receptory přirozené imunity TLR u čeledi Equidae*

3. Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: **Prof. MVDr. RNDr. Petr Hořín, CSc.**

Fakulta/celoškolské pracoviště: **Ústav genetiky FVL VETUNI/Ceitec VETUNI RG Animal Immunogenomics**

E-mail: *horinp@vfu.cz*

Telefon: *605870237*

4. Řešitelský kolektiv:

Řešitelský tým projektu je ve smyslu Směrnice rektora (č. ZS 1/2020 ve znění dodatku č. 1 ze dne 24. června 2020 č.j. 9110/20/269 a dodatku č. 2 ze dne 7. ledna 2021 č.j. VFU/2021/87 s účinností od 7. ledna 2021) složen z akademických pracovníků dvou součástí VETUNI Brno, Ústavu genetiky FVL a výzkumné skupiny Animal Immunogenomics Ceitec VETUNI Brno. Proto je vymezení řešitelského týmu uvedeno zvláště pro každou z obou součástí VETUNI Brno. Uvedené úvazky platí pro příslušnou součást VETUNI.

Ústav genetiky FVL

Prof. MVDr. et RNDr. P. Hořín, CSc., řešitel: 0,7 FTE

MVDr. Karla Stejskalová, Ph.D.: 1,0 FTE

Ing. Leona Vychodilová, Ph.D.: 0,65 FTE

Celkový FTE pro ústav genetiky: 2,35

Ceitec VETUNI RG Animal Immunogenomics

Mgr. Martin Plášil, Ph.D.: 1,0 FTE

Mgr. Ján Futas, Ph.D.: 0.8 FTE

Mgr. Marie Klumplerová, Ph.D.: 0.6 FTE do 31.7.2021

Mgr. Eva Jánová, Ph.D.: 0.6 FTE od 1.9.2021

Celkový FTE pro Ceitec VETUNI: 2,40

Jana Bubeníková: PhD studentka (prezenční forma) Ústavu genetiky FVL (3. ročník)

5. V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu:

Ústav genetiky FVL: Jednotliví akademičtí pracovníci se primárně zaměřují na analýzu genů souvisejících se zdravotním stavem zvířat. Navrhovatel projektu *Petr Hořín* koordinoval řešení projektu, analýzu získaných dat a zpracování publikačních výstupů. *Karla Stejskalová* a *Leona Vychodilová* zpracovaly jednu část bioinformatické analýzy: aktuálně dostupné genomové sekvence koňovitých, design primerů amplifikujících kódující oblasti každého genu, nastavení PCR protokolů a provedení vlastních amplifikací pro účely NGS. *Dr. Stejskalová* zároveň koordinovala tuto část řešení projektu. *Dr. Vychodilová* provedla jednu část populační analýzy pomocí specializovaných softwarových nástrojů.

Ceitec VETUNI RG Animal Immunogenomics: Skupina je součástí centra excelentního výzkumu Ceitec VETUNI a zajistila specializované genomické a bioinformatické analýzy. Dr. Plášil je certifikovaným pracovníkem oprávněným obsluhovat NGS sekvenátory a byl zodpovědný za sekvenování získaných PCR produktů, za následnou bioinformatickou analýzu takto získaného speciálního typu dat. Dr. Futas jakožto specialista na detailní anotaci genomových oblastí provedl revizi získaných TLR sekvencí a jejich anotaci v genomech koňovitých. Dr. Klumplerová a dr. Jánová provedly selekční a fylogenetické analýzy a analýzu možných funkčních účinků polymorfismů identifikovaných v jednotlivých genech.

Studentka DSP. Studentka DSP ústavu genetiky Jana Bubeníková, přispěla k analýze genetické diverzity populací.

Z uvedeného je patrna komplementarita expertízy členů kolektivu, který také byl s tímto cílem dlouhodobě budován.

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Obě organizační části VETUNI, které jsou součástí projektu, jsou angažované v oblasti spojené s tématem projektu. Ústav genetiky je desítky let aktivní v oblasti imunogenetiky a genetiky vnímavosti k infekcím domácích zvířat. Ceitec VETUNI je mezinárodně evaluovaným pracovištěm a centrem excelentního výzkumu VETUNI. Výzkumná skupina imunogenetiky zvířat je svým zaměřením komplementární k činnosti ústavu genetiky. Předmět řešení jako celek je tak orientován na hlavní oblast výzkumného zájmu celého týmu. Ústav genetiky je zároveň školicím pracovištěm diplomantů a doktorandů více univerzit.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Obecným cílem projektu byla komplexní komparativní genomická analýza genů kódujících Toll-like receptory (TLR) u příslušníků čeledi Equidae, významné součásti přirozených imunitních mechanismů, významných v obraně proti všem typům patogenních organismů. Dílčími cíli bylo:

- ✓ definovat aktuální sestavu a genomovou organizaci anotovaných TLR genů u jednotlivých příslušníků čeledi Equidae
- ✓ amplifikovat a určit kompletní protein kódující sekvence (CDS) každého genu u panelu všech dostupných druhů ekvidů
- ✓ analyzovat jejich evoluci v rámci čeledi a ve srovnání s evolucí u modelových čeledí savců
- ✓ prostudovat efekty selekce u jednotlivých genů na molekulární úrovni
- ✓ u modelových populací charakterizovat genetickou diverzitu ve vybraných TLR genech a její asociace s vybranými infekcemi

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany):

Pro účely fylogenetické analýzy a selekce u čeledi Equidae byl vytvořen panel zástupců čeledi, zahrnující vždy dva jedince následujících druhů a poddruhů : *E. grevyi*, *E. zebra hartmannae*, *E. quagga antiquorum*, *E. quagga boehmi*, *E. quagga chapmani*, *E. quagga borensis*, *E. africanus somaliensis*, *E. africanus f. asinus*, *E. kiang*, *E. hemionus kulan*, *E. caballus*, *E. przewalskii*. Celkem bylo analyzováno vždy 24 jedinců pro každý gen TLR.

Pro studium genetické diverzity modelových populací s cílem odhadnout rozsah vnitrodruhového polymorfismu byl vytvořen panel zástupců 15 různých plemen koní (*E. caballus*): Murgese, Island pony, Starokladrubský bělouš, Starokladrubský vraník, Český teplokrevník, Arabský kůň, Camargue, Rumunský divoký kůň, Achaltekinský kůň, Anglický plnokrevník, Lusitano, Espagnol, Quarter horse, Selle Francais, Velšský pony. Každé plemeno bylo zastoupeno třemi jedinci, celkem 45 zvířat. Dále byla do studie zahrnuta skupina koní Przewalského (27 jedinců) a tři populace koní plemene Arabský kůň, Achaltekinský kůň a Starokladrubský bělouš, kde každá čítala 32 jedinců, celkem 96 zvířat.

Na základě analýzy dostupných celogenomových sekvencí koně (EquCab3), koně Przewalského (GCA_000696695.1) a osla (EquAsi1.0) byly u každého druhu identifikovány dosud anotované geny TLR – celkem 12 genů (TLR1-12). Pro každý gen byly navrženy primery umožňující amplifikaci úplných protein kódujících sekvencí (cds) u všech studovaných druhů. U panelu čeledi Equidae byly amplifikovány geny TLR1-12, pro studium diverzity byly amplifikovány geny TLR1,6,10 u panelu plemen a modelových populací *E. caballus* a *E. przewalskii*. Získané amplikony byly sekvenovány Sangerovou metodou a/nebo pomocí NGS (MiSeq, Illumina). Pro dosud pouze teoreticky anotované sekvence TLR5, 11, 12 byla ověřena a potvrzena jejich exprese pomocí rt-PCR analýzou archivované cDNA druhu *E. caballus*.

Dosažené výsledky projektu (max. 1/2 strany):

Pro každý studovaný gen (TLR1-12) v panelu *Equidae* byly u každého druhu určeny úplné nukleotidové sekvence kódující protein a pomocí *in silico* translace získány odpovídající aminokyselinové sekvence předpokládaného každého genového produktu. U získaných sekvencí byly s využitím standardního softwaru Bioedit a IGV získány a vyhodnoceny informace o mezidruhových, případně i vnitrodruhových rozdílech v nukleotidových i aminokyselinových sekvencích. Celkem bylo v analyzovaných cds nalezeno 505 variabilních míst, z toho nejvíce u genů TLR9 a TLR12 (60) a nejméně u TLR8 (28). Průměrná identita sekvencí při mezidruhovém srovnání byla 99,58%, nejméně u TLR3 (99,41%) a nejvíce u TLR8 (99,75%). Získané nukleotidové i aminokyselinové sekvence byly použity k sestavení fylogenetických stromů pro každý gen za využití softwaru MEGA, kdy byl pomocí BIC a AIC skóre vyhodnocen pro každé TLR nejlépe vyhovující model. Dále byly TLR geny byly podrobeny analýze selekce pomocí modelu FEL (Fixed effect likelihood) v programu DataMonkey. Na hladině významnosti $p < 0,05$ bylo nalezeno celkem 24 míst pod purifikující selekcí, a to v genech TLR1-3, TLR7, TLR9-11.

Sekvenční data pro TLR1,6,10 u panelu plemen a modelových populací *E. caballus* a *E. Przewalskii* se v současné době vyhodnocují.

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Z hlediska vědy byly získány prioritní poznatky o genech TLR u jednotlivých druhů ekvidů. V evolučním kontextu přispějí získané výsledky ke komparativním analýzám genů TLR, které jsou studovány zejména u modelových druhů zvířat a člověka. Seleční analýzy potvrdily funkční význam některých z pozorovaných polymorfismů genů TLR. Tyto výsledky budou porovnány s distribucí vybraných polymorfismů v různých koňských populacích,

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Z hlediska řešitelského týmu vedl projekt k získání kvalitních dat, která po jejich publikaci umožní získat lepší pozici v grantových soutěžích a pro VETUNI představují příspěvek do hodnocení kvality výzkumné činnosti na univerzitě.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

Toll-like receptor (TLR) genes in the family Equidae: phylogenetic, selection and diversity analyses. Frontiers in Genetics. IF 4,599

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

8.1. Náklady FVL

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	287 600	287 600
Služby	28 936	5 043
Cestovné	18 000	0
Další provozní náklady	221 000	262 893
Doplňkové náklady	83 330	83 330
Celkem	638 866	638 866

8.2. Náklady Ceitec

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	254 220	254 220
Služby	25 147	10 000
Cestovné	10 500	0
Další provozní náklady	140 000	165 647
Doplňkové náklady	64 480	64 480
Celkem	494 347	494 347

8.3. Náklady za projekt celkem

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	541 820	541 820
Služby	54 083	15 043
Cestovné	28 500	0
Další provozní náklady	361 000	428 540
Doplňkové náklady	147 810	147 810
Celkem	1 133 213	1 133 213

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

Osobní náklady: Byly použity v souladu s plánem řešení ve formě odměn pro pracovníky na projektu. Odměny byly vyplaceny v polovině řešení projektu a na jeho konci na základě odvedených výsledků. Vzhledem k odchodu Dr. M. Klumplerové z VETUNI jí byla vyplacena pouze první část odměn za práce odpovídající jejímu podílu na celkovém objemu prací. Zbytek odměn byl vyplacen dr. E. Jánové, která byla po návratu z mateřské dovolené přijata na místo v rámci Ceitec VETUNI po dr. Klumplerové a převzala její povinnosti v rámci projektu k 1.9.2021.

Služby: Prostředky byly využity pro outsourcované Sangerovo sekvenování (3 tis. Kč, Ceitec) a pro outsourcovanou syntézu oligonukleotidů (primerů)(5 tis. Kč FVL, 7 tis. Kč Ceitec). Celkem 15 tis. Kč. Hospodaření s financemi projektu obecně bylo zásadně ovlivněno okolnostmi souvisejícími s

pandemií Covid-19. Protože metodické genomické přístupy využívané k řešení projektu (PCR, sekvenování) jsou principiálně shodné s metodikami diagnostiky SARS-CoV2 („PCR testy“ sekvenování), ocitli jsme se v přímé konkurenci o chemikálie, ochranné pomůcky a plasty s laboratořemi pověřenými touto diagnostikou. Důsledkem bylo prodloužení dodacích lhůt z týdnů na měsíce a časté dodání menšího než požadovaného množství, případně nedodání požadované položky. Navazující práce spadající do položky „Služby“ (zejména Sangerovo sekvenování) tak nemohly být provedeny v optimálním rozsahu. V souladu se směrnicí ITA VETUNI jsme proto 39 tis. Kč nevyužitých nákladů na služby přesunuli do materiálových nákladů, které jsme použili na pořízení dostupných položek s odpovídající expirací.

Cestovné:

Cestovní omezení v průběhu roku 2021 měla zásadní dopad na čerpání této položky. Mezinárodní konference, kde jsme plánovali účast pro dvě osoby byla nakonec transformována na online konferenci (ISAG 2021 Virtual Conference: International Society for Animal Genetics, July 26-30, 2021). Stejně tak se konal online i plánovaný mezinárodní seminář o imunogenetice organizovaný VÚŽV v Praze. Z těchto důvodů nemohly být cestovní náklady vůbec čerpány a byly přesunuty do materiálních nákladů.

V obou případech, tj. v položce Služby a Cestovné, respektovaly přesuny v rozpočtech FVL a Ceitecu i v celkovém rozpočtu projektu nutnost maximálního navýšení cílové položky o 20% (celkově o 18,7%).

Další provozní náklady byly čerpány v následující struktuře (za celý projekt):

Část FVL:

Kity pro NGS: 156 tis. Kč, plasty (mikrozkumavky, destičky a pipetové špičky): 35 tis. Kč, DHM 61 tis. Kč, laboratorní chemie: 11 tis. Kč. Celkem (zaokrouhлено na tis. Kč): 263 tis. Kč.

Část Ceitec:

Kity pro PCR: 86,5 tis. Kč, plasty (mikrozkumavky): 34 tis. Kč, laboratorní chemie: 43 tis. Kč. Enzymy pro PCR: 2 tis. Kč. Celkem (zaokrouhлено na tis. Kč): 165,5 tis. Kč.

Veškerý materiál byl využit ve smyslu plánovaných metodik pro PCR analýzy a sekvenování NGS na přístroji MiSeq. Přesuny prostředků z položek Služby a Cestovné byly využity k zajištění maximální kapacity sekvenování NGS (jeden běh přístroje MiSeq odpovídá spotřebě cca 120-150 tis. Kč).

Doplňkové náklady:

Byly čerpány v souladu s plánem projektu.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě doložte výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

9. Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz

na podporu ITA VETUNI bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu:

7.1.2022 Petr Hořín

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu **odpovědného za čerpání prostředků:**

7.1.2022 Petr Hořín

Přednosta ústavu nebo kliniky, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu nebo klinice, respektive celoškolském pracovišti, které řídí.

Datum, jméno a podpis

přednosta ústavu nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

7.1.2022 Petr Hořín

7.1.2021 Prof. MVDr. Jiří Smola, CSc.

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty

vedoucího celoškolského pracoviště

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2021

1. Identifikační číslo projektu: 2021ITA13

2. Název projektu:

Diagnostika a léčba vybraných onemocnění a urgentních stavů zvířat zájmových chovů z pohledu aktuálních trendů ve veterinární medicíně.

3. Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: doc. MVDr. Michal Crha, Ph.D.

Fakulta/celoškolské pracoviště: Fakulta veterinárního lékařství

E-mail: crham@vfu.cz

Telefon: +420 541 562 582

4. Řešitelský kolektiv:

složení řešitelského týmu: (akademičtí pracovníci a jejich příslušnost k ústavům nebo klinikám fakulty nebo výzkumným skupinám CEITEC, studenti DSP) a forma zapojení každého člena řešitelského týmu

Doc. MVDr. Michal Crha, Ph.D. (KCHPK, FVL, 1,0) – řešitel, koordinace projektu, podíl na publikačních výstupech a analýze výsledků projektu.

Prof. MVDr. Alois Nečas, Ph.D., MBA (KCHPK, FVL, 1,0) – spoluřešitel, analýza a zpracování výsledku, podíl na publikačních výsledcích.

Prof. MVDr. Zdeněk Knotek, CSc., DECZM (KCHPPDS, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů.

MVDr. Zita Filipejová, Ph.D. (KCHPK, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů.

MVDr. Jana Lorenzová, Ph.D. (KCHPK, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů.

MVDr. Ing. Eva Čermáková, Ph.D. (KCHPPDS, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů.

MVDr. Lucie Urbanová, Ph.D. (KCHPK, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů.

MVDr. Tomáš Fichtel, Ph.D. (KCHPK, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů.

MVDr. Carlos Agudelo, Ph.D. (KCHPK, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů.

MVDr. Robin Srnec, Ph.D. (KCHPK, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů.

MVDr. Hana Černochová, Ph.D. (KCHPPDS, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, laboratorně-diagnostická práce, analýza výsledků.

MVDr. Andrea Nečasová (KCHPK, FVL, 0,5) - zapojení do shromažďování a zpracování výsledků v rámci řešení projektu.

MVDr. Pavel Proks, Ph.D. (KCHPK, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů.

MVDr. Benicie Kosková (KCHPK, FVL, 0,5) - zapojení do shromažďování a zpracování výsledků, klinická i laboratorní práce v rámci řešení projektu.

MVDr. Ladislav Stehlík, Ph.D. (KCHPK, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů.

MVDr. Dominik Komenda (DSP student) - zapojení do shromažďování a zpracování výsledků, klinická i laboratorní práce v rámci řešení projektu.

MVDr. Michaela Vlašťanová (DSP student) - zapojení do shromažďování a zpracování výsledků, klinická i laboratorní práce v rámci řešení projektu.

MVDr. Natálie Lukášová (DSP student) - zapojení do shromažďování a zpracování výsledků, klinická i laboratorní práce v rámci řešení projektu.

MVDr. Michaela Jonášiová (DSP student) - zapojení do shromažďování a zpracování výsledků, klinická i laboratorní práce v rámci řešení projektu.

5. V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu:

Není společným projektem více součástí VETUNI.

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Předmět řešení projektu je zaměřen na rozvoj a ověření moderních diagnostických a terapeutických postupů u vybraných onemocnění zvířat zájmových chovů s důrazem na nejnovější trendy a směry v oblasti veterinární medicíny, dále na problematiku prevence vybraných onemocnění a welfare ošetřovaných zvířat. Předmět řešení projektu je v souladu s výzvou Interní tvůrčí agentury (ITA) VETUNI a strategií výzkumu na Fakultě veterinárního lékařství VETUNI, kdy mezi současné a perspektivní směry výzkumu, kromě jiného, patří i využití pokročilých diagnostických a terapeutických protokolů včetně nejmodernějších chirurgických metod spojených s miniinvazivním ošetřením pacienta, stanovování vhodných protokolů anestezie a analgezie, zavádění metodologických postupů léčby vedoucí k personalizované medicíně, využití biomateriálů a nanotechnologií v léčbě onemocnění zvířat zájmových chovů a další.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Projekt je zaměřen na současné trendy ve veterinární medicíně z pohledu využití moderních diagnostických metod, technik a postupů léčby u vybraných onemocnění zvířat zájmových chovů (tj. psů, koček, plazů a drobných savců). Projekt dále cílí na rozvoj moderních postupů urgentní medicíny, jejichž použití souvisí s efektivním řešením akutních stavů u exotických zvířat zájmových chovů.

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany):

1) Byla provedena retrospektivní analýza souboru 82 psů vyšetřených výpočetní tomografií s cílem posouzení velikosti a denzity mízních uzlin. Změřené a vypočtené parametry sternálních mízních uzlin a tuku byly vzájemně porovnány podle lokalizace (uvnitř vs. mimo drenážní oblast) a typu (zánět vs. neoplazie) patologie.

2) Byla provedena retrospektivní analýza nativních rentgenogramů u 52 pacientů s endoskopicky prokázaným cizím tělesem (CT) v jícnu. Hodnocen byl charakter CT, primární i sekundární rentgenologické příznaky obstrukce jícnu ve vztahu provedené projekci, posouzena byla citlivost a specifita nativních rentgenogramů v diagnostice obstrukčního onemocnění jícnu.

3) V prospektivní studii na souboru 35 pacientů byla prozkoumána potenciální souvislost mezi hypotyreózou a DCM (dilatační kardiopatií) u psů. U všech pacientů byly zaznamenány nacionálně, bylo provedeno kompletní kardiologické vyšetření (EKG, RTG, echokardiografie), hematologické a biochemické vyšetření, včetně stanovení srdečních markerů (NTproBNP a Troponin I) a hormonů štítné žlázy – tyroxinu a tyreotropního hormonu.

4) U 7 leguánů zelených, byla odebrána krev do roztoku citrátu sodného a uchována v podmínkách *in vitro*. V den odběru a následně 7., 14. a 21. den po odběru byl vzorek krve vyšetřen pomocí standardních laboratorních metod klinické hematologie (stanovení hemoglobinu, hematokritu, počtu leukocytů, erytrocytů a zastoupení jednotlivých subpopulací leukocytů). Dosažené výsledky byly srovnávány a hodnoceny pomocí standardních statistických metod.

5) V souboru 20 býložravých drobných savců (6 králíků a 14 morčat) byla ověřena efektivita terapie urolitiázy založená na perorálním podávání citrátu draselného a diety s nízkým obsahem vápníku.

6) Vzorky krve byly odebrány 20 samičkám chameleona jemenského ve věku 7, 9 a 11 měsíců. Biochemický profil byl analyzován pomocí analyzátoru VetScan VS2 s rotorem Avian/Reptile Profile. Koncentrace ionizovaného vápníku (iCa) byla měřena analyzátozem i-STAT s patronou CHEM+8.

Dosažené výsledky projektu (max. 1/2 strany):

1) Do studie bylo zařazeno 81 pacientů (33 fen, 48 psů). Průměrný věk byl 8 roků (SD 3,07 roku; rozsah 10 měsíců až 15,8 roku). Průměrná váha ve skupině byla 29,6 kg (SD 15,03 kg; rozsah 2,4 až 72,2 kg). Dle stanovených diagnóz byly pacienti zařazeny do kategorie neoplazií (55/81; 67,9 %) nebo zánětů (26/81; 32,1 %). Patologie byly počítačovou tomografií lokalizovány ve svodné oblasti u 29 (35,8 %) a mimo svodnou oblast u 52 (64,2 %) pacientů. Minimálně jedna sternální mízní uzlina (StLN) byla nalezena u každého pacienta v této studii. Průměrný počet StLN u jednoho pacienta byl $2,3 \pm 0,84$ a maximálně byly přítomny 4 StLN. Nejčastější lokalizace StLN byla v úrovni druhé sternebry.

2) CT v jícnu bylo detekováno z pravé boční projekce (RLP) u 84,6 % pacientů, z levé boční projekce (LLP) u 96,2 %, bez statisticky významného rozdílu mezi nimi ($p=0,070$). Výraznou úlohu v detekci CT hrála jeho opacita a přítomnost distenze jícnu. Distenze jícnu byla nejčastěji přítomna v LLP (63,5 %), ale statisticky významná byla pouze pro RLP ($p=0,008$). Ve všech případech, kde CT v jícnu nebylo z RLP detekováno, nebyla distenze jícnu přítomna.

3) U pacientů s preklinickou DCM byla prokázána pozitivní korelace mezi hormonem stimujícím štítnou žlázu a tělesnou hmotností, velikostí levé síně a sérovou hladinou NT-proBNP. Euthyroidní psi s DCM měli vyšší hodnoty celkového tyroxinu a více ventrikulárních předčasných komplexů než hypotyreózní psi. Přestože naše studie nepotvrdila přímou souvislost mezi hypotyreózou a DCM jako možnou příčinou, byly zjištěny další korelace, které nebyly dosud ve veterinární medicíně popsány.

4) Byl zhodnocen vliv dlouhodobého skladování krve v citrát-fosfát-dextróza-adenin (CPDA-1) na vybrané hematologické hodnoty u leguána zeleného ($n=7$). Výsledky naznačují, že je možné uchovávat celou krev leguána zeleného v CPDA-1 při teplotě 4 °C po dobu sedmi dnů, protože 14. den skladování krve se začaly objevovat statisticky významné změny v hematologických hodnotách.

5) Léčba citrátem draselným v kombinaci s dietou s nízkým obsahem vápníku se ukázala jako bezpečný a účinný protokol pro terapii a prevenci urolitiázy a kalu u býložravých drobných savců. V případě sedimentu byla zjištěna 100 % účinnost, resp. 93 % účinnost v případě urolitiázy.

6) Byly vyhodnoceny výsledky krevních testů u chameleonů jemenských a posouzena jejich dynamika v návaznosti na stáří (tj. hladina glukózy, kyseliny močové, celkového a ionizovaného vápníku, aspartátaminotransferázy, draslíku, celkového proteinu, globulinu, kreatininázy).

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Hlavním přínosem projektu bylo vyhodnocení a ověření nových diagnostických a léčebných metod a postupů u vybraných onemocnění zvířat zájmových chovů, což umožnilo získání objektivních a unikátních poznatků využitelných v klinické či experimentální medicíně. Tyto poznatky mohou mít praktický dopad na zkvalitnění diagnostiky a terapie v rámci poskytované veterinární péče obecně tak přispívat ke zkvalitnění života ošetřovaných zvířat.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Získané výsledky budou publikovány ve vybraných vědeckých časopisech s IF a odborných časopisech zaměřených na veterinární medicínu. Budou také prezentovány pregraduálním i postgraduálním studentům v rámci jejich univerzitního vzdělávání, tak jako budou prezentovány širší odborné veřejnosti v rámci konferencí, přednáškové, konzultační a další činnosti.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

Ladislav Stehlík, Hana Vitulová, Francesco Simeoni, Pavel Proks, Massimo Vignoli. COMPUTED TOMOGRAPHY FEATURES OF STERNAL LYMPH NODES IN DOGS WITH INFLAMMATORY AND NEOPLASTIC DISEASES (BMC Vet Research)

Soňa Pánková, Andrea Nečasová, Jana Lorenzová, Vladimír Jekl, Alois Nečas, Ladislav Dušek, Robert Hudeček, Petr Gál. COMPARISON OF THE EFFECT OF TWO ANTI-ADHESION MATERIALS ON THE FORMATION OF POSTOPERATIVE ADHESIONS AFTER MYOMECTOMY – AN EXPERIMENTAL STUDY ON RABBIT DOES. Acta Vet Brno 2021, 90: 407–414;
<https://doi.org/10.2754/avb202190040407>

Benicie Kosková, Carlos Fernando Agudelo Ramirez, Zita Filipejová, Meriç Kocatürk, Michal Crha. Association between dilated cardiomyopathy and hypothyroidism in dogs. Acta Vet Brno, č.r. 37/2021 *accepted*

Cermakova Eva, Rozkolova Sandra, Knotkova Zora, Ceplecha Vaclav, Knotek Zdenek, BIOCHEMICAL BLOOD PROFILE IN 20 FEMALE VEILED CHAMELEONS (CHAMAELEO CALYPTRATUS) AGED 7, 9 AND 11 MONTHS, Journal of Exotic Pet Medicine (2021),doi:
<https://doi.org/10.1053/j.jepm.2021.12.001>

Michaela Valastanova, Zora Knotkova, Zdenek Knotek. INFLUENCE OF BLOOD STORAGE ON HAEMATOLOGICAL VALUES IN CAPTIVE GREEN IGUANAS (IGUANA IGUANA). Veterinární Medicína č.r. 66/2021 *submitted*

Hana Černochová, Anna Hundáková, Zdeněk Knotek. USE OF POTASSIUM CITRATE FOR A THERAPY AND PREVENTION OF UROLITHIASIS AND SLUDGE IN RABBITS AND GUINEA PIGS. Veterinární Medicína č.r. 107/2021 *submitted*

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	*Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	992 600,00	992 600,00
Služby	110 694,00	110 694,00
Cestovné	10 000,00	0,00
Další provozní náklady	500 000,00	510 000,00
Doplňkové náklady	241 994,00	241 994,00
Celkem	1 855 288,00	1 855 288,00

*Na základě rozhodnutí č.j. VFU/2021/00002749.

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

(komentář k čerpání finančních prostředků na řešení projektu – slovní popis v členění jednotlivých položek nákladů a konkrétní výčet, na co byly prostředky využity, komentář a zdůvodnění případných změn a rozdílů oproti schválenému rozpočtu projektu)

Osobní náklady:

Celková výše osobních nákladů byla 992 600,00 Kč. Z této sumy tvořily mzdové prostředky (os. příplatky, příp. odměny) pro členy řešitelského týmu 936 600,00 Kč včetně zákonných odvodů a dále stipendia, která tvořila 56 000,00 Kč.

Služby:

Služby (max. 10% celkových nákladů projektu) byly čerpány ve výši 110 694,00 na opravu a údržbu přístrojů 66 179,23 Kč; pronájem tlakových lahví, servis, statistická analýza, editace a úprava textů pro publikační výstupy 44 514,77 Kč.

Cestovné:

Mobility za účelem aktivní prezentace výsledků projektu nebyly realizovány z důvodu trvajících omezení. Náklady na plánované cesty ve výši 10 000,00 Kč byly proto v souladu se směrnicí ITA VETUNI převedeny a využity na krytí provozních nákladů projektu.

Další provozní náklady:

Provozní náklady ve výši 510 000,00 Kč tvořily: náklady na šicí, spotřební chirurgický materiál; náklady na zdravotní spotřební materiál; operační oblečení a ochranné pomůcky; náklady na laboratorní materiál; drobný hmotný majetek; náklady na tonery a kancelářský spotřební materiál.

Doplňkové náklady:

Doplňkové náklady (režijní náklady - 15% z mezisoučtu přímých nákladů) v celkové výši 241 994,00 Kč.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě doložte výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

9. Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VETUNI bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu:

doc. MVDr. Michal Crha, Ph.D.

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu **odpovědného za čerpání prostředků:**
doc. MVDr. Michal Crha, Ph.D.

Přednosta ústavu nebo kliniky, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu nebo klinice, respektive celoškolském pracovišti, které řídí.

Datum, jméno a podpis

přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:
prof. MVDr. Alois Nečas, Ph.D., MBA

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:
Ing. Vladimír Kohoutek

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:
doc. MVDr. Michal Crha, Ph.D.

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2021

1. Identifikační číslo projektu: 2021ITA14, FVL / Illek / ITA 2021

2. Název projektu:

1. Zdravotní poruchy u koní zaměřené na diagnostiku a prevenci atypické myopatie koní.
2. Zvýšení efektivity aspirace ovariálních folikulů u skotu opakovaným výplachem.
3. Zhodnocení metod extrakce spermií z varleční tkáně (TESE) u býků
4. Diagnostika poruch metabolismu v intenzivních chovech skotu, jejich vliv na kvalitu kolostrkolostrální imunitu.
5. Vliv různých forem anestezie a analgezie na vybrané krevní parametry při kastraci selat v rámci zlepšení podmínek welfare

3. Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: **doc. MVDr. Josef Illek, DrSc. Dipl. ECBHM**
Fakulta/celoškolské pracoviště: Sekce chorob velkých zvířat
E-mail: illekj@vfu.cz
Telefon: + 420 54156 2438

4. Řešitelský kolektiv:

složení řešitelského týmu: (akademickí pracovníci a jejich příslušnost k ústavům nebo klinikám fakulty nebo výzkumným skupinám CEITEC, studenti DSP) a forma zapojení každého člena řešitelského týmu

Dílčí cíl A (KCHK)

DOC. MVDr. Markéta Sedlinská, Ph.D., akademický pracovník KCHK, úvazek 1,0
MVDr. Petr Jahn, CSc., akademický pracovník KCHK, úvazek 1,0
MVDr. Eva Šamonilová (roz. Ludvíková), Ph.D., akademický pracovník KCHK, úvazek 0,5
MVDr. Kristýna Žuffová, Ph.D., akademický pracovník KCHK, úvazek 1,0
MVDr. Radovan Kabeš, akademický pracovník KCHK, úvazek 1,0
MVDr. Libor Podojil, student DSP
MVDr. Andrea Kopecká, student DSP

Dílčí cíl B

Doc. MVDr. Svatopluk Čech, Ph.D.
MVDr Tomáš Pálení Ph.D
MVDr. Ivana Šimková Akademický pracovník KCHPP, úvazek 1,0
MVDr, Vojtěch Kos DSP KCHPP

Dílčí cíl C

MVDr. Eva Indrová, Ph.D. akademický pracovník KCHPP, úvazek 1.0
MVDr. Robert Novotný Ph.D. akademický pracovník KCHPP úvazek 1,0
MVDr. Adriena Hochmanová , DSP KCHPP
MVDr. Martin Pleško , akademický pracovník úvazek 1,0

Dílčí cíl D

Doc. MVDr. Josef Illek, DrSc. akademický pracovník úvazek 1,0 KLVZ
MVDr. Romana Kadek akademický pracovník, úvazek 0,5, DSP KLVZ
MVDr. Kristýna Gebolizová, DSP KLVZ
MVDr. Marie Skočovská, DSP KLVZ
MVDr, Ivo Tejnil , Akademický pracovník úvazek 0,5 KCHPP

Dílčí cíl E

Prof. MVDr. Jiří Smola , CSc, akademický pracovník KCHPP, úvazek 1,0
Doc. MVDr. Martin Svoboda, Ph.D, úvazek 1,0
MVDr. Zdeněk Fajt, Ph.D. akademický pracovník , úvazek 1,0
MVDr. Jonáš Vaňhara, akademický pracovník, úvazek 1,0
MVDr. Jan Vašek, akademický pracovník , úvazek 1,0

5. V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu:

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Jednotlivá pracoviště Sekce chorob velkých zvířat se dlouhodobě zabývá řešením problematiky diagnostiky, terapie a prevence chorob zvířat. Klinika chorob koní se dlouhodobě zabývá problematikou myopatií u koní. Ve spolupráci s Laboratoří dědičných metabolických poruch Fakultní nemocnice Olomouc byly publikovány studie zabývající se metabolickou analýzou vzorků sér a moči koní s AM. Pokud je nám známo, problematikou atypické myopatie koní se nezabývá žádný výzkumný tým ani laboratoř v ČR. U skotu a malých přežvýkavců je studium zaměřeno na poruchy reprodukce a výzkum nových metod používaných ke zlepšení fertility. U krav je pozornost zaměřena na tranzitní období, zdravotní stav krav a kvalitu kolostra. U neonatálních telat je pozornost věnována kolostrální imunitě.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

A) Cílem projektu je zavedení a zpřesnění diagnostiky atypické myopatie (AM) koní a rozšíření poznatků o jejím výskytu, etiologii a prevenci v podmínkách ČR. Jedná se o laboratorní vyšetření archivovaných vzorků krve a moči od koní s atypickou myopatií, kteří byli vyšetřeni nebo konzultováni na Klinice chorob koní v letech 2013 – 2020, retrospektivní vyhodnocení klinických dat a získaných laboratorních výsledků a dále aktivní cílené vyhledávání nových případů a dlouhodobé sledování případů zachycených v předchozích letech. Součástí projektu je i a zlepšení prevence atypické myopatie koní v ČR.

B) Cílem projektu je zvýšit efektivitu aspirace zhotovením nového instrumentu k opakovanému výplachu preovulačního folikulu, ověřit jeho funkci a vypracovat metodiku výplachu tak, aby zisk aspirace oocytů dosáhl alespoň 75%.

C) Cílem je ověření metod získání spermií metodou TESE (testicular sperm extraction) či MESA (Microsurgical epididymal sperm aspiration) Tyto metody získávání spermií se v humánní medicíně používají u mužů s azoospermií. Takto získané spermie jsou pak schopné oplodnit oocyt pouze při

použití metody ICSI (intracytoplasmatic sperm injection). Metodou TESE by mohly být odebrány spermie již od velmi mladých býků, u kterých již započala spermatogeneze, avšak ještě není možné získat spermie elektroejakulací či přirozeně odběrem na umělou pochvu. V naší studii jsme se zaměřili na porovnání metodiky perkutánní extrakce spermií pro následné použití v asistované reprodukci skotu. Porovnávaly se metody odběru testikulární tkáně standardní bioptickou jehlou o průměru 4 a 8mm a bioptickým zařízením Tru cut a vliv jednotlivých metod na kvalitu získaného vzorku, použitelnost odebraných spermií a poškození tkáně varlat.

D) Cílem projektu je monitorování kvality kolostra a kolostrální imunity u neonatálních telat, stanovení hlavních příčin nízké kvality kolostra v některých chovech a následně studovat metody vedoucí k zlepšení kvality kolostra a to pomocí nutričních i imunostimulačních přípravků.

E) Cílem je zlepšení podmínek welfare selat při kastraci pomocí vybraných látek určených k anestezii a analgezií

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany):

A)

U koní se syndromem rhabdomyolýzy, kteří byli ošetřeni na KCHK nebo terénními veterináři a konzultováni s KCHK v letech 2013 - 2020, byly vyšetřeny odebrané vzorky krve na přítomnost HGE a jeho toxických metabolitů a dále stanoveno zastoupení acylkarnitinů v krvi s cílem diagnostikovat zda příčinou rhabdomyolýzy byla otrava hypoglycinem A (HGA). Dále byly aktivně cíleně vyhledávány nové případy AM. Metodika práce byla složena z několika samostatných na sebe navazujících postupů:

1) Sběr biologického materiálu

Koně: U koní s klinickými příznaky rhabdomyolýzy (dle vyhodnocení majiteli nebo terénními veterináři) a zvýšené aktivity plazmatické CK byla odebrána anamnéza nemoci a anamnéza chovu, včetně zjištění přítomnosti vyvolávajících agens - javor klen (*Acer pseudoplatanus*) a javor jasanolistý (*Acer negundo*).

Vzorky: Od koní se syndromem rhabdomyolýzy byla odebrána plná krev punkcí *vena jugularis*. Ze vzorku krve byla zhotovena suchá krevní kapka na kartičky pro metabolický novorozenecký screening (Whatman 903 filter paper), zbytek krve byl zamrazen na -80°C. V některých lokalitách byly odebrány vzorky nažek a semenáčků javoru horského a javoru jasanolistého

2) Laboratorní vyšetření biologických vzorků

Získané vzorky byly vyšetřeny v Laboratoři dědičných metabolických poruch Fakultní nemocnice, Univerzita Palackého Olomouc. Ve vzorcích krve byly stanoveny koncentrace acylkarnitinů metodou přímého nástřiku s následnou tandemovou hmotnostní spektrometrií (FIA/MS) a dále přítomnost HGA a MCPG a jejich toxických metabolitů (MCPA a MCPF) vysokoúčinnou chromatografií a hmotnostní spektrometrií.

3) Vyhodnocení získaných dat a jejich interpretace

Dosažené výsledky projektu (max. 1/2 strany):

- 1) Z celkového počtu 138 podchyčených suspektních případů AM v letech 2011 – 2020 (z toho na Klinice chorob koní 113, na Veterinární klinice Heřmanův Městec 25) byla diagnóza AM potvrzena u 60 koní na základě průkazu HGA (57 koní) nebo kumulace acylkarnitinů v periferní krvi (3 koně). Z 57 koní s potvrzeným nálezem HGA byl u 48 prokázán v krvi také jeho metabolit MCPA, u 9 koní této skupiny byla koncentrace HGA nulová. Laboratorními analýzami vzorků, odebíraných u koně hospitalizovaného na KCHK Brno, byla zjištěna perzistence HGA v periferní krvi po dobu 15 dní (MCPF-carnitinu 5 dní, MCPA-carnitinu 4 dny a MCPF-glycinu 3 dny).

- 2) Všichni koně s potvrzenou nebo vysoce suspektní diagnózou AM se pásli na pastvinách s výskytem javoru horského (*Acer pseudoplatanus*); v jednom případě byla na pastvině zjištěna pouze přítomnost javoru jasanolistého (*Acer negundo*) (v Evropě dosud nebyl podobný případ popsán). Hypoglycin A (u některých i jeho metabolit MCPA) byl zjištěn u dalších 18 kontrolních koní, kteří byli s postiženými koňmi na společné pastvě, ale neměli klinické příznaky ani elevaci CK. Absence klinických příznaků myopatie u těchto koní není vyjasněna. U dalších 52 koní na pastvě s výskytem javoru horského (*Acer pseudoplatanus*) s klinickými příznaky AM a elevací aktivity CK nebyly dostupné vzorky krve, proto u nich byla stanovena diagnóza vysoce suspektní AM.
- 3) Vyhodnocením dat u potvrzených a vysoce suspektních případů AM (112 koní) byla zjištěna následující prevalence v jednotlivých letech: 2011 – 6 případů, 2012 – 1 případ, 2013 – 17 případů, 2014 – 4 případy, 2015 – 0 případů, 2016 – 6 případů, 2017 – 18 případů, 2018 – 49 případů, 2019 – 10 případů, 2020 – 1 případ. Z celkového počtu 112 koní bylo 71,4 % postiženo v období září – leden a 28,6 % v období březen – květen. Celkem bylo AM postiženo 32 hřebců, 35 valachů, 45 klisen ve věku $5,6 \pm 4,5$ roku. Mortalita onemocnění činila 66 % (20 % eutanázie, 46 % exitus, z toho u 38,4 % případů uhynulo do 24 hodin po nástupu klinických příznaků).
- 4) V 21 lokalitách byly odebrány vzorky nažek a semenáčků javoru horského a javoru jasanolistého (celkem 77 vzorků), v nichž byl na Ústavu ochrany zvířat, welfare a veřejného veterinárního lékařství stanoven obsah hypoglycinu A.
- 5) V roce 2021 byl výskyt AM v ČR méně četný než v předchozích letech. S Klinikou chorob koní bylo konzultováno pouze šest suspektních případů z terénu. Od všech koní byly zajištěny vzorky krve a rostlinného materiálu pro pozdější analýzy.
- 6) Na základě stanovení acylkarnitinů a přítomnosti HGA a jeho metabolitů v periferní krvi u koní se syndromem rhabdomyolýza, kteří byli ošetřeni nebo konzultováni na KCHK v letech 2013 - 2020 byla potvrzena nebo vyloučena diagnóza AM a vyhodnoceny základní klinické údaje o tomto onemocnění.

Popis a metodika řešení projektu B)

Základní metodickou aktivitou experimentu je modifikace transvaginální sonografické punkce vaječnicků (ovum pick-up, OPU). Principem metody OPU je dvojí funkce držáku sondy: držák nese sonografickou sondu, která je umístěna v jeho přední části a zároveň po celé délce držáku probíhá pracovní tubus, kterým je zaváděna do pochvy aspirační jehla nebo v případě použití výměnných jehel držák aspirační jehly. Aspirační jehla vyúsťuje z pracovního tubusu v těsné blízkosti okraje aktivní plochy sondy, takže již při vysunutí jehly o několik milimetrů se její obraz objeví na obrazovce sonografu. Stačí tedy pohybovat vaječnickem tak, aby se ovariální folikuly postupně posouvaly do místa, kde mohou být dosaženy hrotem jehly. Opačný konec jehly nebo držáku jehly je napojen na aspirační systém sestávající z podtlakových hadiček, sběrné nádoby, bezpečnostní nádoby a podtlakové pumpy generující požadovaný přesný podtlak.

Instrument byl vyroben ve firmě Plašil lékařské nástroje, Častolovice podle návrhu řešitele. Podstatou instrumentu je dvoucestný tubus, jehož dvě trubičky (aspirační trubička a aplikační trubička) jsou spojeny těsně před konusem, na který je nasazována výměnná aspirační jehla. Na zadní konec aspirační trubičky se připojuje podtlakový systém aspirační soustavy pro sonografický transvaginální odběr oocytů (ovum pick up, OPU) pro aspiraci obsahu cílového folikulu. Na zadní konec aplikační trubičky se napojuje hadička s injekční stříkačkou pro aplikaci proplachu do aspirovaného folikulu. Instrument umožňuje nejprve odsát obsah cílového folikulu přes aspirační trubičku, pak jeho dutinu opět naplnit přes aplikační trubičku a znovu odsát přes aspirační trubičku. K experimentům lze využít běžné technické vybavení pro OPU, pouze držák jehly je nahrazen novým instrumentem.

Ověření funkce nástroje v laboratorních podmínkách:

V této studii byly použity kumulo-oocytární-komplexy (COC's) získané z vaječníků pocházejících z jatek. Vaječnický z poražených zvířat byly do laboratoře transportovány v temperovaném fyziologickém roztoku při 30 °C během 3 hodin po odběru. V laboratoři byly vaječnický promyty ve fyziologickém roztoku a následně v médiu PBS. Kumulo-oocytární komplexy byly získány metodou slicing. Povrch vaječnicků byl rozřezán žiletkovým nožem nad miskou obsahující slicing médium. Po dalším zpracování média byly oocyty vyhledány pod stereomikroskopem.

Oocyty byly aspirovány do inseminačních pejet ve skupinách po 10 kusech za využití speciálního aspirátoru. Intrafolikulární transfer oocytů (IFOT) byl proveden do dominantních folikulů o průměru cca 15 mm, přítomných na jatečných vaječnickách, za použití originálního nástroje vyvinutého na pracovišti řešitele.

Za 15 – 30 minut po injekci byl obsah ošetřených folikulů reaspirován s využitím testovaného nového nástroje. U kontrolní skupiny byla provedena jednoduchá aspirace, u pokusné skupiny byl po aspiraci proveden výplach dutiny folikulu. Počet reaspirovaných oocytů byl zjišťován ve stereomikroskopu.

Ověření funkce nástroje v podmínkách in vivo:

Oocyty byly připraveny do pejet ve skupinách po 10 ks stejným způsobem jako v laboratorní části. Krávy byly synchronizovány i. m. aplikací cloprostenolu (500 µg) a následnou i. m. aplikací GnRH (50 µg) o 48 hodin později. Druhá aplikace cloprostenolu byla provedena o 11 dní později s následnou druhou aplikací GnRH za 48 hodin. Za dalších 24 hodin byl u krav s prokázaným preovulačním folikulem o průměru alespoň 10 mm proveden IFOT. Během procedury byly krávy umístěny v kleci s omezením pohybu do stran. Ocas byl zafixován, vyprázdněno rektum a perianální oblast očištěna a vydesinfikována. Na aktivní plochu ultrazvukové sondy bylo aplikováno malé množství sonografického gelu a sonda byla kryta latexovou ochranou. Držák sondy společně s upevněným pracovním kanálem byl kryt rektální rukavicí pro zachování vyšší hygieny procesu IFOT. Držák byl zasunut do pochvy a umístěn dorzo-kraniálně. Vaječnický nesoucí preovulační folikul byl jemnou rektální manipulací umístěn před aktivní plochu sondy. Rotací vaječnicku bylo zajištěno, že vlastní IFOT byl proveden přes stroma vaječnicku před dosažením dutiny folikulu pro omezení úniku folikulární tekutiny po injekci. Předehřátý injektor s pejetou obsahující oocyty byl vložen do pracovního tubusu fixovaného k držáku sondy. Přes poševní stěnu a peritoneum byl proveden vpich jehlou opatrně, ale energicky do dutiny folikulu. V momentě, kdy jehla dosáhla centra folikulu, pomocník pomalým pohybem pístu injikoval obsah pejety do dutiny folikulu. Přitom byl pozorován echogenní vír obsahu folikulu. Jehla byla vytažena bezprostředně po provedení IFOT a stabilita folikulu byla pozorována na obrazovce ultrazvuku.

Za 24 hodin byla provedena reaspirace obsahu ošetřených folikulů pomocí metody OPU s použitím testovaného nástroje. U kontrolní skupiny byla provedena jednoduchá aspirace, u pokusné skupiny opakovaná aspirace.

Dosažené výsledky projektu B)

V laboratorní části projektu bylo provedeno 62 akcí IFOT, celkem bylo přeneseno 620 oocytů. V kontrolní skupině (n=31) bylo reaspirováno 172 oocytů (po odpočtu vlastního oocytu), tj. 55,5%. V pokusné skupině (n=31) bylo reaspirováno 213 oocytů (po odpočtu vlastního oocytu), tj. 68,7%. Rozdíl mezi skupinami byl statisticky průkazný (dvouvýběrový Mann-Whitney test, $p < 0,05$).

V podmínkách in vivo bylo provedeno 19 akcí IFOT, celkem bylo přeneseno 190 oocytů.

V kontrolní skupině bylo (n=8) reaspirováno 33 oocytů (po odpočtu vlastního oocytu), tj. 41,3%.

V pokusné skupině (n=11) bylo reaspirováno 42 oocytů (po odpočtu vlastního oocytu), tj. 38,2%.

Nebyl prokázán rozdíl mezi skupinami.

Byla prokázána funkčnost nového nástroje pro opakovaný výplach dutiny folikulu umožňující vyšší zisk při reaspiraci oocytů po předchozím intrafolikulárním transferu. Opakovaný výplach dutiny folikulu je možný. V laboratorních podmínkách byl prokázán signifikantně vyšší zisk po reaspiraci oocytů v pokusné skupině. V podmínkách in vivo nebyl tento rozdíl potvrzen. Zde bude potřeba provést více akcí k eliminaci individuálních podmínek reaspirace in vivo, které proces reaspirace ovlivňují.

Popis a metodika řešení projektu C)

Studii na živých býcích předcházela studie na varlatech odebraných od kastrováných pohlavně dospělých jedinců. Vzhledem k obtížnému získání varlat od pohlavně dospělých býků byla použita varlata pohlavně dospělých kozlů, kteří byli přivezeni na Kliniku chorob přežvýkavců za účelem kastrace. Ihned po kastraci byly z varlat odebírány vzorky 8 mm a 4 mm bioptickou jehlou a jehlou Tru cut. Získané vzorky byly okamžitě po odběru umístěny do fyziologického roztoku, nebo do kapacitačního ředidla. V laboratoři byla následně sledována koncentrace spermií, motilita v závislosti na použitém roztoku a odběrové jehle. Současně byla sledována reakce spermií na přidání 5M či 40M roztoku theofylinu, který podle dostupných zdrojů pozitivně ovlivňuje motilitu spermií. Na základě získaných poznatků byla následně definována metodika odběrů na živých býcích. Býci holštýnského skotu (6 kusů) měli být nakoupeni již jako 2 měsíční, vzhledem k nízkému rozpočtu byli pouze zapůjčeni býci nacházející se toho času na Klinice chorob přežvýkavců (4ks – jeden plemene české strakaté a tři holštýnského plemene). Pokus byl zahájen u býků ve věku 6 měsíců (začátek října), kdy je očekáván nástup spermatogeneze. Odběry varletní tkáně jsou prováděny v intervalu 1 měsíce vždy současně bioptickou jehlou o průměru 4 mm a bioptickou jehlou Tru cut (vzhledem k malé ploše varlat nebylo možné provést současně i odběr bioptickou jehlou 8 mm). Veškeré odběry probíhají v sedaci xylozinem (0,02mg/kg), epidurální anestezii lidokainem 2ml pro toto a lokální anestezii semenného provazce lidokain 2ml pro toto. Pozákladová analgezie je poskytována třídenním podáváním NSAID. Odběrová místa jsou volena následovně: pravé varle kraniální strana, levé varle kraniální strana, pravé varle kaudální strana a levé varle kaudální strana. Celkem bude tedy každou metodou získáno 16 bioptických vzorků. Vzorky jsou vloženy do Ependorfovy zkumavky s kapacitačním ředidlem o objemu 1ml. Bioptické vzorky jsou vyšetřeny pod mikromanipulačním mikroskopem a je hodnocena kvalita získaného vzorku, použitelnost odebraných spermií (vyšetřován celkový počet – pouze odhadem a motilita) a reakce na použití 5M či 40M roztoku theofylinu. V průběhu pokusu jsou zaznamenávány reakce varletní tkáně po biopsiích. Prozatím proběhly tři odběry. Měsíc po ukončení odběrů budou býci vykastrováni a varletní tkáň bude morfologicky zhodnocena, zároveň bude sledována reakce varletní tkáně při použití sutury po biopsii, či použití kolagenové výplně Gelita Spon namísto sutury.

Dosažené výsledky projektu C)

Při studii vlastností bioptické tkáně varlat odebraných od pohlavně dospělých kozlů bylo vyšetřeno 60 vzorků. Při prvních odběrech bylo zjištěno, že dochází k výraznému samovolnému uvolňování spermií z tkáně do použitého roztoku, koncentrace spermií vyplavených do roztoku byla u všech bioptických metod stejná. Současně byl pod mikromanipulačním mikroskopem nalezen masivní nález spermií ve spermatogenním epitelu ve všech odebraných vzorcích. Při porovnávání motility spermií v návaznosti na použitý roztok se jeví výrazně lepší kapacitační ředidlo. Spermie zde dosahovali přibližně 10 % motility, zatím co ve fyziologickém roztoku byly ve většině vzorků nepohyblivé. Při srovnávání působení 5M a 40M roztoku theofylinu (poměr 1:1 – kapka 20 μ l vzorku s 20 μ l theofylinu) se jevil nepatrně lepší 40M roztok, rozdíly ale nebyly nijak výrazné, nejméně výraznější motilita byla pozorována u spermií odebraných ze zkumavky s kapacitačním ředidlem s přidáním 40M theofylinu. Typ bioptické jehly, kterou byl vzorek odebrán, zde neměl žádný vliv.

Počátkem října, kdy pokusní býci dosáhli 6měsíců (jeden 7 měsíců), jsme započali s bioptickými odběry. Vzhledem k velikosti varlat a vzhledem k tomu, že metoda Tru cut i 4 mm bioptická jehla byly v předchozí studii dostačující k získání validního vzorku, jsme upustili od biopsie 8 mm bioptickou jehlou. Od každého býka při jedné akci byly vždy získány 2 vzorky, které byly vloženy do endendorfovy zkumavky s kapacitačním ředidlem o objemu 1ml. Samotný zákrok v sedaci, lokální i epidurální anestezii zvládali býci velice dobře. Bohužel následující dny došlo ke zvýšení teploty u všech býků i přes terapii NSAID a bylo jim tedy podáno antibiotikum penicilinové řady. Dva býci však pravděpodobně měli na toto ATB nepřiměřenou reakci, kdy se jednomu býkovi vyvinul výrazný

otok v místě aplikace s následnou abscedací a druhý býk na následky, pravděpodobně anafylaktického šoku, v následujících dnech uhynul. Nyní jsou tedy v pokusu 3 býci. Druhý odběr již proběhl bez komplikací, obdobně jako třetí. Rány po kastracích se hojí velmi dobře, varlata jsou v prvních dnech mírně citlivá, avšak bez výraznějšího otoku.

V prvních odběrech nedošlo ani u jednoho býka k vyplavení spermií do roztoku. Při třetím odběru bylo nalezeno u býka č.4 (nejstarší nyní 9 měsíční býk) v kapacitačním roztoku neparné množství vyplavených nepohyblivých spermií, a to jak ve vzorku odebraném tru cut jehlou, tak 4 mm bioptickou jehlou. Při prohlížení vzorků varletní tkáně pod mikromanipulačním mikroskopem bylo v prvních odběrech u dvou býků nalezeno pouze malé množství nepohyblivých spermií, u dalších dvou býků byla nalezena poměrně velká koncentrace taktéž nepohyblivých spermií. Postupně během odběrů narůstala ve vzorcích koncentrace spermií. Nejméně spermií v tuto dobu má býk č.1(plemene česká straka), kde je udáván pomalejší nástup spermiogenezy ve srovnání s holštýnským plemenem. Žádný vzorek z prvního ani z druhého odběru nereagoval na podání ani jedné z koncentrací theofylinu. Při třetím odběru byl u býka č.4 zaznamenán ojedinělý pohyb spermií po přidání jak 5M, tak 40M roztoku theofylinu.

Čtvrtý odběr a poslední odběr je plánován na konec ledna a ke konci února bude provedena kastrace a následně budou varlata zhodnocena dle metodiky.

Použití Tru cut jehly vyžaduje jistou zručnost a ne vždy se podaří odběr dostatečného množství tkáně a je potřeba odběr opakovat. Zároveň negativem je i vyšší pořizovací cena. Výhodou je slabší krvácení po vpichu a není zde nutnost provádět suturu. Odebraná velikost vzorku je dostačující pro maximálně jednu vyšetřovací metodu (otiskový preparát, histologický vzorek apod).

U použití kožní bioptické jehly 4mm je snazší manipulace, avšak je potřeba si více připravit plochu pro biopsii – rozvěrač, založení stehu. Zároveň rána po biopsii velmi krvácí. Velkou výhodou představuje velký vzorek, jež můžeme využít na více vyšetření. Taktéž cena je přibližně čtvrtinová ve srovnání s Tru cut jehlou.

Zatím můžeme konstatovat, že bioptickou jehlou o průměru 4 mm i jehlou Tru cut jsme schopni odebrat dostatečně velký vzorek, ze kterého jsme následně schopni pomocí mikromanipulace získat spermii. Spermie je možné získat již od býků ve stáří 6 měsíců, avšak v této době jsou zatím nepohyblivé, nereagující ani na theofylin. Schopnost oplození je u takovýchto spermií pravděpodobně omezena pouze na použití pro ICSI. Pro potvrzení hypotézy je nutno provést další výzkum. Obě metody odběru jsou proveditelné v běžných terénních podmínkách za dodržení asepse, aniž bychom tím narušili celkový zdravotní stav zvířete, či funkci varlat. Přesnější závěry budeme mít až po ukončení pokusu a morfologickém zhodnocení varlat.

Popis a metodika řešení projektu D)

Metodika D)

Ve 3 vybraných chovech krav byl sledován metabolický profil vysokobřezích krav se zaměřením na faktory ovlivňující kvalitu kolostra. U krav s diagnostikovanými karencemi mikronutrientů byla provedena suplementace těchto živin. Bezprostředně po porodu byla stanovena a kvalita kolostra, včetně koncentrace imunoglobulinů, vitaminů a stopových prvků a dále faktorů jako je TNF a IGF. Analýzy byly prováděny metodami používanými v KLVZ. U telat byla sledována úroveň kolostrální imunity a jejich zdravotní stav po dobu mléčné výživy. Získané výsledky byly statisticky zpracovány a vyhodnoceny.

Dosažené výsledky projektu D)

Zdravotní stav vysokobřezích krav byl ve 2 chovech relativně dobrý. Vyskytovala se karence vit E, ojediněle mírná karence mědi a fosforu. V chovu č. 3 se vyskytovala již před porodem mírná steatóza

jater, která se v poporodním období zvyšovala. Rovněž byla diagnostikována karence vit E, dále betakarotenu a selenu.

Kvalita kolostra byla v chovu 1 a 2 relativně dobrá. Hodnota %Brix kolostra z prvního nádoje se pohybovala od 19,3, do 25,3. V chovu č. 3 byly hodnoty Brix nižší a pohybovaly se od 16,5 do 21,4%. V dalších nádojích hodnoty Brix se významně snižovaly ve všech chovech. Koncentrace celkové bílkoviny v seru kolostra byla rovněž v chovu č. 1 a 2 vyšší než v chovu č.3. Koncentrace imunoglobulinů korelovala s hodnotami %Brix. Koncentrace stopových prvků- Mn, Cu a Fe byly variabilní, relativně stabilní byly hodnoty zinku. Značná variabilita byla zjištěna i v koncentraci vit. A, E, a beta karotenu a to ve všech sledovaných chovech. Koncentrace TNF a IGF v kolostru z prvního nádoje byly velmi variabilní a nekorelovaly s hodnotami Brix,

Kolostrální imunita byla stanovena na základě koncentrace IgG v krevním séru telat v období 3 až 6 dnů stáří. V chovu č. 1 a 2 byly hodnoty IgG významně vyšší u většiny telat. Pohybovaly se od 10,8 do 13,6, zatím co u telat v chovu tři byla zjištěna subnormální koncentrace IgG u 40% telat. V chovu č. 3 byla prokázána zvýšená koncentrace mykotoxinů, což mohlo ovlivnit kvalitu kolostra i kolostrální imunitu.

Popis a metodika řešení projektu E)

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany): Na kliniku chorob prasat byli dovezeni pacienti v rámci PP pokusu na výuku. Jednalo se o selata starší 7 dní, nekastrované samce, kteří byli vyřazeni z různých důvodů z chovu pro účely výuky. Celkové počty vyšetřovaných selat tak závisely na kapacitě výukových stájí a možnosti chovatele takto definovaná selata poskytnout. Selata byla řazena do 4 skupin. Skupina A bude představovala selata, kterým byl před zákrokem aplikován látka ketamin i.m. dle dávkování uvedeného v příbalovém letáku, 20 minut před zákrokem. Skupinu B tvořila selata, jimž byl před zákrokem aplikován ketamin a azaperon i.m. dle dávkování uvedeného v příbalovém letáku, 20 minut před zákrokem. Skupina C představovala selata, jimž byl 20 min před zákrokem aplikován ketamin i.m., a posléze 5 min před zákrokem do semenného provazce lidokain 2% roztok Skupinu D zastupovala selata, kterým byl aplikován ketamin i.m. 20 min před zákrokem a meloxicam i.m. 60 minut před zákrokem. Všem selatům byla odebírána krev z vena cava cranialis s bezprostředním provedením dezinfekce kůže před a po zákroku a dostatečně dlouhou dobou byla provedena komprese hned po odběru, tak aby se co nejvíce zabránilo vzniku hematomu. Krev byla odebrána vždy před zákrokem a vždy po provedení zákroku. Vzorky nesrážlivé krve (EDTA) byly bezprostředně vyšetřeny v Klinické laboratoři pro velká zvířata na stanovení hematologických parametrů. Byl vyhotoven a zhodnocen tzv. stresový leukogram (odběr po 60 minutách od zákroku). Hladiny glukózy v periferní krvi jsme měřili ihned po odebrání vzorku krve stájovým glukometrem.

Dosažené výsledky projektu E)

Dohromady bylo použito 24 ks selat starších 7 dní. Jednalo se o nekastrované kance původně určených k výuce studentů na Klinice chorob prasat. Tyto selata pak byla během řešení pokusu rozdělena do 4 skupin (A, B,C, D) dle výše popsané metodiky. V každé skupině tedy bylo celkem 6 kanečků. V naší studii jsme se zaměřili hlavně na vyhodnocení stresového leukogramu, a to cca hodinu po kastrovém zákroku. Proto bylo nutné pro přesnější interpretaci výsledků odebrat krev min. 20 min před vlastním chirurgickým zákrokem. Stresový leukogram je převážně charakterizován jako neutrofilie, lymfopenie, eozinopenie a případně monocytóza. Dále je obvyklou reakcí na stres zvýšená hladina glukózy. V naší studii to byla právě glukóza tím nejcitlivějším markerem stresové reakce zvířete. Ve všech skupinách se zvedla hladina glukózy, a to v průměru ze 4,5 mmol/l před zákrokem na 6,4 mmol/l hodinu po kastroci. Ve skupině D však byly prokázány nejmenší rozdíly. Dále jsme po chirurgickém zákroku pozorovali ve všech třech skupinách (A, B, C) mírnou neutrofilii. Počet ITA VETUNI Brno 3 granulocytů se pohyboval lehce nad horní hranici referenčního rozmezí, tj. kolem 12

– 13 109 /l. v počtu lymfocytů, eozinofilů a monocytů nebyly nikterak pro náš účel podstatné. Ve skupině D jsme nenalezli žádnou významnou alteraci v hematologických parametrech. Z našich výsledků je patrné, že největší význam na snížení stresové reakce u selat má aplikace ketaminu 20 min a meloxicamu 60 min před chirurgickou intervencí. Nevýhodou této kombinace však zůstává nutná dávka nesteroidního antiflogistika aspoň hodinu před vlastním zákrokem, dále pak monoanestezie ketaminem, která má často vedlejší účinky v podobě hyperexcitace, tremoru až křečí. Přínos projektu (max. 5 řádků): Projekt představuje rozšíření spolupráce s terénními veterinárními lékaři, rozšíření povědomí o stále nedořešené otázce kastrace selat s použitím anestezie a analgezie u odborné veřejnosti i chovatelů prasat. Zlepšila se tak informovanost chovatelů a producentů potravinových zvířat. Zhodnotil se dopad použitých látek určených k anestezii a analgezii prasat na životní pohodu zvířat. Jedná se o další navázání na dlouhodobou spolupráci s Klinickou laboratoří pro velká zvířata na VFU. Výsledky projektu přinesly nové informace a pohledy na zlepšení welfare selat po porodu, zejména v průběhu kastrace selat v produkčních chovech.

Přínos projektu E)

Řešení projektu poukázalo na význam syndromem rhabdomyolýzy, problematiku etiologie, diagnostiky a prevence tohoto syndromu u koní. Přineslo praktické poznatky při získávání oocytů a ověření metod získání spermií metodou TESE (testicular sperm extraction) či MESA. Řešení projektu upozornilo na problematiku kvality kolostra v různých chovech a prokázalo nízkou koncentraci IgG v kolostru a sníženou kolostrální imunitu u telat v prvním týdnu života. Sledování upozornilo na značnou variabilitu koncentrace vitamínu E, Mn, Cu a Fe v kolostru. Kastrace kanečků ovlivnila leukogram který je důsledkem stresu a je převážně charakterizován jako neutrofilie, lymfopenie, eozinopenie a případně monocytóza. Dále byla zjištěna výrazná hyperglykémie. V naší studii byla právě glukóza tím nejcitlivějším markerem stresové reakce

Využití výsledků

Získané výsledky budou publikovány ve vědeckých a odborných časopisech, budou využívány ve výuce a v řešení zdravotních problémů v chovech koní skotu a prasat.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků: Část výsledků je již připravena pro zveřejnění ve vědeckých časopisech.

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	913 560,00	913 560,00
Služby	30 000,00	30 000,00
Cestovné	15 000,00	15 000,00
Další provozní náklady	654 734,00	654 734,00
Doplňkové náklady	241 994,00	241 994,00
Celkem	1 855 288,00	1 855 288,00

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

(komentář k čerpání finančních prostředků na řešení projektu – slovní popis v členění jednotlivých položek nákladů a konkrétní výčet, na co byly prostředky využity, komentář a zdůvodnění případných změn a rozdílů oproti schválenému rozpočtu projektu)

Osobní náklady: zahrnovaly mzdy řešitelů a stipendia

Služby: finanční prostředky sloužily k hrazení oprav přístrojů

Cestovné: byly hrazeny pohonné hmoty a cestovní výdaje do sledovaných chovů

Další provozní náklady: nákup chemikálií, biochemických setů, kontrolní séra, katetry, krmiva

Doplňkové náklady: byly stanoveny ekonomickým útvarem VETUNI

Čerpání finančních prostředků odpovídalo schválenému rozpočtu projektu, bylo hospodárné, náklady nebyly překročeny, byl dodržen plán čerpání bez přesunů mezi jednotlivými položkami

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě doložte výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

9. Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VETUNI bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis 10.1.2022

řešitele projektu: Doc. MVDr. Josef Illek, DrSc., Dipl. ECBHM.

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis 10.1.2022

člena řešitelského týmu odpovědného za čerpání prostředků: Doc. MVDr. Josef Illek, DrSc.

Přednosta ústavu nebo kliniky, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu nebo klinice, respektive celoškolském pracovišti, které řídí.

Datum, jméno a podpis 10.1.2022

přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Doc. MVDr. Josef Illek, DrSc., Dipl. ECBHM.

Datum, jméno a podpis 10.1.2022

správce rozpočtu: Ing. Vladimír Kohoutek

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis 10.1.2022

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

doc. MVDr. Michal Crha , Ph.D.

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2021

(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu: 2021ITA15

2. Název projektu:

Vliv antibiotik a nesteroidních antiflogistik na trávicí trakt a imunitní systém králíka

3. Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: doc. MVDr. Vladimír Jekl, Ph.D., DipECZM (Small Mammal)
Evropsky uznávaný specialista v oboru nemoci drobných savců

Fakulta/celoškolské pracoviště: FVL

E-mail: jeklv@vfu.cz; VladimírJekl@gmail.com

Telefon: +420732615647

4. Řešitelský kolektiv:

složení řešitelského týmu: (akademičtí pracovníci a jejich příslušnost k ústavům nebo klinikám fakulty nebo výzkumným skupinám CEITEC, studenti DSP) a forma zapojení každého člena řešitelského týmu

Řešitelem projektu je doc. MVDr. Vladimír Jekl, Ph.D., DipECZM (Small Mammal), docent Sekce morfologie, fyziologie a farmakologie. Projekt byl koncipován tak, že integroval a zastřešoval několik směrů výzkumu v Sekci morfologie, fyziologie a farmakologie). Řešitelský kolektiv zahrnoval jak zkušené odborníky (2 profesori, 2 docenti, 9 odborných asistentů), tak mladé vědecké pracovníky a studenty (5 DSP studentů) a studenty magisterského programu (min. 2 studenti) VFU Brno. Společným jmenovatelem dílčích cílů byla problematika morfologie a fyziologie GIT králíků v souvislosti s perorální aplikací pradofloxacinu a nesteroidních antiflogistik (meloxicam). Projekt byl koncipován tak, aby se jednotlivá témata mohla řešit paralelně s aktivním zapojením všech pracovníků participujících na projektu. Řešitelský kolektiv byl proto rozdělen na tři týmy, jejichž kooperaci zajišťoval řešitel projektu. Kooperace týmů byla realizována zejména na úrovni odběru vzorků, sdílení metod, výsledků a přístrojového vybavení a diskusí všech zúčastněných nad jednotlivými částmi projektu.

Tým projektové části A (Ústav farmakologie a farmacie)

Doc. MVDr. Vladimír Jekl, Ph.D., DipECZM (Small Mammal) (100 %), doc. Ústavu farmakologie a farmacie, řešitel projektu, je vedoucím experimentu, odpovídá za kooperaci jednotlivých týmů, odběry vzorků, komunikaci s osobami zajišťujícími zhodnocení farmakokinetiky pradofloxacinu

MVDr. Jan Chloupek, Ph.D., přednosta Ústavu farmakologie a farmacie, proděkan FVL pro pedagogickou činnost (100 %), je zástupce vedoucího experimentu, odpovídá za personální zvládnutí ustájení experimentálních zvířat, podílí se na obou dílčích částech experimentu.

MVDr. Pavel Svoboda, DSP student, participace na odběrech a analýzách vzorků

Tým projektové části B (Ústav fyziologie, Klinická laboratoř pro malá zvířata)

Prof. MVDr. Jaroslav Doubek, CSc. (100 %) – konzultant/expert s bohatými zkušenostmi v oblasti laboratorní diagnostiky, vč. analýz hormonů, přednosta Ústavu fyziologie a Klinické laboratoře pro malá zvířata na VFU Brno

MVDr. Pavla Hamouzová, Ph.D., odborný asistent (100 %), věnuje se výzkumu fyziologie imunitního systému, odpovídá za provádění analýz průtokovou cytometrií, včetně interpretace výsledků

MVDr. Šárka Stehlíková, Ph.D., odborný asistent (50 %), participace na zpracování vzorků pro rutinní laboratorní vyšetření a na provádění analýz průtokovou cytometrií

MVDr. Jana Doležalová, Ph.D., odborný asistent (100 %), navazuje na svoji předchozí výzkumnou činnost (viz publikace WOS, nejaktuálnější k tématu: General and Comparative Endocrinology 2019; 282: 113210), odpovídá za zpracování vzorků pro hormonální, molekulární a imunoanalýzy

MVDr. Petra Bakulová, Ph.D. (100 %) - odborný asistent (Ph.D. 12/2018), participace na hormonálních analýzách vzorků a interpretace výsledků

MVDr. Lucia Černá, DSP student (3. ročník), participace na odběru a zpracování vzorků pro rutinní laboratorní vyšetření a na provádění analýz průtokovou cytometrií

MVDr. Sabina Štouračová, DSP student (3. ročník), participace na zpracování vzorků pro rutinní laboratorní vyšetření a provádění molekulárních a imuno-analýz

MVDr. Kristína Řeháková, Ph.D., odborný asistent (100%), vedoucí Klinické laboratoře pro malá zvířata, odpovídá za zajištění rutinních vyšetření krve a zavedení a optimalizaci průtokové cytometrie a interpretaci výsledků

Tým projektové části C (Ústav AHE)

Prof. MVDr. František Tichý, CSc. (profesor, 100 %) – sekční rada, prof. histologie a embryologie se zkušenostmi v oblasti mikroskopické stavby GIT a močového systému v normě i v patologii.

Doc. MVDr. Václav Páral, Ph.D. (100%) – doc. anatomie, konzultant/expert s bohatými zkušenostmi v oblasti anatomie GIT, vedoucí odd. Anatomie na ÚAHE.

MVDr. Petr Čížek, Ph.D. (100%) – odborný asistent, pracovník skupiny se zkušenostmi v oblasti histologie GIT, bude zodpovědný za analýzu histologických výsledků

MVDr. Martin Pyszko, Ph.D. (100%) - odborný asistent, pracovník skupiny zodpovědný za získání a makroskopickou analýzu resekátů jednotlivých orgánů GIT.

MVDr. Kristýna Glocová, Ph.D. (100%) - začínající odborný asistent s bohatou metodickou zkušeností z DSP, participace na provádění metod a analýze výsledků

MVDr. Ivana Pračková - student DSP, 2. ročník, participace na provádění metod a analýze výsledků (školitel: doc. Páral, školitel specialista: Dr. Kyllar, Ph.D.)

MVDr. Ondřej Horák - student DSP, 2. ročník, participace na provádění metod a analýze výsledků (školitel: doc. Páral, školitel specialista: Dr. Pyszko, Ph.D.)

5. V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu:

Do projektu byly zapojeny tři ústavy v rámci Sekce morfologie a fyziologie, kde hlavním řešitelem byl zástupce Ústavu farmakologie a farmacie. Projekt vycházel z jejich dlouhodobého vědecko-výzkumného zaměření a byl založen na vzájemné kooperaci zastřešující tematiku vlivu podání pradofloxacinu a meloxicamu na gastrointestinální trakt a imunitní systém králíka.

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Hlavním předmětem řešení projektu bylo stanovení bezpečnosti použití pradofloxacinu u králíků po jeho perorálním podávání v monoterapii a v kombinaci s meloxicamem, na základě stanovení jeho farmakokinetiky a zhodnocení jeho případného negativního vlivu na organismus se zaměřením na trávicí trakt a imunitní systém. Téma projektu je v souladu s dlouhodobým zaměřením výzkumu všech ústavů v rámci sekce. Projektové cíle byly založeny na publikovaných výsledcích zúčastněných pracovišť a nejaktuálnějších (dosud nepublikovaných) poznatcích. Tato bezprostřední návaznost byla nezbytná pro dosažení stanovených cílů v relativně krátké době trvání projektu. Z toho důvodu byl také projekt navržen ve formě 2 fází projektu, které vzájemně na sebe navazovaly.

Práce na projektu významně přispívá k dalšímu vzdělávání všech členů projektu, a to nejen v oblasti vědy a výzkumu, ale také v rámci aplikace získaných poznatků do klinické veterinární praxe. Výsledky výzkumu jsou součástí primárního výzkumu FVL VFU Brno, a to konkrétně v rámci využití a vlivu antibiotik na králíka nejen jako zvířete chovaného ze záliby, ale i laboratorního a faremně chovaného zvířete. Výsledky výzkumu budou zařazeny do výuky studentů FVL VFU Brno v rámci předmětů týkajících se problematiky farmakologie a laboratorní diagnostiky chorob králíků.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

1. Stanovení farmakokinetiky pradofloxacinu u králíků po jeho perorální aplikaci; **2.** Sledování stresové reakce králíků na opakovanou manipulaci a odběry krve neinvazivní metodou z fečes (stanovení metabolitů kortizolu) v korelaci s hladinami kortikoidů v krvi.; **3.** Posouzení vlivu perorální aplikace pradofloxacinu, meloxicamu a jejich kombinace na zdravotní stav králíka, na mikrobiom střeva a histomorfologii GIT králíka.; **4.** Posouzení vlivu meloxicamu na imunitní systém.

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany):

Experiment po jeho schválení příslušnými autoritami VFU Brno a Ministerstva Zemědělství ČR proběhl ve dvou fázích. V první fázi byl jednorázově perorálně podán pradofloxacin králíkům v dávce 7,5 mg/kg a byla stanovena farmakokinetika tohoto antibiotika, a to na základě opakovaného odběru krve. V první fázi byl také sledován vliv opakovaného odběru krve a manipulace s králíky na zvýšení hladin kortizolu v krvi a v trusu.

V druhé fázi byl králíkům perorálně aplikován pradofloxacin 1x/den po dobu 14 dnů v kombinaci s meloxicamem nebo samostatně. U skupiny králíků, kterým byl aplikován meloxicam byl pomocí průtokové cytometrie sledován vliv na zastoupení subpopulací T lymfocytů a na jejich aktivaci. V průběhu a na konci experimentu byl získány vzorky trusu na stanovení střevního mikrobiomu a markerů zánětu trávicího traktu králíka. Na konci experimentu byla pokusná zvířata humaně utracena a byly odebrány vzorky tkání (plíce, ledviny, játra, žaludek, duodenum, ileum, cékum, appendix, colon descendens) na histomorfologické vyšetření a posouzení bezpečnosti použití pradofloxacinu a meloxicamu u králíků. Podrobněji viz projekt pokusu a návrh ITA.

Dosažené výsledky projektu (max. 1/2 strany):

Byla stanovena farmakokinetika pradofloxacinu u králíků po jeho perorální aplikaci v dávce 7,5 mg/kg (viz tabulka).

Animal	C_{max} (ng.mL ⁻¹)	T_{max} (hr)	k_{el} (hr)	$t_{1/2}$ (hr)	AUC_t (ng.hr.mL ⁻¹)	AUC_i (ng.hr.mL ⁻¹)	residual area (%)	AUMC (ng.hr ² .mL ⁻¹)	MRT (hr)
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Arithmetic mean	938.2	0.5	0.200	3.9	2 886.7	3 003.0	3.91	14 159.1	4.7
SD	364.2	0.2	0.070	1.4	581.8	597.1	0.87	5 651.7	1.5
CV (%)	38.8	39.3	35.0	35.3	20.2	19.9	22.4	39.9	31.0
Median	762.4	0.5	0.195	3.7	2 834.1	2 979.7	4.01	12 065.1	4.7
Geometric mean	888.3	0.5	0.189	3.7	2 834.5	2 950.0	3.82	13 386.2	4.5
Harmonic mean	849.4	0.5	0.179	3.5	2 781.7	2 896.4	3.73	12 793.8	4.3
Minimum	656.2	0.3	0.117	2.3	2 011.2	2 103.1	2.61	9 406.9	2.8
Maximum	1 717.5	1.0	0.296	5.9	3 746.0	3 888.4	5.20	26 683.1	6.9
Exp (mean±SD, LN-data)	633.8	0.3	0.132	2.6	2 306.5	2 406.7	3.03	9 524.3	3.3
	1 245.0	0.7	0.271	5.3	3 483.3	3 616.0	4.83	18 814.0	6.3
90 % Confidence interval	706.9	0.4	0.155	3.0	2 517.3	2 623.9	3.36	10 570.4	3.8
	1 169.4	0.7	0.244	4.8	3 256.2	3 382.2	4.47	17 747.8	5.7

Při porovnání kontrolní skupiny (placebo, fyziologický roztok) a králíků, kterým byl aplikován subkutánně meloxicam (1 mg/kg s.c. q24h), bylo u experimentální skupiny zjištěno statisticky významné ($P < 0,05$) snížení množství procenta aktivovaných T-lymfocytů a B-lymfocytů v den 7 a den 14. U experimentální skupiny bylo zjištěno v průběhu 14 dnů aplikace meloxicamu signifikantní

zvýšení procenta Tc lymfocytů ($P < 0,05$), zvýšení procenta leukocytů exprimujících CXCR3 a snížení procenta aktivovaných T-lymfocytů a B-lymfocytů. K celkovým změnám procenta B- a T- lymfocytů nedošlo.

Histopatologickým vyšetřením tenkého střeva, céka a kolonu byl zjištěn po jednorázové aplikaci infiltrace submukózy větším množstvím eozinofilů. Další vzorky s gastrointestinálního traktu se dále zpracovávají.

Zjištění vlivu perorální aplikace pradofloxacinu, meloxicamu a jejich kombinace na zdravotní stav králíka, vliv na mikrobiom střeva je ve stádiu zpracovávání výsledků. Vliv opakovaného odběru krve na vznik stresu je také ve stádiu zpracovávání výsledků.

V souvislosti s řešenou problematikou změn GIT u králíka byl již publikován článek „Jekl et al. Case Report: Spontaneous appendicitis with suspected involvement of *Klebsiella variicola* in two pet rabbits. *Frontiers of Veterinary Science*, 2021;8:779517, DOI: 10.3389/fvets.2021.779517,“ IF=3,412, Q1.

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Základním výstupem je publikace výsledků v časopisech s IF. Přínosem projektu bylo získání původních vědeckých výsledků, které budou prezentovány na zahraničních konferencích, začleněny do výuky studentů VETUNI Brno a dále diskutovány při projektové obhajobě. Nemalým přínosem projektu je také kooperace víceoborového týmu se začleněním mladých vědeckých pracovníků a pokračování a integrace vědecko-výzkumné činnosti v rámci sekce a VETUNI Brno.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Výsledky projektu budou publikovány ve vědeckých časopisech s IF (v souvislosti s řešenou problematikou byl již publikován článek ve *Frontiers of Veterinary Science*, IF=3,412, Q1). Výsledky budou dále prezentovány na odborných konferencích a dále poslouží pro informování veterinární veřejnosti o možnosti využití pradofloxacinu při terapii infekčních onemocnění u králíků. Výsledky projektu budou integrovány do výuky studentů VETUNI Brno a poslouží pro další zkvalitnění výuky.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

Již publikováno:

JEKL V., PISKOVSKA A., DRNKOVA I, SKORIC M, HAUPTMAN K., CHLOUPEK J. Case Report: Spontaneous appendicitis with suspected involvement of *Klebsiella variicola* in two pet rabbits. *Frontiers of Veterinary Science*, 2021;8:779517, DOI: 10.3389/fvets.2021.779517, **IF=3,412, Q1**

Další předpokládané publikace

- Pharmacokinetic study of pradofloxacin after oral administration in rabbits. *BMC Veterinary Research*
- Changes in rabbit lymphocyte subpopulations and activation following long-term administration of meloxicam, *Veterinary Immunology and Immunopathology*
- Effect of oral pradofloxacin administration on clinical health, intestinal pathomorphology and intestinal microbiota of rabbits. *Veterinary Microbiology*
- Stress response of rabbits after repeated blood sampling, *Animals*

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	343 388,00	343 388,00
Služby	100 000,00	120 000,00
Cestovné	5 000,00	5 000,00
Další provozní náklady	1 260 210,00	1 240 210,00
Doplňkové náklady	256 289,00	256 289,00
Celkem	1 964 887,00	1 964 887,00

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

(komentář k čerpání finančních prostředků na řešení projektu – slovní popis v členění jednotlivých položek nákladů a konkrétní výčet, na co byly prostředky využity, komentář a zdůvodnění případných změn a rozdílů oproti schválenému rozpočtu projektu)

Osobní náklady byly vypočteny na základě doporučení ze strany FVL VETUNI Brno.

Výše materiálových nákladů vycházelo z projektového designu, použitých metod a počtu vzorků.

Provozní náklady zahrnovaly nákup králíků z akreditovaného chovu, nákup léčiv, vybavení experimentálních klecí (napáječky, rošty), materiál pro farmakokinetické, histopatologické vyšetření, náklady na spotřební materiál (ELISA kity, kity na extrakci DNA, reagensie pro hematologické a biochemické vyšetření krve, pro hormonální analýzy, protilátky a další spotřební materiál pro průtokovou cytometrii, laboratorní plasty, chemikálie na zpracování vzorků, IHC protilátky, odběrový materiál, zkumavky, dezinfekce, apod.).

Cestovní náklady zahrnovaly část nákladů na účast na mezinárodní konferenci zaměřené na onemocnění drobných savců.

Náklady na služby zahrnovaly náklady na publikaci článku a na náklady na vyšetření mikrobiomu střeva králíků.

Náklady na drobný hmotný majetek na pořízení vortexu a mikropipet a kancelářských potřeb.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě doložte výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

9. Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VETUNI bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu:

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu odpovědného za čerpání prostředků:

Přednosta ústavu nebo kliniky, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu nebo klinice, respektive celoškolském pracovišti, které řídí.

Datum, jméno a podpis

přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2021
(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu:

FVHE/Pikula/ITA2021

2. Název projektu:

Zoologická medicína: zdravotní problematika divokých zvířat, zvěře a ryb

3. Řešitel projektu:

Prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D., dipl. ECZM

Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel

Fakulta veterinární hygieny a ekologie

E-mail: pikulaj@vfu.cz

Telefon: +420 541 562 655

4. Řešitelský kolektiv:

složení řešitelského týmu: (akademičtí pracovníci a jejich příslušnost k ústavům nebo klinikám fakulty nebo výzkumným skupinám CEITEC, studenti DSP) a forma zapojení každého člena řešitelského týmu

Akademičtí pracovníci a studenti DSP Ústavu ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel

Netopýři jako pokladnice patogenních agens

doc. MVDr. Hana Bandouchová, Ph.D., dipl. ECZM	FVHE, 2190, AP 1.0
Ing. Jana Sedláčková, Ph.D.	FVHE, 2190, AP 1.0
MVDr. Vladimír Piaček, Ph.D.	FVHE, 2190, AP 1.0
MVDr. Šimon Adam	DSP VFU Brno, presenční forma, 1. roč.
MVDr. Vendula Kalocsányiová	DSP VFU Brno, presenční forma, 1. roč.
Mgr. Lucie Veitová	DSP VFU Brno, presenční forma, 1. roč.

Buněčné kultury derivované z divokých zvířat: vzhled do patologických mechanismů různých stresorů

prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D., dipl. ECZM	FVHE, 2190, AP 1.0
RNDr. Ing. Veronika Seidlová (Kováčová), Ph.D.	FVHE, 2190, AP 1.0
Ing. František Vítula, Ph.D.	FVHE, 2190, AP 1.0
Mgr. Monika Němcová	DSP VFU Brno, presenční forma, 3. roč.

Subletální a reprodukční toxicita vybraných polutantů vodního prostředí

prof. RNDr. Miroslava Beklová, CSc.	FVHE, 2190, AP 1.0
Mgr. Barbora Havelková, Ph.D.	FVHE, 2190, AP 0.7

Komparace hodnot krevních parametrů měřených v arteriální a venózní krvi ryb

MVDr. Ivana Mikulíková, Ph.D.	FVHE, 2190, AP 0.5
MVDr. Hana Minářová	FVHE, 2190, AP 0.5
doc. MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D.	FVHE, 2190, AP 1.0
MVDr. Ivana Papežiková, Ph.D.	FVHE, 2190, AP 0.6+0.15(NAZV)

Dopad tlaku patogenů na komplexní společenstvo obojživelníků

Mgr. Vojtech Baláž, Ph.D.	FVHE, 2190, AP 1.0
MVDr. Michal Příbyl	DSP VFU Brno, presenční forma, 3. roč.

5. V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu:

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Projekt navazuje na dlouhodobé výzkumné aktivity Ústavu ekologie a chorob zoonozivních zvířat, zvěře, ryb a včel. Dílčí cíle jsou plně v souladu s prioritami výzkumu na VFU Brno (choroby volně žijících zvířat, problematika infekčních onemocnění a nálezů zoonozivních zvířat, působení stresorů a toxinů na zvířata).

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Projekt má pět hlavních výzkumných cílů: 1) netopýři jako pokladnice patogenních agens, 2) buněčné kultury derivované z divokých zvířat: vzhled do patologických mechanismů různých stresorů, 3) subletální a reprodukční toxicita vybraných polutantů vodního prostředí, 4) komparace hodnot krevních parametrů měřených v arteriální a venózní krvi ryb a 5) dopad tlaku patogenů na komplexní společenstvo obojživelníků. Cílem je rozvoj zoologické medicíny se zaměřením na zdravotní problematiku divokých zvířat, zvěře a ryb a s přesahem do ochrany životního prostředí a ohrožených obratlovců a veřejného zdraví.

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany):

1) Netopýři jako pokladnice patogenních agens

V tomto roce jsme se zaměřili na výskyt leptospir u střeoevropských netopýřů (v ledvinách získaných ze 300 kadáverů netopýřů 13 různých druhů z lokalit v ČR a SR). Byla extrahována DNA a k detekci leptospir použita PCR zacílená zejména na gen lipL32, který je spojen s patogenitou leptospir.

2) Buněčné kultury derivované z divokých zvířat: vzhled do patologických mechanismů různých stresorů

Netopýři jsou rezervoárem mnoha koronavirů; i pravděpodobným zdrojem SARS-CoV-2. Chybí ale poznatky o interakci mezi koronaviry a netopýří buňkou. V této studii jsme ve spolupráci s kolegy z Pasteurova ústavu v Paříži zkoumali schopnost viru SARS-CoV-2 replikovat se v primárních a imortalizovaných buněčných kulturách, které byly derivovány z netopýřů *Rhinolophus ferrumequinum*, *Myotis myotis*, *Eptesicus serotinus*, *Tadarida brasiliensis* a *Nyctalus noctula*.

Hmyzožraví netopýři jsou ohroženi insekticidy používanými pro ochranu rostlin. Cílem druhé studie provedené v rámci tohoto dílčího cíle bylo posoudit *in vitro* cytotoxicitu běžně používaných insekticidů (imidacloprid, permethrin, cypermethrin a fipronil) na hepatocytech derivovaných z jater netopýřů. Insekticidy byly testovány při různých podmínkách kultivace (simulace hibernace: 8°C, denní torpor: 20°C, normotermie: 37 a 38°C a aktivní létání: 39 a 40°C), expozice koncentrační řadě chemikálií (0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1000 µl/ml média) a délky expozice (10, 24 a 48 hodin).

3) Subletální a reprodukční toxicita vybraných polutantů vodního prostředí

Studována byla subletální a chronická toxicita léčiv paracetamolu (PAR), karbamazepinu (CBZ) a nanočástic kovu (ZnO, Al₂O₃, CuO) na vodní organismy. Pro hodnocení ekotoxicity byly využity zejména testy dle ČSN EN ISO 6341(75 7751) Kvalita vod- Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*)- Zkouška akutní toxicity a ČSN ISO 10706 (75 7752); Jakost vod - Stanovení chronické toxicity látek pro *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*). Akutní toxický účinek CBZ na jikry ryb dania pruhovaného (*Danio rerio*) byl sledován v průběhu 48 hodin, kdy oplozené jikry danií byly vystaveny účinku různých ředění CBZ. Test byl prováděn dle ČSN ISO 15088. Při řešení projektu bylo postupováno podle standardních metodických postupů. Pro testy na organismech vodního prostředí (sladkovodní řase *Pseudokirchneriella subcapitata*, okřehku menším *Lemna minor*, vodním korýši – perloočce *Daphnia magna*, nitěnce *Tubifex tubifex* a raných vývojových stádiích *Dania reria*). Koncentrace nanočástic kovu (ZnO, Al₂O₃, CuO) použité v testech vycházely z environmentálních koncentrací a předběžných testů. Byly otestovány 2 velikosti částic, a

to menší než 100 nm a 50 nm, které byly specifikovány pomocí TEM. Současně probíhaly srovnávací testy s iontovou formou kovu ($ZnCl_2$, $AlCl_3$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$).

4) Komparace hodnot krevních parametrů měřených v arteriální a venózní krvi ryb

Analýzy vzorků krve jsou v medicíně ryb a ichtyologii důležité pro posouzení zdravotního stavu a reakce ryb na environmentální stresory. Naměřené hodnoty mohou být ovlivněny celou řadou faktorů. Naším cílem v této studii bylo posoudit vliv místa a cévy použité k odběru na výsledné hodnoty. Celkem bylo vzorkováno 20 jedinců pstruha duhového. Od každého jedince byly odebrány a komparovány duální vzorky (ze srdce a z kaudálních cév).

5) Dopad tlaku patogenů na komplexní společenstvo obojživelníků

Cílem studie byla detekce patogenů obojživelníků ze vzorků získaných z druhově pestrých lokalit a identifikace faktorů predikujících vyšší prevalenci, infekční nálož a mortalitu. Odběry vzorků probíhaly z nalezených obojživelníků v rámci oblasti výskytu hybridní populace kuněk v pohoří Chříby (skokan hnědý, skokan štíhlý, mlok skvrnitý, kuňka žlutobřichá, kuňka obecná, skokani rodu *Pelophylax*) a v oboře Kunín (skokani rodu *Pelophylax*, čolek velký). Přítomnost patogenů *B. dendrobatidis*, *B. salamandrivorans* a ranavirů byla testována pomocí qPCR. V terénních podmínkách jsme identifikovali pozitivní jedince k odběru stěrů ke kultivacím *B. dendrobatidis* pomocí techniky LAMP. Z nalezených uhynulých pozitivních jedinců jsme provedli pokusy o kultivaci *B. dendrobatidis*. Pro identifikaci hybridního statusu kuněk jsme použili vizuální analýzy zbarvení břicha, v případě skokanů *Pelophylax* jsme otestovali metodu identifikace hybridů pomocí PCR a posléze vyvinuli sady specifických sond pro testování v multiplex qPCR.

Dosažené výsledky projektu (max. 1/2 strany):

1) Netopýři jako pokladnice patogenních agens

Celkem 13/290 (4,5 %) netopýrů z České republiky a 1/10 (10 %) netopýrů ze Slovenské republiky bylo pozitivních (prokázána DNA leptospir). Pokud jde o druhové spektrum pozitivních vyšetřovaných netopýrů, šlo o 3/69 netopýrů rezavých (*Nyctalus noctula*, 4,3 %) a 11/187 netopýrů velkých (*Myotis myotis*, 5,9 %). Většina pozitivních sekvencí lipL32 (n = 12) byla identická se sekvencemi, které jsou charakteristické pro patogenní *Leptospira interrogans* (GenBank MT482305). Další dvě sekvence (požádáno o přidělení GenBank čísla) byly fylogeneticky odlišné od leptospirových sekvencí dříve detekovaných u netopýrů. Tyto nové sekvence byly z 93,1 %, 92,2 % a 92,7 % identické s *L. weilii*, *L. mayottensis* a *L. alexanderi*. Další analýzou bylo zjištěno, že se pravděpodobně jedná o novou leptospiru příbuznou s *L. weilii*.

2) Buněčné kultury derivované z divokých zvířat: vhléd do patologických mechanismů různých stresorů

Bylo zjištěno, že permisivita netopýřích buněk pro koronavirovou infekci je minimální dokonce i u buněk, které exprimují v detekovatelném množství virový receptor ACE2 (angiotenzin-konvertující enzym 2). Rezistenci k infekci bylo možno překonat v buněčných kulturách vložením a exprimací lidského ACE2 (hACE2), což svědčí o tom, že restrikce replikace je dána nízkou expresí netopýří ACE2 nebo absencí vazebného místa na těchto buňkách. Buňky pak produkovaly infekční viriony; ty ale nebyly z buněk uvolňovány. Schopnost buněk účinně regulovat virovou replikaci je dána silnou produkcí interferonu.

Účinky všech zkoumaných insekticidů na netopýří hepatocyty jsou ovlivněny parametry expozice, tj. délkou, koncentrací i teplotou. Pozorované efekty zahrnují cytotoxicitu (např. fipronil a cypermetrin při 38°C a střední délce expozice), ale i stimulaci buněk k růstu a množení při expozici nízkým dávkám insekticidů (např. imidakloprid při nízké teplotě).

3) Subletální a reprodukční toxicita vybraných polutantů vodního prostředí

Byl zhodnocen vliv PAR na porodnost *D. magna*. Koncentrace, která způsobila 50 % inhibici porodnosti (I_p) byla nižší než 0,7 mg/l. Byly provedeny testy akutní toxicity (24hEC₅₀ a 48hEC₅₀) CBZ pro perloočky *D. magna*. Ze získaných hodnot byla stanovena střední letální koncentrace EC₅₀ v časovém úseku 24 (24hEC₅₀ = 274,4 mg/l, IS = 137,7 - 570,8) a 48 hodin (48hEC₅₀ = 136,9 mg/l, IS = 90,6-207,7). Z hodnot akutní toxicity CBZ pro perloočku se vycházelo pro stanovení chronické

toxicity (LOEC, NOEC, 21dEC50). Byla posouzena vývojová toxicita CBZ pro ryby *D. rerio*. V průběhu testu byla sledována mortalita (96hLC50 = 349,9 mg/l (143,0 - 856,0) a negativní vliv na vývoj embrya *D. rerio* ve stáří 2 hodin. Byly zaznamenány změny v srdeční frekvenci, líhnutí (96hEC50 = 27,23 mg/l (9,9 - 77,3) a od koncentrace 50 mg/l edém srdce. Na základě sledovaných letálních a subletálních efektů u zástupců vodní biocenózy bylo posuzováno ekotoxikologické riziko kovových nanočástic významných z hlediska vodní toxikologie (ZnO a CuO). Citlivost k testovaným nanokovům jednotlivých zástupců vodní biocenózy se výrazně lišila. Rozdílné efekty byly zjištěny i v případě, kdy testovací organismy byly exponovány nanočásticím různé velikosti, případně iontovým formám kovu, výrazné rozdíly byly u rostlinných a živočišných zástupců vodní biocenózy.

4) Komparace hodnot krevních parametrů měřených v arteriální a venózní krvi ryb

V duálních vzorcích byly analyzovány kompletní hematologické a biochemické parametry včetně acidobazické rovnováhy a fagocytární aktivity. Výsledky jsou překvapivé, protože v rozporu s tradovaným názorem nebyly prokázány signifikantní rozdíly v hodnotách měřených parametrů, tj. oba přístupy k odběru krve jsou použitelné a dávají srovnatelné výsledky.

5) Dopad tlaku patogenů na komplexní společenstvo obojživelníků

Na sledovaných lokalitách byla potvrzena přítomnost *B. dendrobatidis*, která se vyskytovala pouze u vzorků z kuněk a skokanů r. *Pelophylax*. Pokusy o kultivaci vedly k úspěšnému získání linie z pohoří Chříby z kuňky žlutobřiché. Jedná se zatím o jedinou kultivovanou linii *B. dendrobatidis* z České republiky. Nové sady specifických sond pro testování hybridního statusu skokanů r. *Pelophylax* jsou testovány v součinnosti s PRIF UK, Bratislava.

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Analyzována byla unikátní data interakce hostitel-patogen a hostitel-stresor. Výsledky jsou založeny na komplexním přístupu z pohledu různých specializovaných oborů. Naše buněčné kultury derivované z různých druhů netopýrů jsou cenným modelem pro studium evolučních vztahů mezi rezervoárovými hostiteli a viry, které cirkulují v jejich populacích. Získána byla kultury lokální linie *B. dendrobatidis* pro další studium a experimenty, rozšířeny diagnostické a kultivační metody.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Lze předpokládat značný mezinárodní přesah výsledků projektu a jejich uplatnění ve vědeckých časopisech. Kromě vědeckého přínosu má řešení projektu i praktické implikace pro ochranu zdraví a veterinární medicínu volně žijících zvířat, ochranářskou a veterinární ekologii, odhad environmentálních rizik polutantů vodního prostředí. Výsledky budou také použity při sepisování odborných prací studentů.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

1) Netopýři jako pokladnice patogenních agens

Seidlová V, Straková P, Kejíková R, Němcová M, Bartonička T, Salát J, Dufková L, Šikutová S, Mendel J, McKee C, Zukal J, Pikula J, Rudolf I: Novel *Leptospira* species detected in bat cadavers, Central Europe. *Emerging Infectious Diseases*, **rukopis připraven k odeslání do časopisu**, IF=6,883, Q1

2) Buněčné kultury derivované z divokých zvířat: vhléd do patologických mechanismů různých stresorů

Aicher S-M, Streicher F, Chazal M, Planas D, Luo D, Buchrieser J, Nemcova M, Seidlova V, Zimmer G, Zukal J, Serra-Cobo J, Pontier D, Pain B, Schwartz O, Pikula J, Dacheux L, Jouvenet N: Species-specific molecular barriers to SARS-CoV-2 replication in bat cells. *Plos Pathogens*, **rukopis odeslán do redakce časopisu**, dedikace FVHE/Pikula/ITA2021 + CNRS v důsledku mezinárodní spolupráce, IF=6,823, Q1

Toxicity of insecticides for wildlife: a cell culture-based investigation. *Toxins*, IF 3,531, Q1, **rukopis v přípravě**

3) Subletální a reprodukční toxicita vybraných polutantů vodního prostředí

Survival, growth and reproduction of *Daphnia magna* under exposure to paracetamol and carbamazepin. *PLoS One*, IF 2,74, Q2, **rukopis v přípravě**

Developmental toxicity of carbamazepine in *Danio rerio*. *Journal of Fish Diseases*, IF 2,318, Q1, **rukopis v přípravě**

Risk of selected nanometals and their oxides in the aquatic ecosystem. *PLoS One*, IF 2,74, Q2, **rukopis v přípravě**

Ravichandran S, Durai RD, Krishnan PD, Rameshkumar P, Thomas T, Narayanan SN, Hosnedlova B, Havelkova B, Jakubek M, Beklova M, Kizek R, Narayanan VHB: Preparation of Aluminium oxide Nanoparticles using Green Synthesis. 12th International Conference on Nanomaterials - Research & Application NANOCON 2021, Brno 20. - 22.10. 2021, **poster a příspěvek in extenso**

4) Komparace hodnot krevních parametrů měřených v arteriální a venózní krvi ryb

Mikulíková I, Palíková M, Papežiková I, Blahová J, Toulová I, Minářová H: Does blood sampling from caudal vessels in fish produce different indice values from those obtained by heart puncture? *Acta Veterinaria Brno*, **přijato k tisku**, IF=0,667, Q4, **exkluzivní dedikace FVHE/Pikula/ITA2021**

5) Dopad tlaku patogenů na komplexní společenstvo obojživelníků

Pathogen load and prevalence of chytrid fungus varies among amphibians of different hybridogenic status. *Journal of Wildlife Diseases*, IF 1,187, Q2, **rukopis v přípravě**

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	748 930	748 930
Služby	90 000	88 851
Cestovné	50 000	49 303
Další provozní náklady	627 670	629 516
Doplňkové náklady	227 490	227 490
Celkem	1 744 090	1 744 090

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

(komentář k čerpání finančních prostředků na řešení projektu – slovní popis v členění jednotlivých položek nákladů a konkrétní výčet, na co byly prostředky využity, komentář a zdůvodnění případných změn a rozdílů oproti schválenému rozpočtu projektu)

Osobní náklady:

Mgr. Vojtech Baláž, Ph.D.

doc. MVDr. Hana Band'ouchová, Ph.D., dipl. ECZM

prof. RNDr. Miroslava Beklová, CSc.

Mgr. Barbora Havelková, Ph.D.

MVDr. Ivana Mikulíková, Ph.D.

MVDr. Hana Minářová

doc. MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D.

MVDr. Ivana Papežiková, Ph.D.

MVDr. Vladimír Piaček, Ph.D.

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

Ing. Jana Sedláčková, Ph.D.

RNDr. Ing. Veronika Seidlová, Ph.D.

Ing. František Vitula, Ph.D.

MVDr. Šimon Adam

čerpano 748 930 Kč

odměna 40 000 Kč

odměna 35 000 Kč

odměna 50 000 Kč

odměna 35 000 Kč

odměna 30 000 Kč

odměna 30 000 Kč

odměna 50 000 Kč

odměna 30 000 Kč

odměna 30 000 Kč

odměna 50 000 Kč

odměna 30 000 Kč

odměna 45 000 Kč

odměna 30 000 Kč

stipendium 20 000 Kč

MVDr. Vendula Kalocsányiová	stipendium 20 000 Kč
Mgr. Monika Němcová	stipendium 20 000 Kč
MVDr. Michal Příbyl	stipendium 20 000 Kč
Mgr. Lucie Veitová	stipendium 20 000 Kč

Poznámka: odměny jsou uvedeny bez odvodů a vyjadřují podíl jednotlivých pracovníků na řešení projektu, čerpáno bylo v souladu s původními požadavky.

Služby: čerpáno 88 851 Kč

Celkové požadované náklady na služby (90 tis. Kč) byly nedočerpány o 1149 Kč. Prostředky na služby sloužily k uhrazení konferenčních poplatků, servisní údržby inkubátoru a mikroskopické techniky, laboratorní vyšetření na SVÚ Olomouc a sekvenování PCR produktů.

Cestovné: čerpáno 49 303 Kč

Celkové požadované náklady na cestovné (50 tis. Kč) byly nedočerpány o 697 Kč. Vyčerpané cestovné souviselo se služební cestou do Bulharska.

Další provozní náklady: čerpáno 629 516 Kč

Na další provozní náklady bylo požadováno **627 670 Kč**. Čerpáno bylo **629 516 Kč**. Navýšení o **1 846 Kč** šlo na vrub prostředků ušetřených na službách a cestovním. Další provozní náklady byly použity k zakoupení materiálu na odběr, manipulaci a uskladnění vzorků (odběrové tampony, etanol, zkumavky, špičky, krabičky a igelitové pytlíky na vzorky apod., filtry na eDNA), materiálu pro izolace DNA (skalpely, PrepMan, DNA a RNA izolační kity, zkumavky na izolaci, keramické kuličky k homogenizaci, špičky), spotřebního materiálu a reagensů pro qPCR a PCR (voda, master mixy, primery, fluorescenčně značené sondy, PCR destičky, špičky), spotřebního materiálu a reagensů pro LAMP reakce (stripy, *B. dendrobatidis* a *B. salamandrivorans* LAMP mastermixy, špičky). Dále náklady spojené s chovy a kultivací testovacích organismů a s nákupy čistých chemikálií, materiálu pro přípravu živných roztoků, standardů (paracetamol, karbamazepin) dalšího spotřebního materiálu (laboratorních pomůcek), křemenných lahviček, kyvet, náplně do kolony. Dále chemikálií a materiálu potřebného k přípravě nanočástic (dusičnan železitý, tetrahydroboritan sodný, hydroxid amonný, kyselina tetrachlorozlatitá, citrát trisodný, škrob, kyselina citronová), luminiscenčních bakterií, medicínálních plynů, apod. EC8+ cartridge pro stanovení acidobazické rovnováhy krve přístrojem i-Stat. Běžný laboratorní materiál, laboratorní sklo, plasty pro buněčné kultury, zkumavky, špičky na pipety, rukavice, dezinfekční prostředky; chemikálie: např. PBS, kultivační média, fetální bovinní sérum, antimykotika a antibiotika, tekutý dusík. Drobný hmotný majetek: monitor inkubace, automatický dávkovač, centrifuga kombinovaná s vortexem PCR plates, mikropipeta Eppendorf.

Doplňkové náklady: čerpáno 227 490 Kč

Odvedeny doplňkové náklady ve výši 15 %.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě doložte výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

9. Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VETUNI bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu:

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu **odpovědného za čerpání prostředků:**

Přednosta ústavu nebo kliniky, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu nebo klinice, respektive celoškolském pracovišti, které řídí.

Datum, jméno a podpis

přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2021

1. Identifikační číslo projektu: 2021ITA22

2. **Název projektu:** Hodnocení úrovně ochrany a welfare zvířat ovlivněných lidskou činností

3. Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D.

Fakulta/celoškolské pracoviště: Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství

E-mail: voslarovae@vfu.cz

Telefon: 541562773

4. Řešitelský kolektiv:

Řešitelský kolektiv tvořili následující akademičtí pracovníci Ústavu ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství:

Prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D. – hlavní řešitelka

Prof. MVDr. Vladimír Večerek, CSc., MBA – spoluřešitel

Prof. MVDr. Zdeňka Svobodová, DrSc. – spoluřešitelka

Doc. Ing. Jana Blahová, Ph.D. – spoluřešitelka

Doc. MVDr. Petr Chloupek, Ph.D. – spoluřešitel

Doc. Mgr. Petr Maršálek, Ph.D. – spoluřešitel

MVDr. Martina Volfová, Ph.D. – spoluřešitelka

MVDr. Petra Doleželová, Ph.D. – spoluřešitelka

PharmDr. Zuzana Šíroková, Ph.D. – spoluřešitelka

Mgr. Veronika Doubková, Ph.D. – spoluřešitelka

Ing. Kamila Novotná Kružíková, Ph.D. – spoluřešitelka

MVDr. Michal Kaluža – spoluřešitel

MVDr. Gabriela Lukešová – spoluřešitelka

Mgr. Veronika Vojtkovská – spoluřešitelka

MVDr. Lenka Válková – spoluřešitelka

MVDr. Zuzana Weiserová (Koutková) – spoluřešitelka

5. **V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu: -**

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Předmět řešení spadal do výzkumné činnosti pracovníků Ústavu ochrany zvířat a welfare a veřejného veterinárního lékařství realizované na FVHE VETUNI, která je zaměřena do oblasti hodnocení úrovně ochrany a welfare zvířat určených pro hospodářské účely, zvířat v zájmových chovech a volně žijících zvířat a také do oblasti toxikologie, kde jsou sledovány toxické účinky vybraných látek na zdraví a užitkovost zvířat včetně ryb a vodních organismů.

Cíle projektu:

Cílem projektu bylo posouzení úrovně ochrany a welfare hospodářských, zájmových a volně žijících zvířat s využitím různých metod hodnocení se zaměřením na

- srovnání úrovně zdraví zvířat porážených na jatkách na základě analýzy četností patoanatomických nálezů zjišťovaných v rámci veterinární prohlídky na jatkách a srovnání úrovně výskytu narušení jater a ledvin u různých druhů a kategorií zvířat porážených na jatkách s dovozením dopadu na welfare těchto zvířat
- hodnocení stresu u králíků pomocí neinvazivních metod
- hodnocení vývoje welfare a zdraví koček během pobytu v útulku na základě sledování změn vybraných welfare indikátorů
- hodnocení ochrany ohrožených druhů volně žijících zvířat na základě analýzy obchodu s CITES exempláři
- posouzení dopadu kontaminace vodního prostředí rtutí na zdraví živočichů vázaných na vodu na základě hodnocení obsahu rtuti u kormorána velkého a kapra obecného
- hodnocení potenciálně negativních účinků estrogenů na ryby na základě hodnocení vybraných biochemických markerů u dospělých triploidních jedinců dáňá pruhovaného.

Popis a metodika řešení projektu:

Srovnání úrovně zdraví zvířat porážených na jatkách bylo provedeno na základě analýzy četností patoanatomických nálezů zjišťovaných v rámci veterinární prohlídky na jatkách. Ve spolupráci se Státní veterinární správou byly získány výsledky veterinární prohlídky skotu, prasat, ovcí a koz, králíků, drůbeže a pštrosů pocházejících z chovů v České republice a porážených na jatkách v České republice za desetileté období let 2010 až 2019. Úroveň zdraví u jednotlivých druhů a kategorií jatečných zvířat byla vyjádřena jako tzv. PA index získaný podílem počtu nálezů k celkovému počtu zjišťování při patoanatomické prohlídce na jatkách násobený stem. PA index tak vyjadřuje hodnotu umožňující porovnávání úrovně zdraví jednotlivých druhů a kategorií porážených zvířat v určeném časovém období. Bylo posuzováno zdraví skotu v kategoriích dojnice, jalovice, býci ve výkrmu, telata, dále prasat v kategoriích prasnice, prasata ve výkrmu, selata, dále ovcí v kategorii ovce a jehňata, dále koz v kategorii kozy a kůzlata, dále králíků, dále drůbeže v kategoriích nosnice, brojeři, krůty, kachny, husy, a dále pštrosů. Pro každé zvíře bylo provedeno 15 zjištění zaměřených na orgánové nebo tkáňové celky anebo části těl, a to: játra, ledviny, plíce, gastrointestinální trakt, slezina, srdce, nervový systém, kůže, pohlavní orgány a mléčná žláza, hlava, trup, končetiny, svalovina, jiné nálezy a celý organismus (zahrnující nálezy nedostatečný vývin (zakrslost), vyhublost, ascites, abscesy, tuberkuloidní změny, cysticerkóza). Dále bylo provedeno srovnání úrovně výskytu narušení jater a ledvin u různých druhů a kategorií zvířat porážených na jatkách s dovozením dopadu na welfare těchto zvířat.

Hodnocení stresu u králíků bylo provedeno pomocí dvou neinvazivních metod: sledování změny teploty povrchu těla termokamerou a sledování změn glukokortikoidních hormonů ve slinách. Pro získání bazálních hodnot byli králíci domácí jednotlivě snímáni termokamerou ve svém ustájení bez jakékoli manipulace. Stejní králíci byli snímáni termokamerou po potenciálně stresující situaci, kterou je odchyt králíka v kotci, manipulace s králíkem v souvislosti s jeho fixací a přenesením na jiné místo. Termokamerou byly snímány oblasti vnitřního a vnějšího boltce ucha, koutek oka a oblast nosu. Měření teploty bylo několikrát opakováno v různých časových intervalech pro zjištění vývoje změny teploty v delším časovém úseku po působení akutního stresoru. Obdobným způsobem byl sledován vývoj hladin glukokortikoidů ve slinách králíků. Sliny byly králíkům odebírány před manipulací a následně v několika časových intervalech po manipulaci pro zhodnocení vývoje změn v hladině glukokortikoidů ve slinách po působení akutního stresoru. Hladiny glukokortikoidů ve slinách králíků byly analyzovány pomocí imunochemických metod (ELISA).

Hodnocení welfare a zdraví koček v útulku bylo provedeno na základě vlastního pozorování koček v útulku a na základě analýzy zdravotních záznamů vedených provozovatelem útulku. Sledování změn vybraných welfare indikátorů u koček v průběhu pobytu v útulku bylo realizováno ve spolupráci s vybraným útulkem azylového typu (kapacita cca 25 zvířat). Na základě poznatků vycházejících z odborných a vědeckých publikací byl sestaven hodnotící protokol obsahující 2 skupiny animal-based indikátorů welfare (behaviorální a zdravotní indikátory), které bylo možné u koček během návštěv v útulku sledovat. Sledování probíhala opakovaně vždy v dvou týdenním intervalu. Během každé návštěvy byly dle protokolu známku 1 až 5 (1 = nejlepší stav, 5 = nejhorší stav) ohodnoceny vždy všechny kočky v té době se nacházející v útulku).

Data týkající se obchodu s exempláři CITES byla získána z veřejně přístupné mezinárodní databáze CITES (Cites Trade Database), která obsahuje více než 18 milionů záznamů o mezinárodním obchodu s CITES exempláři. Pro účely studie byly hodnoceny záznamy z období let 1975 až 2018. Analyzovány byly kategorie zvířat spadajících do třídy savců, ptáků a plazů. Cílem bylo analyzovat trend ve vývoji počtu přepravovaných jedinců za sledované období, s jakým počtem exemplářů celkem bylo za celé sledované období obchodováno a kolik exemplářů z celkového počtu bylo živých jedinců nebo ostatních exemplářů. Dále byl posuzován účel jejich transportu, exportní země a typy exemplářů, které byly transportovány na území České republiky.

Pro posouzení dopadu kontaminace vodního prostředí rtuť na zdraví živočichů vázaných na vodu byl hodnocen obsah rtuti ve tkáních dvou různých organismů, a to u kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*) a u kapra obecného (*Cyprinus carpio*). U kormorána velkého byl hodnocen obsah celkové rtuti v detoxikačních orgánech (játra, ledviny) a ve svalovině kormoránů pocházejících z rybářského hospodářství Krogulna a z řeky Nysa Klodska v Polsku. Odběr vzorků tkání kormorána velkého proběhl v rámci monitoringů realizovaných pracovníky University of Warmia and Mazury in Olsztyn (Polsko) na základě povolení polské policie (Regionalna Dyrekcja Ochrony Środowiska) o odstřelu na dvou uvedených lokalitách v Polsku. Hodnoceny mezi sebou byly tkáně v rámci jedné lokality a také rozdíl v obsahu rtuti v jednotlivých orgánech ze sledovaných lokalit v Polsku. U kapra obecného byl hodnocen obsah a distribuce rtuti v jeho organismu. Byli hodnoceni kapři z rybníka Vrkoč, Strachotína a z Jaroslavického rybníka, jež jsou součástí povodí Moravy. U odebraných vzorků tkání (svalovina, mozek, ledvina přední, ledvina zadní, slezina a šupiny) kapra obecného byla hodnocena distribuce rtuti v organismu a byl porovnán obsah rtuti mezi jednotlivými orgány v rámci jedné lokality a dále bylo mezi sledovanými rybníky hodnoceno zatížení rtuť na jednotlivých lokalitách. Odběr vzorků tkání kapra obecného proběhl při podzimních výloveh realizovaných firmou Rybníkářství Pohořelice a.s., od které byly zakoupeny usmrčené ryby (tržní kapři), z nichž byly dále odebrány v laboratoři jednotlivé vzorky tkání pro analýzy rtuti. Celková rtuť byla měřena metodou atomové absorpční spektrometrie na AMA 254 (Altec).

Pro sledování negativních účinků estrogenů (estradiol, ethinylestradiol) na ryby byli použiti dospělí jedinci triploidních forem dáňka pruhozaného (*D. rerio*), kteří byli testovaným látkám vystaveni po dobu šesti týdnů. Triploidní formy dáňka pruhozaného byly připraveny pomocí teplotního šoku aplikovaného po oplození jiker ve spolupráci s Fakultou rybářství a ochrany vod ve Vodňanech (Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích). Testované látky byly podávány v krmivu, které bylo připraveno speciální patentovanou metodou. Zvolené testované koncentrace vycházely z environmentálně dostupných dat, zároveň byly sledovány i účinky vyšších koncentrací pro posouzení vztahu dávky a odpovědi organismu. Po ukončení experimentu byly provedeny analýzy vybraných morfoloogických a biochemických markerů (např. vitellogenin, oxidativní stres, histopatologické vyšetření) pro komplexní posouzení účinků estrogenů. V rámci projektu byly analyzovány také vzorky vody. Zároveň byl v průběhu experimentu sledován vliv testovaných látek na případné změny chování (např.

potravní chování). Test toxicity byl realizován v akreditovaném zařízení Ústavu ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství FVHE VETUNI v souladu se schváleným projektem pokusu (12-2021).

Dosažené výsledky projektu:

Výsledkem projektu v části zaměřené na srovnání úrovně zdraví zvířat porážených na jatkách bylo srovnání úrovně zdraví skotu, prasat, ovcí a koz, králíků, drůbeže a pštrosů porážených na jatkách vyjádřené četností patoanatomických nálezů zjišťovaných v rámci veterinární prohlídky na jatkách a srovnání úrovně výskytu narušení jater a ledvin u různých druhů a kategorií zvířat porážených na jatkách s dovozením dopadu na welfare těchto zvířat.

Výsledkem projektu v části zaměřené na hodnocení stresu u králíků pomocí neinvazivních metod bylo ověření možnosti hodnocení akutního stresu u králíků na základě měření povrchové teploty vybraných částí těla termokamerou a na základě analýzy hladin glukokortikoidů ve slinách a upřesnění vývoje změn sledovaných ukazatelů po expozici stresoru.

Výsledkem projektu v části zaměřené na hodnocení welfare a zdraví koček během pobytu v útulku bylo vypracování protokolu pro hodnocení welfare koček v útulku, posouzení dopadu doby pobytu v útulku na vybrané behaviorální a zdravotní ukazatele a analýza faktorů ovlivňujících chování a zdraví koček v útulku.

Výsledkem projektu v části zaměřené na hodnocení ochrany ohrožených druhů volně žijících zvířat bylo zhodnocení dlouhodobého vývoje v obchodování s exempláři CITES, pohybu konkrétních taxonů po světě a určení trendů v obchodování s ohroženými druhy.

Výsledkem projektu v části zaměřené na posouzení dopadu kontaminace vodního prostředí rtutí na zdraví živočichů vázaných na vodu bylo určení obsahu celkové rtuti ve tkáních kormorána velkého a kapra obecného. Byla zhodnocena distribuce rtuti v organismu a byl srovnán obsah rtuti mezi jednotlivými orgány u zvířat v rámci jedné lokality a dále bylo srovnáno zatížení rtutí mezi sledovanými lokalitami.

Výsledkem projektu v části zaměřené na hodnocení potenciálně negativních účinků estrogenů na ryby bylo ověření možnosti využití dospělých jedinců triploidních forem dánia pruhovaného (*D. rerio*) k posouzení negativních účinků xenoestrogenních látek.

Přínos projektu:

Přínosem projektu je získání poznatků o úrovni zdraví skotu, prasat, ovcí a koz, králíků, drůbeže a pštrosů porážených na jatkách na základě nálezů zjišťovaných při veterinární prohlídce na jatkách a využití analýzy výsledků veterinární prohlídky zvířat po porážce pro směřování dalších chovatelských a veterinárních opatření pro zlepšování zdraví a pohody hospodářských zvířat chovaných v ČR.

Přínosem projektu v části zaměřené na hodnocení stresu u králíků pomocí neinvazivních metod je upřesnění metodiky měření povrchové teploty vybraných částí těla termokamerou a analýzy hladin glukokortikoidů ve slinách pro hodnocení akutního stresu u králíků.

Přínosem projektu v části zaměřené na hodnocení welfare a zdraví koček v útulku je vypracování protokolu pro hodnocení welfare koček v útulku a ověření jeho využitelnosti v praxi, posouzení dopadu doby pobytu v útulku na vybrané behaviorální a zdravotní ukazatele a určení faktorů ovlivňujících chování a zdraví koček v útulku. Výsledky umožní navrhnout opatření vedoucí k minimalizaci vlivů, které mohou mít negativní dopad na welfare koček v útulku.

Přínosem projektu v části zaměřené na hodnocení ochrany ohrožených druhů volně žijících zvířat je určení dlouhodobých trendů vývoje v obchodování s exempláři CITES, určení nejvíce obchodovaných druhů a v souvislosti se stupněm jejich ohrožení navržení opatření směřujících k jejich vyšší ochraně.

Přínosem projektu v části zaměřené na posouzení dopadu kontaminace vodního prostředí rtutí na zdraví živočichů vázaných na vodu je rozšíření poznatků o distribuci rtuti v organismu kapra obecného a kormorána velkého.

Dalším přínosem projektu je rozšíření dosavadních znalostí o triploidních formách dáňa pruhovaného a o vlivu xenoestrogenních látek na dospělé jedince tohoto druhu. Použití triploidních forem redukuje počet použitých testovaných organismů, protože sledování estrogenních účinků je vhodnější provádět na samčí populaci.

Využití výsledků:

Výsledky byly dosud prezentovány na 3 konferencích (Middle European Buiatric Congress, Konference České a Slovenské etologické společnosti, Konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí), publikovány v odborném časopise Veterinářství (3 články) a publikovány nebo přijaty k publikaci ve 3 vědeckých časopisech s impakt faktorem (Frontiers in Veterinary Science, Journal of Veterinary Behavior - Clinical Applications and Research, Acta Veterinaria Brno). Další články byly již odeslány k publikaci nebo jsou připravovány k odeslání pro publikaci ve vědeckých časopisech s impakt faktorem. Výsledky jsou také součástí dizertační práce spoluřešitelek MVDr. Lenky Válkové, MVDr. Zuzany Weiserové (Koutkové) a Mgr. Veroniky Vojtkovské.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

Cíl 1: Srovnání úrovně zdraví zvířat porážených na jatkách na základě analýzy četností patoanatomických nálezů zjišťovaných v rámci veterinární prohlídky na jatkách a srovnání úrovně výskytu narušení jater a ledvin u různých druhů a kategorií zvířat porážených na jatkách s dovozením dopadu na welfare těchto zvířat

1a Simona Ninčáková, Vladimír Večerek, Lenka Válková, Eva Voslářová, Michal Kaluža, Veronika Zavřelová: Srovnání úrovně zdraví zvířat porážených na jatkách, Acta Veterinaria Brno – *přijato k publikaci*

1b Lenka Válková, Eva Voslářová, Vladimír Večerek, Veronika Zavřelová: Zdraví zvířat z pohledu nálezů poškození jater zjišťovaných při prohlídce post mortem na jatkách, Acta Veterinaria Brno

1c Lenka Válková, Eva Voslářová, Vladimír Večerek: Porovnání výskytu poškození ledvin u skotu, prasat, ovcí a koz zjišťovaných na jatkách jako ukazatele zdraví zvířat, Acta Veterinaria Brno

Cíl 2: Hodnocení stresu u králíků pomocí neinvazivních metod

2a Gabriela Lukešová, Martina Volfová, Monika Šebánková, Eva Voslářová, Vladimír Večerek: Využití infračervené termografie při hodnocení akutního stresu u králíka domácího, Scientific Reports

2b Gabriela Lukešová, Eva Voslářová, Martina Volfová, Vladimír Večerek: Hodnocení akutního stresu u králíka domácího (*Oryctolagus cuniculus f. domestica*) stanovením glukokortikoidů ve slinách, BMC Veterinary Research

Cíl 3: Hodnocení vývoje welfare a zdraví koček během pobytu v útulku na základě sledování změn vybraných welfare indikátorů

3a Veronika Vojtkovská, Eva Voslářová, Vladimír Večerek: Změny zdravotných indikátorov welfare u mačiek v útulku ustajnených v skupine, Frontiers in Veterinary Science – *publikováno (2021, vol. 8, article nr. 701346)*

3b Veronika Vojtkovská, Eva Voslářová, Vladimír Večerek, Lenka Tomečková: Zmeny sociability mačiek v útulku, *Journal of Veterinary Behavior - Clinical Applications and Research – prijato k publikaci*

Cíl 4: Hodnocení ochrany ohrožených druhů volně žijících zvířat na základě analýzy obchodu s CITES exempláři

4a Martina Volfová, Gabriela Lukešová, Eva Voslářová, Vladimír Večerek: Analýza obchodu s CITES exempláři za období let 1975 až 2018, *Global Ecology and Conservation*

4b Martina Volfová, Gabriela Lukešová, Eva Voslářová, Vladimír Večerek: Analýza obchodu s CITES exempláři v České republice za období let 1992 až 2018, *Scientific Reports*

Cíl 5: Posouzení dopadu kontaminace vodního prostředí rtutí na zdraví živočichů vázaných na vodu na základě hodnocení obsahu rtuti u kormorána velkého a kapra obecného

5a Kamila Novotná, Zuzana Šířoká, Tomáš Král, Piotr Gomułka, Anna Spodniewska Zdeňka Svobodová: Posouzení dopadu kontaminace vodního prostředí rtutí na zdraví živočichů vázaných na vodu na základě hodnocení obsahu rtuti u kormorána velkého, *Bulletin of Contamination and Toxicology*

5b Kamila Novotná, Zuzana Šířoká, Zdeňka Svobodová: Posouzení dopadu kontaminace vodního prostředí rtutí na zdraví živočichů vázaných na vodu na základě hodnocení obsahu rtuti u kapra obecného, *Bulletin of Contamination and Toxicology*

Cíl 6: Hodnocení potenciálně negativních účinků estrogenů na ryby na základě hodnocení vybraných biochemických markerů u dospělých triploidních jedinců dáňia pruhovaného

6 Zuzana Weiserová, Jana Blahová, Veronika Doubková, Petr Maršálek, Roman Franěk, Martin Pšenička, Zdeňka Svobodová: Vliv estrogenů na změny vybraných biochemických markerů se zaměřením na hodnocení endokrinní disrupce u triploidních jedinců dáňia pruhovaného (*Danio rerio*), *Science of the Total Environment*

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	2 099 960	2 078 771
Služby	100 000	99 873,59
Cestovné	182	182
Další provozní náklady	1 229 793	1 229 919,41
Doplňkové náklady	514 490	514 490
Celkem	3 944 425	3 923 236

Zdůvodnění nákladů:

Náklady na řešení projektu byly čerpány v souladu s rozhodnutím o přidělení finančních prostředků, vzhledem k nedočerpání částky přidělené na Služby bylo převedeno 126,41 Kč do kategorie Další provozní náklady. Nedočerpání položky Osobní náklady bylo způsobeno slevou na odvodech (nedočerpáno celkem 21 189 Kč).

Osobní náklady:

Položka „Osobní náklady celkem“ zahrnuje odměny a odvody akademických pracovníků (Prof. MVDr. Vladimír Večerek, CSc., MBA, Prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D., Prof. MVDr. Zdeňka Svobodová, DrSc., Doc. Ing. Jana Blahová, Ph.D., Doc. MVDr. Petr Chloupek, Ph.D., Doc. Mgr. Petr Maršálek, Ph.D., MVDr. Martina Volfová, Ph.D., MVDr. Petra Doleželová, Ph.D., PharmDr. Zuzana Šířoká, Ph.D., Mgr. Veronika Doubková, Ph.D., Ing. Kamila Novotná Kružíková, Ph.D., MVDr. Michal Kaluža, MVDr. Gabriela Lukešová, Mgr. Veronika Vojtkovská) a stipendia studentů DSP (MVDr. Lenka Válková, MVDr. Zuzana Weiserová-Koutková), kteří byli součástí řešitelského týmu a podíleli se na řešení tohoto projektu.

Služby:

Položka „Služby“ zahrnuje náklady, které byly využity na překlad a jazykovou korekturu článků určených k publikaci ve vědeckém časopise s IF, mezilaboratorní porovnávání FAPAS, pronájem tlakových lahví na technické plyny a na servis zařízení, která byla využívána k vlastním analýzám při řešení dílčích úkolů (AMA 254, LC/MS, HPLC, analytické váhy). Celkové náklady v této položce byly 99 873,59 Kč.

Cestovné:

Položka „Cestovné“ zahrnuje náklady na dovoz vzorků ryb (tuzemské stravné pro 2 osoby ve výši 182 Kč).

Další provozní náklady:

Položka „Další provozní náklady“ představuje finanční prostředky, které byly využity pro nákup krmiva, chemikálií pro analýzy biochemických markerů, chemikálií pro úpravu vzorků, standardů pro testování obsahu účinné látky, ELISA kitů pro detekci vitellogeninu, ELISA kitů pro stanovení glukokortikoidů ve slinách, komerčních kitů pro analýzy biochemických markerů, certifikovaného referenčního materiálu, spotřebního materiálu pro analýzy biochemických markerů (např. špičky, Eppendorf zkumavky, kyvety, mikrotitrační destičky, suchý led), spotřebního materiálu pro přípravu histologických preparátů, spotřebního materiálu pro odběr a zpracování vzorků (odběrové zkumavky, Pasteurovy pipety, pitevní nástroje), filtrů pro přípravu ultračisté vody, akvaristických potřeb, SPE kolonek pro úpravu vzorků před analýzou, extrakčních kolonek pro úpravu vzorků, elektrod pro pH metr, spotřebního materiálu pro chromatografické vyšetření (vialky, kolony), rozpouštědla pro chromatografickou analýzu, nákup pohonných hmot. Dále byl zakoupen drobný hmotný materiál využívaný při zpracování vzorků (pipeta, třepačka) a přístroje pro analýzu vody (přenosný přístroj pro analýzu vody, přístroj pro stanovení chemické spotřeby O₂, llluminometr, inkubátory a další měřiče, čidla a sondy pro analýzu vody: fotometr multiparametrový, UV lampa, zákaloměr, centrifuga s rotorem, vortex, váha, sondy a příslušenství pro přenosný analyzátor vody). Dále byly zakoupeny kancelářské potřeby, které byly využity pro účely realizace předkládaného projektu. V položce Další provozní náklady je započítán také nákup software Medcalc pro pokročilou vícerozměrnou statistickou analýzu (1 licence), software Unistat pro statistickou analýzu (5 licencí) a statistický software Analyze-It

pro analýzu, vizualizaci a modelování biologických dat (1 licence), který byl zaúčtován jako opravy a udržování a ost. služby – software.

Celkové náklady v položce Další provozní náklady byly čerpány ve výši 1 229 919,41 Kč (původně přidělená částka byla navýšena o 126,41 Kč převedených z položky Služby).

Doplňkové náklady:

Položka „Doplňkové náklady“ představuje režijní náklady ve výši 514 490 Kč.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě doložen výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

9. Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VETUNI bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu:

7. 1. 2022

Prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D.

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu **odpovědného za čerpání prostředků:**

7. 1. 2022

Prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D.

Přednosta ústavu nebo kliniky, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu nebo klinice, respektive celoškolském pracovišti, které řídí.

Datum, jméno a podpis

přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

7. 1. 2022

Prof. MVDr. Vladimír Večerek, CSc., MBA

Datum, jméno a podpis
správce rozpočtu:

Ing. Luděk Vítoslavský

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis
děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.

Razítko

Příloha:

Vypracované články k publikaci k naplnění jednotlivých cílů projektu

Srovnání úrovně zdraví zvířat porážených na jatkách

**Simona Ninčáková¹, Vladimír Večerek², Lenka Válková², Eva Voslářová²,
Michal Kaluža², Veronika Zavřelová²**

¹Státní veterinární správa ČR, ²Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno

Abstrakt

Práce se zabývá úrovní zdraví skotu, prasat, ovcí, koz, králíků, drůbeže a pštrosů porážených na jatkách v České republice na základě výskytu nálezů detekovaných při post mortem veterinární prohlídce na jatkách v období let 2010 až 2019. Úroveň zdraví byla vyjadřovaná jako tzv. PA index získaný podílem počtu nálezů k celkovému počtu zjišťování (15) při patoanatomické prohlídce na jatkách násobený stem. Savci (skot, prasata, ovce a kozy) obecně měli vyšší PA index než ptáci (kur, krůty, kachny, husy, pštrosi), výjimkou byla jen kůzlata a králíci. Nejvyšší PA index byl zjištěn u krav (15,13) a selat (12,18), naopak nejnižší u brojlerových kuřat (0,102) a králíků a hus (obojí 0,14). U drůbeže se hodnoty PA indexu pohybovaly pod 1, s výjimkou nosnic (PA index 2,165). Z porovnání PA indexu u skupiny dospělých zvířat, skupiny zvířat vykrmovaných nebo mladých a skupiny mláďat vyřazovaných z chovu vyplývá, že vyšší PA index byl zjišťován u skupiny dospělých zvířat (PA index se pohyboval od 2,17 do 15,13) a skupiny mláďat vyřazovaných z chovu (PA index od 10,79 do 12,18), než u vykrmovaných zvířat (PA od 0,10 do 5,32). Ucelený přehled o zdravotní kondici porážených zvířat umožňuje chovatelům, veterinárním lékařům, přepravcům i provozovatelům jatek přijmout odpovídající a přesně zacílená preventivní opatření a tím v budoucnu zvýšit welfare a zdraví zvířat a současně snížit výskyt poškození jatečných těl.

Úvod

Veterinární prohlídka zvířat a jejich jatečných těl na jatkách je nejrozšířenějším a také nejdéle využívaným nástrojem veterinárního dozoru. Primárním účelem této prohlídky je identifikovat zvířata, jejichž maso a orgány nejsou vhodné pro lidskou spotřebu, a odstranit je tak z potravního řetězce. Veterinární prohlídka má však velký význam i z hlediska epizootologie a kontroly zdraví hospodářských zvířat. Dosud ne plně doceněným a dostatečně využívaným potenciálem veterinární prohlídky je možnost identifikovat a reflektovat aktuální problematiku welfare hospodářských zvířat (Stark et al., 2014, 2017). Patoanatomické změny, které lze vyčíst z jatečných těl porážených zvířat, lze mnohem snáze a precizněji monitorovat při postmortální prohlídce na jatkách (Huneau-Salaun et al., 2015). Důkladný rozbor četnosti trendů ve výskytu pato-anatomických nálezů tak může chovatelům a veterinárním lékařům poskytnout zpětnou vazbu, na základě které mohou aplikovat vhodná preventivní opatření a eliminovat tak riziko ohrožení zdraví zvířat a také ekonomických ztrát v chovech (Ceccarelli et al., 2018; Januskeviciene et al., 2010). Přestože protokoly z prohlídek (zejména těch postmortálních) poskytují velké množství informací o zdravotním stavu a kondici jatečných zvířat, není tento potenciál zatím ve většině zemí systematicky využíván (Stark, 2017).

Většina stávajících studií, které se zabývají příčinami vyřazení jatečných těl z lidské spotřeby či komplexně patoanatomickými nálezy zjištěnými v rámci postmortální veterinární

prohlídky na jatkách, se zaměřuje na konkrétní druh hospodářského zvířete, např. skot (Tabaran et al., 2018; Kaluža et al., 2020, 2021), prasata (Hansson et al., 2000; Kongsted and Sorensen, 2017; Večerek et al., 2020a,b), králíky (Drozd et al., 2019; Válková et al., 2021), brojlerová kuřata (Jakob et al., 1998; Ferreira et al., 2012; Amini et al., 2015; Buzdugan et al., 2020), nosnice (Keutgen et al., 1999), krůty (Lupo et al., 2010) nebo pštrosy (Dzoma et al., 2009). Vzhledem k odlišnostem v zaměření studií, metodice hodnocení nálezů, době trvání a rozsahu sledování (často údaje jen z jedné nebo několika málo jatek), je mezidruhové srovnání četnosti PA nálezů u jednotlivých druhů je obtížné. Studií, které za stejných podmínek a ve stejném období sledují, analyzují a vzájemně porovnávají patoanatomické nálezy u více druhů či kategorií hospodářských zvířat je minimum. Januskeviciene et al. (2010) srovnávali výskyt patologických nálezů u skotu, prasat, ovcí, koz, koní, králíků, zvěře a drůbeže (brojlerová kuřata, krůty, kachny) v Litvě v letech 2007–2009. Ceccarelli et al. (2018) analyzovali příčiny konfiskace jatečných těl a orgánů u skotu, prasat, ovcí a koní na vybraných jatkách v Itálii v letech 2010–2016. Lis (2005) sledoval výskyt patologických nálezů u skotu, prasat, ovcí a koní na jatkách v Polsku v roce 2003. Salines et al. (2017) se zaměřili na srovnání příčin vyrazení jatečných těl z lidské spotřeby u brojlerů, krůt, kachen a perliček poražených v Francii během jednoho roku (2012 to 2013).

Cílem této studie bylo na základě výsledku veterinární prohlídky na jatkách zhodnotit zdraví skotu, prasat, ovcí, koz, králíků, drůbeže (nosnice, brojleři, krůty, kachny, husy) a pštrosů pocházejících z chovů v České republice a poražených na jatkách v České republice v období let 2010 až 2019.

Materiál a metodika

Úroveň zdraví zvířat byla hodnocena na základě četností patoanatomických nálezů zjišťovaných v rámci veterinární prohlídky na jatkách u zvířat poražených na jatkách v České republice v období let 2010 až 2019. Úroveň zdraví byla vyjadřovaná jako tzv. PA index získaný podílem počtu nálezů k celkovému počtu zjišťování při patoanatomické prohlídce na jatkách násobený stem. PA index tak vyjadřoval hodnotu umožňující porovnávání úrovně zdraví jednotlivých druhů a kategorií poražených zvířat v určeném časovém období.

Bylo posuzováno zdraví skotu v kategoriích krávy, jalovice, býci ve výkrmu, telata, zdraví prasat v kategoriích prasnice, prasata ve výkrmu, selata, zdraví ovcí v kategorii ovce a jehňata, zdraví koz v kategorii kozy a kůzlata, zdraví králíků, zdraví drůbeže v kategoriích nosnice, brojleři, krůty, kachny, husy, a dále zdraví pštrosů.

Pro každé zvíře bylo provedeno 15 hodnocení zaměřených na orgánové nebo tkáňové celky anebo části těl, a to: játra, ledviny, plíce, gastrointestinální trakt, slezina, srdce, nervový systém, kůže, pohlavní orgány a mléčná žláza, hlava, trup, končetiny, svalovina, jiné nálezy a celý organismus (zahrnující nálezy nedostatečný vývin (zakrslost), vyhublost, ascites, abscesy, tuberkuloidní změny, cysticerkóza). U každého hodnocení byl učiněn závěr s nálezem anebo bez nálezů. Pro každý druh a kategorii poražených zvířat tak byl získán souhrnný počet nálezů a počet hodnocení za celé sledované období 10 let. Podíl počtu nálezů k počtu hodnocení násobený stem představoval hodnotu vyjadřující úroveň zdraví pomocí indexu PA nálezů nabývajících číselné hodnoty od 0 do 100.

Celková úroveň zdraví pro každý druh a kategorii poražených zvířat byla posuzována na základě hodnot PA indexu. Porovnáním PA indexů mezi jednotlivými druhy a kategoriemi poražených zvířat byly zjišťovány rozdíly mezi druhy a kategoriemi zvířat poražených na jatkách.

Dále byla porovnávána úroveň zdraví v rámci jednotlivých kategorií daného druhu a také mezidruhově v rámci skupiny dospělých zvířat, v rámci skupiny zvířat vykrmovaných nebo mladých a v rámci skupiny mláďat vyřazovaných z chovu.

K statistickému hodnocení byl použit počítačový program Unistat 6.5 for Excel (Unistat Ltd., London, England), a to Chí kvadrát test pro hodnocení statistické významnosti v kontingenční tabulce 2x2 používající při četnostech překračujících 5 Yatesovu korekci a při četnostech nižších než 5 Fisherův přesný test.

Výsledky

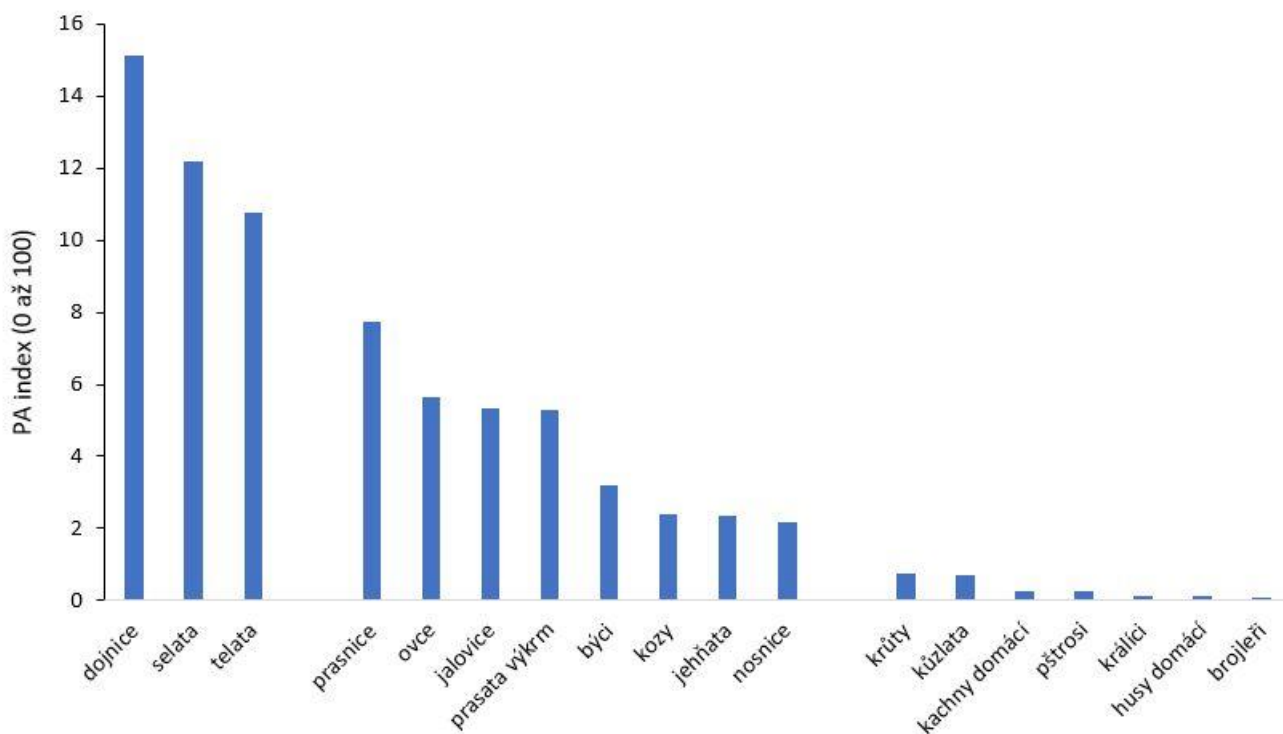
Srovnání hodnot PA indexu mezi jednotlivými druhy a kategoriemi zvířat poražených na jatkách v ČR v období let 2010 až 2019 je uvedeno v tabulce 1 a grafu 1. Hodnoty PA indexu vyjadřujícího poměr počtu nálezů k počtu hodnocení při veterinární prohlídce na jatkách u sledovaných druhů a kategorií zvířat se pohybovaly v rozmezí od 0,102 (brojlerová kuřata) do 15,129 (krávy). Toto rozpětí dokládá výrazné rozdíly v úrovni zdraví mezi jednotlivými druhy a kategoriemi poražených jatečných zvířat.

Tabulka 1. PA index (podíl počtu nálezů k celkovému počtu zjišťování při patoanatomické prohlídce na jatkách násobený stem) u druhů a kategorií zvířat poražených na jatkách v období let 2010 až 2019

Druh	Kategorie	Počet poražených zvířat	Počet nálezů	Počet zjišťování	PA index
Skot	Krávy	1136754	2579609	17051310	15,129 ^a
	Jalovici	257912	205946	3868680	5,323 ^f
	Býci výkrm	1015541	486901	15233115	3,196 ^h
	Telata	104459	168983	1566885	10,785 ^c
Prasata	Prasnice	586245	679175	8793675	7,723 ^d
	Výkrm	25027303	19817045	375409545	5,279 ^g
	Selata	123191	225002	1847865	12,176 ^b
Ovce	Bahnice	22815	19358	342225	5,657 ^e
	Jehňata	114264	39999	1713960	2,334 ^{i,j}
Kozy	Kozy	1348	483	20220	2,389 ^{i,j}
	Kůzlata	5778	627	86670	0,723 ^{l,m}
Králíci	Králíci	1876929	40206	28153935	0,143 ^{p,q}
Kur domácí	Brojlerová kuřata	1089406687	16678958	16341100305	0,102 ^r
	Nosnice	20030744	6503610	300461160	2,165 ^k
Krůty	Krůty	1181598	132261	17723970	0,746 ^{l,m}
Husy	Husy	37690	799	565350	0,141 ^{p,q}
Kachny	Kachny	28579765	1052604	428696475	0,246 ^{n,o}
Pštrosi	Pštrosi	6252	229	93780	0,244 ^{n,o}

^{a-r} odlišná písmena u PA indexů vyjadřují statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými druhy a kategoriemi zvířat ($P < 0,05$)

Graf 1. Porovnání PA indexů mezi jednotlivými druhy a skupinami zvířat



PA index vyšší než 10,00 byl zjištěn u krav, selat a telat a dokumentuje statisticky významně ($P < 0,05$) nižší úroveň zdraví těchto druhů a kategorií ve srovnání s ostatními druhy a kategoriemi porážených zvířat. PA index v rozmezí 9,99 až 1,01 byl zjištěn u prasnic, ovcí, jalovic, prasat ve výkrmu, býků, koz, jehňat a nosnic. PA index menší než 1,00 byl zjištěn u krůt, kůzlat, kachen, pštrosů, králíků, hus a brojlerových kuřat. Nejnižší PA index byl zjištěn u brojlerových kuřat, jeho hodnota byla statisticky významně nižší než u všech ostatních sledovaných druhů a kategorií zvířat.

Z mezidruhového srovnání vyplývá, že nejvyšší PA index a tedy nejhorší úroveň zdraví porážených zvířat byl zjištěn u skotu (krávy 15,129; telata 10,785; jalovice 5,323; býci 3,196) a prasat (selata 12,176; prasnice 7,723; výkrm 5,279).

Z porovnání PA indexu u skupiny dospělých zvířat, skupiny zvířat vykrmovaných nebo mladých a skupiny mláďat vyřazovaných z chovu vyplývá, že vyšší PA index byl zjišťován u skupiny dospělých zvířat (PA index od 2,165 do 15,129) a skupiny mláďat vyřazovaných z chovu (PA index od 10,785 do 12,176), než u vykrmovaných zvířat (PA index od 0,102 do 5,323).

Diskuze

Výsledky práce dokumentují výrazné rozdíly v počtu nálezů zjišťovaných při veterinární prohlídce na jatkách, a tedy v úrovni zdraví různých druhů a kategorií zvířat v době porážky. Savci (skot, prasata, ovce a kozy) obecně měli vyšší PA index než ptáci (kur, krůty, kachny, husy, pštrosi), výjimkou byla jen kůzlata a králíci. Je to pravděpodobně dáno kratší délkou produkčního života porážených ptáků, ale určitý vliv může mít i způsob chovu či genetická výbava (odolnost, temperament) jednotlivých druhů zvířat. K obdobným závěrům dospěli Januskeviciene et al. (2010), kteří zjistili nejvíce patoanatomických nálezů u prasat (14,92%) a skotu (9,08%), naopak nejméně u drůbeže (0,90%) a králíků (0,13%).

Naše výsledky ukazují, že nejvíce postiženou kategorií byly krávy (PA index 15,129). Dojnice i krávy bez tržní produkce mléka zůstávají v chovech ve srovnání s other livestock

výrazně déle. Vysoká intenzita produkce dojníc společně s delší dobou využití v chovech má vliv na úroveň zdraví a také na možný výskyt produkčních onemocnění, které jsou spojeny s charakteristickými nálezy na jatkách. U krav bez tržní produkce mléka je přítomnost zdravotních problémů podmíněna zejména dlouhou životností zvířat na farmách. Vliv věku na míru konfiskací na jatkách reported také Dupuy et al. (2013). Zhoršená úroveň zdraví z pohledu četnosti patologických nálezů byla zjištěna rovněž u telat (PA index 10,785). Naopak dobrá úroveň zdraví byla u skotu zaznamenána u býků (PA index 3.196) a jalovic (PA index 5,323). Býci a jalovice jsou chovány především extenzivním způsobem a poráženy zpravidla do 24 měsíců, což snižuje riziko výskytu onemocnění a tím i nálezů detekovaných při veterinární prohlídce. Obdobně, Nicholson et al. (2013) v USA nebo Dupuy et al. (2013) ve Francii zjistili nižší míru nálezů u býků ve srovnání s krávami. Rozdíly mezi kategoriemi mohou souviset také s odlišným zacházením s býky a kravami na jatkách (Večerek et al. 2021).

Vedle skotu byla nejhorší úroveň zdraví detekována u prasat. Vysokou míru konfiskací u prasat zmiňují i Ceccarelli et al. (2018) nebo Lis (2005). Výsledky naší studie ukázaly, že na rozdíl od skotu jsou u prasat nejčastěji detekovány nálezy u nejmladší kategorie, tj. u selat (PA index 12.176). Úroveň zdraví prasnic (PA index 7,723) byla ve srovnání s poráženými selaty lepší. V obou případech se jedná o zvířata vyřazovaná z chovu z důvodu narušeného zdraví či produkce. Nižší výskyt patologických nálezů u prasat ve výkrmu dokládá dobrou úroveň zdraví dosahovanou u této kategorie i v podmínkách konvenčního výkrmu, k čemuž přispívá i eliminace selat s neodpovídající kondicí a zdravím při zahájení výkrmu (Lopez-Verge et al., 2018). Obecně lepší úroveň zdraví ve srovnání se skotem a prasaty byla zaznamenána u ovcí a koz. Torina et al. (2004) upozorňují, že až 80% patologii u ovcí a koz je spojeno s přítomností parazitů. Vyšší výskyt nálezů u ovcí než u koz zjištěný v naší studii může být zapříčiněn odlišným způsobem chovu v ČR i jejich chováním na pastvě ovlivňujícím riziko parazitární infekce. Zatímco ovce jsou chovány celoročně nebo po většinu roku na pastvinách, kozy jsou na pastviny vyháněny zpravidla pouze během sezóny a jen na určitou část dne, případně jsou chovány celoročně ve stájích. Navíc na rozdíl od ovcí, které upřednostňují pastvu při zemi, pro kozy je přirozené selektivní spásání zejména listů keřů a stromů a vyhýbají se pokáleným místům (Yiakoulaki and Papanastasis, 2009; Fox et al., 2013).

Nejnižší PA index mezi savci vykazovali jateční králíci. Na jatky se dostává kategorie vykrmovaných králíků, což znamená, že se jedná o jedince v dobré kondici (Schwartzkopf-Genswein et al., 2012). Svou roli může hrát i vysoká mortalita králíků při přepravě na jatky (Voslářová et al., 2018). Je tedy možné, že králíci, kteří nejsou v optimální zdravotní kondici, zahynou už během přepravy a na porážku se tak vůbec nedostanou. Rampin et al. (2008) při prohlídce králíků na jatkách v Itálii zjistili patologické změny u 1% jatečných těl, šlo zejména o léze v trávicím a močovém ústrojí.

U drůbeže se hodnoty PA indexu pohybovaly pod 1, s výjimkou nosnic (PA index 2,165). Doba chovu, způsob chovu a využití nosnic se výrazně liší od ostatní porážené drůbeže. Zatímco brojlerová kuřata, husy, kachny a krůty jsou poráženy po několika týdnech až měsících výkrmu a jedná se tedy obvykle o mladé ptáky v dobré kondici, nosnice jsou odeslány na porážku po cca roční intenzivní produkci vajec. Navíc v ČR stále u nosnic převládá klecový chov, na rozdíl od ostatní drůbeže, která je chována volně na podestýlce. Salines et al. (2017) zjistili podstatně méně patoanatomických nálezů u drůbeže, která měla možnost pohybu ve volném výběhu. Efekt věku, způsobu a doby chovu je zvláště patrný v rozdílu mezi mírou PA nálezů u nosnic (2,165) a brojlerových kuřat (0,102), tedy stejného živočišného druhu (kur domácí). U brojlerových kuřat byl zjištěn nejnižší PA index ze všech sledovaných druhů a kategorií zvířat, současně se jedná také o kategorii poráženou v nejnižším věku. Jen o málo vyšší PA index byl zjištěn u hus (0.141). Pravděpodobným

vysvětlením je, že se jedná se o poměrně nenáročný a přizpůsobivý druh, který je navíc i za komerčním účelem často chován extenzivním způsobem (výběh s pastvou, přístup k vodě), který zohledňuje přirozené potřeby tohoto druhu (Tremolada et al., 2020). Naopak nejvíce PA nálezů mezi vykrmovanou drůbeží bylo zjištěno u krůt. Obdobně, Januskeviciene et al. (2010) zjistili více PA nálezů u krůt než u brojlerů a kachen. Bližší analýzou nálezů u krůt zjistili, že většina lézí se nacházela na končetinách (85,79%). Také Sanotra et al. (2001) a Krautwald-Jungehanns (2003) potvrzují, že patologické procesy na končetinách jsou u intenzivně chovaných krůt (zejména u samců) frekventovaným nálezem. Jejich vysoká hmotnost je příčinou toho, že běháky krocanů jsou v intenzivním kontaktu s podestýlkou a jsou tak náchylnější ke vzniku kožních lézí (Salines et al. (2017).

Komerční chov pštrosů a jejich přeprava na jatky jsou v České republice stále poměrně vzácné. Všechny systémy chovu pštrosů vycházejí z jejich přirozených podmínek a chovají se výhradně v kombinaci s venkovním výběhem (free range). Péči a manipulaci se pštrosy se věnuje zvýšená pozornost jednak s ohledem na potenciální nebezpečnost těchto zvířat, jednak z důvodu snahy nezneškodit jejich kůži, která je také cenným artiklem (Meyer et al., 2003; Engelbrecht et al., 2009). Přesto i u pštrosů byly zaznamenány PA nálezy na ne zcela zanedbatelné úrovni (PA index 0,244). Z toho pohledu a vzhledem k absenci relevantních studií je žádoucí směřovat další výzkum na podrobnější analýzu charakteru a příčin nálezů u pštrosů.

U všech sledovaných živočišných druhů (zahrnujících kategorii vykrmovaných zvířat) byl zaznamenán nižší PA index v kategorii vykrmovaných zvířat ve srovnání s kategorií mláďat (telata, selata) či post-produkčních zvířat (krávy, prasnice, nosnice). Zvláště u starších a vyřazených zvířat je pravděpodobnost narušeného welfare při přepravě a porážení a následně kvality jatečných těl vysoká, neboť jejich ekonomická hodnota je nízká a často se jim proto nedostává odpovídající péče (Grandin, 2001). Vykrmovaná zvířata jsou zasilána na jatky, protože dosáhla optimálních porážkových parametrů (věk, hmotnost) a nikoliv proto, že by byla vyřazena z chovu v důsledku snížené kondice, jak tomu bývá u mláďat či postprodukčních zvířat. Vykrmená zvířata, vzhledem ke své dobré kondici a robustní tělesné stavbě (Schwartzkopf-Genswein et al., 2012), také lépe odolávají nepříznivým faktorům (odchyt, nakládání do přepravních kontejnerů či vozidel, neznámé prostředí, míchání navzájem neznámých jedinců, způsob zacházení, nepříznivé klimatické podmínky, délka přepravy atd.), které mohou ohrozit jejich zdravotní stav v průběhu přepravy a manipulace na jatkách (Grandin, 2001; Eicher et al., 2006; Fike and Spire, 2006).

Údaje o výskytu patoanatomických nálezů, zjišťovaných u poražených zvířat v rámci postmortální veterinární prohlídky, jsou velmi cenné jak z pohledu vědeckého výzkumu, tak především z pohledu prevence negativních dopadů na zdravotní stav hospodářských zvířat. Ucelený přehled o zdravotní kondici poražených zvířat umožňuje chovatelům, veterinárním lékařům, přepravním i provozovatelům jatek přijmout odpovídající a přesně zacílená preventivní opatření a tím v budoucnu zvýšit welfare a zdraví zvířat a současně snížit výskyt poškození jatečných těl.

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

Literatura

Amini K, Zachar T, Popowich S, Knezacek T, Goodhope B, Willson P, Gomis S 2015: Association of increased rate of condemnation of broiler carcasses due to hepatic abnormalities with immunosuppressive diseases in the broiler chicken industry in Saskatchewan. Can J Vet Res 79: 261-267

Buzdugan SN, Chang YM, Huntington B, Rushton J, Guitian J, Alarcon P, Blake DP 2020: Identification of production chain risk factors for slaughterhouse condemnation of broiler chickens. *Prev Vet Med* 181: 105036

Ceccarelli M, Leprini E, Sechi P, Iulietto MF, Grispoli L, Goretti E, Cenci-Goga, BT 2018: Analysis of the causes of the seizure and destruction of carcasses and organs in a slaughterhouse in central Italy in the 2010-2016 period. *Ital J Food Saf* 7: 6899

Drozd L, Paszkiewicz W, Pyz-Lukasik R 2019: Post-slaughter changes in rabbit carcasses in Poland between 2010 and 2018. *Med Weter* 75: 613-616

Dupuy C, Morignat E, Maugey X, Vinard JL, Hendrikx P, Ducrot C, Calavas D, Gay E 2013: Defining syndromes using cattle meat inspection data for syndromic surveillance purposes: a statistical approach with the 2005-2010 data from ten French slaughterhouses. *BMC Vet Res* 9: 1-17

Dzoma BM, Pansiri E, Segwagwe BVE 2009: A retrospective study on the prevalence of ostrich carcass and organ condemnations in Botswana. *Trop Anim Health Pro* 41: 443-448

Eicher SD, Cheng HW, Sorrels AD, Schutz MM 2006: Behavioral and physiological indicators of sensitivity or chronic pain following tail docking. *J Dairy Sci* 89: 3047-3051

Engelbrecht A, Hoffman LC, Cloete SWP, van Schalkwyk SJ 2009: Ostrich leather quality: a review. *Anim Prod Sci* 49: 549-557

Ferreira TZ, Sesterhenn R, Kindlein L 2012: Economic losses of main causes of condemnation of the broiler carcass in a slaughterhouse under Federal Inspection on Rio Grande do Sul, Brazil. *Acta Sci Vet* 40: 1021

Fike K, Spire MF 2006: Transportation of cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 22: 305-320

Fox NJ, Marion G, Davidson RS, White PCL, Hutchings MR 2013: Modelling parasite transmission in a grazing system: The importance of host behaviour and immunity. *PLoS ONE* 8: 1-11

Grandin T 2001: Perspectives on transportation issues: The importance of having physically fit cattle and pigs. *J Anim Sci* 79: E201-E207

Hansson I, Hamilton C, Ekman T, Forslund K 2000: Carcass quality in certified organic production compared with conventional livestock production. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47: 111-120

Huneau-Salaun A, Stark KDC, Mateus A, Lupo C, Lindberg A, Le Bouquin-Leneveu S 2015: Contribution of meat inspection to the surveillance of poultry health and welfare in the European Union. *Epidemiol Infect* 143: 2459-2472

Jakob HP, Morgenstern R, Albicker P, Hoop RK 1998: Condemnation reasons of slaughtered broilers from two major Swiss producing companies. *Schweiz Arch Tierh* 140: 60-64

Januskeviciene G, Paulauskas V, Dailidaviciene J, Juozaitiene V 2010: Analysis of pathologic lesions in the livestock and poultry slaughtered in the meat establishments of Lithuania. *Vet Zootec* 52: 33-42

Kaluža M, Večerek V, Voslářová E, Semerád Z, Passantino A 2020: Assessing the standard of health and welfare in individual categories of cattle from the viewpoint of intravital pathological changes. *Agriculture-Basel* 10: 619

Kaluža M, Večerek V, Voslářová E, Semerád Z, Passantino A 2021: Incidence of characteristic findings during veterinary carcass inspections 2010–2019 in the Czech Republic and the relation to the level of health and welfare of individual classes of cattle. *Animals* 11: 537

Keutgen H, Wurm S, Ueberschar S 1999: Pathologic changes in end-of-lay hens with regards to different housing systems. *Deut Tierarztl Woch* 106: 127-133

Kongsted H, Sorensen JT 2017: Lesions found at routine meat inspection on finishing pigs are associated with production system. *Vet J* 223: 21-26

Krautwald-Jungehanns ME 2003: Putenproduktion in Deutschland: Ansätze für eine tierschutzgerechte Haltung. *Deutsche Tierärzteblatt* 1: 4-8

Lis H 2005: Results of veterinary inspection of slaughter animals and meat in Poland in 2003. *Med Weter* 61: 1160-1161

Lopez-Verge S, Gasa J, Farre M, Coma J, Bonet J, Sola-Oriol D 2018: Potential risk factors related to pig body weight variability from birth to slaughter in commercial conditions. *Transl Anim Sci* 2: 383-395

Lupo C, Le Bouquin S, Allain V, Balaine L, Michel V, Petetin I, Colin P, Chauvin C 2010: Risk and indicators of condemnation of male turkey broilers in western France, February-July 2006. *Prev Vet Med* 94: 240-250

Meyer A, Cloete SWP, Brown CR, van Schalkwyk SJ 2003: The persistence to slaughter age of scars resulting from damage inflicted to ostrich skins during the grow-out phase. *S Afr J Anim Sci* 33: 32-37

Nicholson JDW, Nicholson KL, Frenzel LL, Maddock RJ, Delmore RJ, Lawrence TE, Henning WR, Pringle TD, Johnson DD, Paschal JC, Gill RJ, Cleere JJ, Carpenter BB, Machen RV, Banta JP, Hale DS, Griffin DB, Savell JW 2013: Survey of transportation procedures, management practices, and health assessment related to quality, quantity, and value for market beef and dairy cows and bulls. *J Anim Sci* 91: 5026-5036

Rampin F, Piccirillo A, Schiavon E, Poppi L, Grilli G 2008: Detection of pathological lesions in slaughtered rabbits. *Ital J Anim Sci* 7: 105-111

Salines M, Allain V, Roul H, Magras, C, Le Bouquin S 2017: Rates of and reasons for condemnation of poultry carcasses: harmonised methodology at the slaughterhouse. *Vet Rec* 180: 516-516

Sanotra GS, Lawson LG, Vestergaard KS 2001: Influence of stocking density on tonic immobility, lameness, and tibial dyschondroplasia in broilers. *J Appl Anim Welf Sci* 4: 71-87

Schwartzkopf-Genswein KS, Faucitano L, Dadgar S, Shand P, Gonzalez LA, Crowe TG 2012: Road transport of cattle, swine and poultry in North America and its impact on animal welfare, carcass and meat quality: A review. *Meat Sci* 92: 227-243

Stark KDC 2017: Abattoir condemnation data remain underused in decision making. *Vet Rec* 180: 514-515

Stark KDC, Alonso S, Dadios N, Dupuy C, Ellerbroek L, Georgiev M, Hardstaff J, Huneau-Salaun A, Laugier C, Mateus A, Nigsch A, Afonso A, Lindberg A 2014: Strengths and weaknesses of meat inspection as a contribution to animal health and welfare surveillance. *Food Control* 39: 154-162

Tabaran A, Dan SD, Reget O, Tabaran AF, Mihaiu M 2018: Slaughterhouse survey on the frequency of pathologies found in bovine post-mortem inspections. *Bull UASVM Vet Med* 75: 251-255

Tremolada C, Bielińska H, Minero M, Ferrante V, Canali E, Barbieri S 2020: Animal-based measures for the on-farm welfare assessment of geese. *Animals* 10: 890

Torina A, Dara S, Marino AMF, Sparagano OAE, Vitale F, Reale S, Caracappa, S 2004: Study of gastrointestinal nematodes in Sicilian sheep and goats. *Ann N Y Acad Sci* 1026: 187-194

Válková L, Večerek V, Voslářová E, Zavřelová V, Conte F, Semerád Z 2021: The health and welfare of rabbits as indicated by post-mortem findings at the slaughterhouse. *Animals* 11: 659

Večerek V, Večerková L, Voslářová E 2019: Comparison of the frequency of patho-anatomic findings in laying hens with findings in broiler chickens and turkeys detected during post-mortem veterinary inspection. *Poultry Sci* 98: 5385-5391

Večerek V, Voslářová E, Semerád Z 2020a: Patho-anatomic findings in finisher pigs, sows and piglets detected during veterinary slaughterhouse inspection. *Acta Vet Brno* 89: 341-347

Večerek V, Voslářová E, Semerád Z, Passantino A 2020b: The health and welfare of pigs from the perspective of post mortem findings in slaughterhouses. *Animals* 10: 825

Večerek V, Voslářová E, Kameník, J, Machovcová Z, Válková L, Volfová M, Konvalinová J 2021: The effect of slaughtering skills on the welfare of cattle during stunning with a captive bolt. *Acta Vet Brno* 90: 109-116

Večerková L, Voslářová E, Večerek V 2019: Comparison of the welfare of laying hens, broiler chickens and turkeys in terms of bird health as surveyed during inspection in slaughterhouses. *Acta Vet Brno* 88: 243-248

Voslářová E, Večerek V, Bedáňová I, Večerková L 2018: Mortality in rabbits transported for slaughter. *Anim Sci J* 89: 931-936

Yiakoulaki M, Papanastasis V 2009: Foraging behaviour of sheep and goats grazing on silvopastoral systems in Northern Greece. *Options Méditerran* 85: 79-84

Zdraví zvířat z pohledu nálezů poškození jater zjišťovaných při prohlídce post mortem na jatkách

Lenka Válková, Eva Voslářová, Vladimír Večerek, Veronika Zavřelová

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

Abstrakt

Sledovali jsme poškození jater u skotu, prasat, ovcí, koz, králíků a drůbeže v letech 2010 až 2019 u všech zvířat chovaných porážených na jatkách v České republice. Zjišťovali jsme pro jednotlivé kategorie zvířat celkové počty nálezů na játrech a dále v jejich členění na akutní, chronické, parazitární, ostatní. Zjistili jsme, že výskyt poškození jater celkem je u všech druhů vyšší u zvířat dospělých ve srovnání se zvířaty vykrmovanými a mladými, je u skotu a prasat vyšší u mláďat vyřazovaných z chovu ve srovnání se zvířaty vykrmovanými a mladými, je při porovnání druhů u dospělých zvířat nejvyšší v pořadí dojnice 46,13 %, prasnice 17,43 %, ovce 13,07 %, kozy 4,04 %, je při porovnání druhů u vykrmovaných a mladých zvířat nejvyšší v pořadí jalovice 14,79 % a býci 8,12 %, prasata ve výkrmu 11,26 %, jehňata 5,04 %, kůzlata 0,75 %, je při porovnání druhů u mláďat vyřazovaných z chovu nejvyšší v pořadí selata 29,40 %, telata 17,12 %, a dále je pro drůbež a králíky nejvyšší v pořadí krůty 3,35 %, kachny 1,89 %, husy 1,15 %, brojleři 0,08 % a králíci 0,05 %. Nálezy chronické a akutní vykazují obdobnou strukturu jako nálezy celkové, nálezy parazitární tuto strukturu (pořadí) nálezů nemají, protože se vyskytují vyšší počty parazitárních nálezů zejména u ovcí, jehňat a prasat ve výkrmu. Výsledky dokládají zjištění, že vykrmovaná a mladá zvířata mají lepší jaterní kondici než zvířata dospělá, že vyřazovaná mláďata z chovu mají horší jaterní kondici než věkem starší vykrmovaná zvířata, že nejvyšší rozdíl mezi skutečnou výživou a potřebou metabolismu způsobující porušení jater je u skotu, po té u prasat, po té u ovcí a po té u koz, a to jak u dospělých tak také u vykrmovaných a mladých zvířat. U parazitárního zatížení jater výsledky dokládají skutečnost, že způsob výživy ve vztahu k možnostem parazitární invaze se odráží na výskytu parazitárních nálezů na játrech a to nejvíce u zvířat pasených na loukách s parazitární invazí, tj. ovcí (8,09 %) a jehňat (3,84 %), po té u jalovic (1,5 %) a dále u zvířat, kde z hlediska ochrany masa před rezidui antiparazitik je antiparazitární ochrana omezena, tj. u prasat ve výkrmu (3,76 %). Zvířata chovaná ve stáji, tj. dojnice, býci, prasnice, ovce, kůzlata jsou zatížena parazitární invazí výrazně méně. U králíků a drůbeže je parazitární poškození jater zjišťováno ojediněle. Zjištěné výsledky vytváří znalostní podklad pro opatření k zlepšení zdraví a kondice jater u potravinových zvířat.

Úvod

Játra představují hlavní orgán metabolismu u zvířat. Jejich dobrá kondice významně přispívá k celkovému zdraví zvířat, jejich narušení naopak zhoršuje zdraví zvířat a tím také pohodu zvířat. Vzhledem k tomu, že jsou játra ústředím mnoha trávicích, metabolických i produkčních procesů, je důležité dobře porozumět všem faktorům, které mají vliv na jejich funkci. Je třeba důkladně zkoumat vliv jednotlivých aspektů výživy (nutriční složení krmné dávky, restriktce krmiva, anti-nutriční faktory, strukturní složení krmiva, doplňky výživy atd.) na velikost, vývoj a funkci jater. Pozornost je nutné zaměřit i na technologii zpracování krmiv (jako je tepelné ošetření, peletování, velikost částic či úprava celozrnných produktů), pokud jde o dopad na stav jaterní tkáně (Zaefarian et al. 2019). K narušení jater dochází zpravidla při narušeném metabolismu, a to nejčastěji z důvodu nedostatků ve výživě zvířat. Nebo jsou játra narušena v důsledku parazitární invaze jako cílového orgánu, a nebo jako orgánu migrace

parazitů v rámci standardní anebo náhodné migrační cesty v organismu zvířat. Játra mohou být poškozena rovněž v důsledku infekčního procesu či intoxikace organismu (např. těžkými kovy či toxiny plísní). Negativní vliv na funkci jater může mít i nevhodný způsob chovu (Keutgen, 1999). O zatížení jater hospodářských zvířat svědčí i výsledky rozsáhlé polské studie (Januskeviciene et al., 2010), z kterých vyplývá, že patologické nálezy jsou při postmortální veterinární prohlídce na polských jatkách nejčastěji detekovány v dýchacím ústrojí hospodářských zvířat (konkrétně u 35,61 % ze všech porážených zvířat), v těsném sledu pak následují léze na játrech (zaznamenány u 34,19 % ze všech porážených zvířat).

Patoanatomické nálezy na játrech porážených zvířat jsou zmiňovány v řadě studií, které se zabývají příčinami konfiskace jatečných těl hospodářských zvířat v rámci postmortální veterinární prohlídky. Většina těchto studií se však zaměřila jen na konkrétní druh hospodářského zvířete, např. na skot (Tabaran et al., 2018; Kaluža et al., 2020, 2021), prasata (Lis, 1999, 2002; Večerek et al., 2004, 2020a,b), králíky (Válková et al., 2021; Conficoni et al., 2020; Drozd et al., 2019; Rampin et al., 2008), brojlerová kuřata (Jakob et al., 1998; Amini et al., 2015; Buzdugan et al., 2020), nosnice (Keutgen et al., 1999) či krůty (Lupo et al., 2010).

Játra narušená patologickým procesem znamenají nejen ekonomickou ztrátu v důsledku konfiskace, ale mohou za určitých okolností (např. nedostatečná tepelná úprava) představovat i závažné nebezpečí z pohledu zdraví lidí. Zoonotický potenciál nelze podceňovat u diagnóz jako je např. hepatitis B, kampylobakteriíza, hydatóza, intoxikace těžkými kovy atd. (Zhao et al., 2016; Lemos et al., 2015; Ceccarelli et al., 2018; Tulayakul et al., 2018)

Cílem práce bylo porovnat počty narušení jater u různých druhů a kategorií zvířat porážených na jatkách a zjistit tak celkovou úroveň zdraví a poškození jater pro jednotlivé druhy a kategorie jatečných zvířat a zjistit, které druhy a kategorie jatečných zvířat jsou na tom celkově z pohledu zdraví jater nejhůře a dále zjistit, které naopak nejlépe. Tyto výsledky jsou významné z hlediska potřebných cílených opatření k zlepšování výživy zvířat a nebo z hlediska uplatňování protiparazitárních opatření, směřujících k zlepšování zdraví a tím také welfare jatečných zvířat.

Cílem práce bylo dále rozlišit charakter poškození jater akutní, chronický a parazitární, a to z důvodu bližší specifikace příčiny poškození jater. U akutních poškození je příčinou zpravidla poškození způsobené náhlými změnami ve výživě zvířat, u chronických poškození se zpravidla jedná o poškození způsobené dlouhodobými nedostatky ve výživě zvířat. U parazitárních poškození jde o poškození jater parazity. Porovnání počtů pro akutní a chronické poškození a pro parazitární poškození je významné z pohledu podílu příčin na poškození jater a tím také pro stanovení dalších opatření k snížení úrovně poškození jater u zvířat, a to opatřeními směřujícími proti náhlým změnám ve výživě zvířat, nebo proti dlouhodobým nedostatkům ve výživě zvířat a nebo proti parazitární invazi zvířat.

Materiál a metodika

Poškození jater bylo sledováno u zvířat porážených na jatkách v rámci veterinární dozoru nad zdravotní nezávadností orgánů porážených zvířat při veterinární prohlídce po porážení. Byla sledována všechna zvířata chovaná v chovech a porážená na jatkách v České republice v období let 2010 až 2019.

Veterinární prohlídku u porážených zvířat prováděli úřední veterinární lékaři státní veterinární správy, kteří odlišovali játra bez poškození a játra s poškozením, přičemž zaznamenávali charakter poškození jater v rozlišení poškození akutní, poškození chronické, poškození parazitárního původu a poškození ostatní (zpravidla ikterické změny).

Poškození jater bylo sledováno u skotu pro kategorie dojnice, jalovice, býci ve výkrmu a telata vyřazovaná z chovu, dále u prasat pro kategorie prasnice, prasata ve výkrmu, a selata vyřazovaná z chovu, dále u ovcí pro kategorie bahnice a jehňata, dále u koz pro kategorie

kozy a kůzlata, dále u králíků, a dále u drůbeže pro druhy a kategorie nosnice, brojeři, krůty, kachny domácí, husy domácí.

Pro každou kategorii porážených zvířat byl zjišťován za celé sledované období 10 let počet porážených zvířat a počet nálezů na játrech v členění na akutní, chronické, parazitární, ostatní a dále počty nálezů celkem; počty nálezů byly přepočítány na relativní počty vyjadřované v procentech.

K statistickému porovnání zjištěných počtů nálezů byl využit Chí kvadrát test.

Byl porovnáván výskyt celkových nálezů mezi jednotlivými kategoriemi porážených zvířat s cílem zjistit, u kterých kategorií se vyskytují nálezy na játrech nejčastěji a u kterých naopak nejméně často. Zde byly porovnávány celkové nálezy pro jednotlivé druhy mezi kategorií dospělých zvířat s kategorií vykrmovaných a mladých zvířat, s cílem zjistit pro jednotlivé druhy, zda-li se celkové nálezy na játrech vyskytují častěji u dospělých zvířat a nebo u zvířat vykrmovaných a mladých. Dále zde byly porovnávány celkové nálezy pro jednotlivé druhy mezi kategorií mláďat vyřazovaných z chovu s vykrmovanými a mladými zvířaty, s cílem zjistit pro jednotlivé druhy, zda-li se celkové nálezy na játrech vyskytují častěji u mláďat vyřazovaných z chovu a nebo u zvířat vykrmovaných a mladých.

Byly porovnávány nálezy mezi jednotlivými druhy zvířat celkově, s cílem zjistit, u kterých druhů zvířat se vyskytují celkové nálezy na játrech nejčastěji a u kterých nejméně často. Zde byly porovnávány mezi sebou jednotlivé kategorie zvířat dospělých, s cílem zjistit, u kterých kategorií dospělých zvířat se vyskytují celkové nálezy na játrech nejčastěji a u kterých nejméně často. Dále zde byly porovnávány mezi sebou jednotlivé kategorie zvířat vykrmovaných a mladých, s cílem zjistit, u kterých kategorií vykrmovaných a mladých zvířat se vyskytují celkové nálezy na játrech nejčastěji a u kterých nejméně často.

Obdobně jako pro celkové nálezy byly porovnávány nálezy chronické, stejně tak akutní a stejně tak parazitární.

Ze získaných výsledků byla dovozována zjištění porovnávající dospělá a vykrmovaná zvířata, dále porovnávající mláďata vyřazovaná z chovu a vykrmovaná zvířata, dále porovnávající celkově jednotlivé druhy zvířat mezi sebou, dále porovnávající jednotlivé druhy v kategorii dospělých zvířat a dále porovnávající jednotlivé druhy mezi sebou v kategorii vykrmovaných a mladých zvířat. Tyto závěry byly zjišťovány pro celkové nálezy a dále pro nálezy akutní, nálezy chronické a nálezy parazitární s cílem zjištění pravděpodobného původu poškození jater a tak vytvořit znalostní podklad pro cílení opatření k zlepšení zdraví a kondice jater z potravinových zvířat porážených na jatkách.

Výsledky

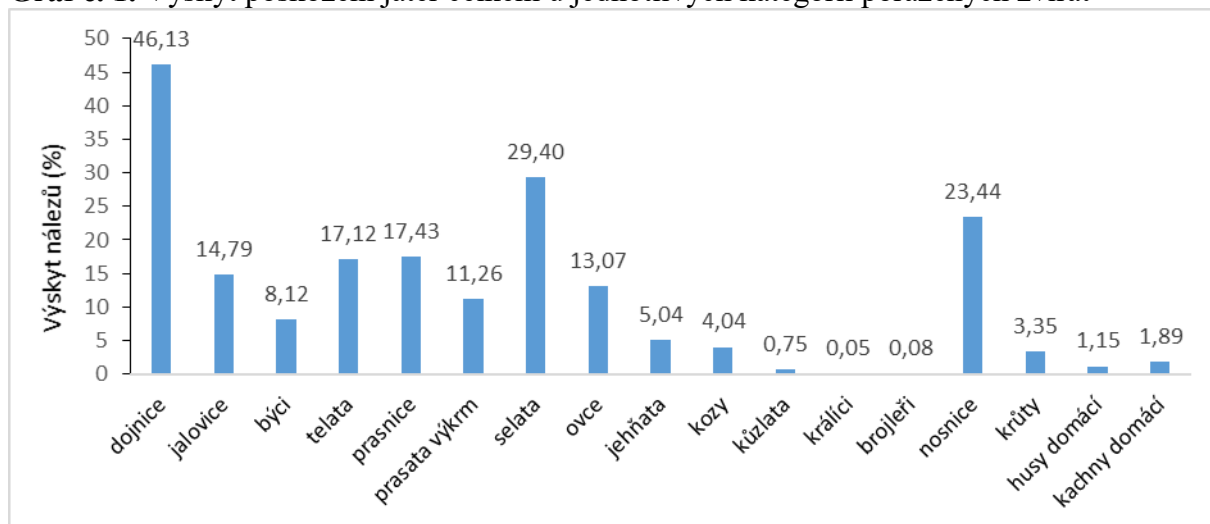
Sledovali jsme výskyt poškození jater u různých druhů a kategorií zvířat porážených na jatkách. Výskyt poškození jater u jednotlivých kategorií porážených zvířat je uveden v grafu č. 1. Statistickým porovnáním byly mezi jednotlivými kategoriemi zjištěny statisticky vysoce významné rozdíly ($p < 0,01$), s výjimkou porovnání koz a jehňat ($p = 0,10$) a koz a krůt ($p = 0,16$).

Z grafu č. 1 je zřejmé, že výskyt poškození jater celkem je u všech druhů vyšší u zvířat dospělých ve srovnání se zvířaty vykrmovanými a mladými, je u skotu a prasat vyšší u mláďat vyřazovaných z chovu ve srovnání se zvířaty vykrmovanými a mladými, je při porovnání druhů u dospělých zvířat nejvyšší v pořadí dojnice, prasnice, ovce, kozy, je při porovnání druhů u vykrmovaných a mladých zvířat nejvyšší v pořadí jalovice a býci, prasata ve výkrmu, jehňata a kůzlata, a dále je pro drůbež a králíky nejvyšší v pořadí krůty, kachny, husy, brojeři a králíci.

Počty porážených zvířat a výskyt poškození jater v členění na akutní, chronické, parazitární a ostatní jsou uvedeny v tabulce č. 1. Z tabulky je zřejmé, že výskyt poškození jater chronických se vyskytuje ve stejné struktuře jako nálezy celkové, že výskyt poškození

jater akutních se vyskytuje ve stejné struktuře jako nálezy celkové. Dále že výskyt poškození jater parazitárního původu se neshoduje se strukturou nálezů akutních a nebo chronických, a to vyšší je u zvířat dospělých ve srovnání se zvířaty vykrmovanými a mladými u ovcí a koz, naopak je tomu u skotu a prasat, dále je u skotu a prasat vyšší u zvířat vykrmovaných a mladých ve srovnání s mláďaty vyřazovanými z chovu, dále je při porovnání druhů u dospělých zvířat nejvyšší v pořadí ovce, dojnice, kozy a prasnice, a dále je při porovnání druhů u vykrmovaných a mladých zvířat nejvyšší v pořadí jehňata, prasata ve výkrmu, jalovice a býci, a kůzlata, a dále že u drůbeže a králíků jsou parazitární nálezy ojedinělé.

Graf č. 1. Výskyt poškození jater celkem u jednotlivých kategorií porážených zvířat



Tabulka č. 1. Počty porážených zvířat a výskyt poškození jater v členění na akutní, chronické, parazitární a ostatní u jednotlivých kategorií porážených zvířat

	dojnice	jalovice	býci	telata	prasnice	prasata výkrm	selata	ovce	jehňata	kozy	kůzlata
poraženo (počet)	1136754	257912	1015541	104459	586245	25027303	123191	22815	114264	1348	5778
akutní nálezy (%)	5,21	1,35	0,43	5,15	0,87	0,22	13,22	0,10	0,04	0,00	0,00
chronické nálezy (%)	38,66	11,82	7,12	11,73	15,95	7,27	14,90	4,86	1,16	3,30	0,53
parazitární nálezy (%)	0,74	1,50	0,56	0,13	0,61	3,76	1,28	8,09	3,84	0,63	0,22
ostatní nálezy (%)	1,52	0,12	0,01	0,11	0,01	0,00	0,00	0,02	0,00	0,11	0,00

	králíci	brojleři	nosnice	krůty	husy domácí	kachny domácí
poraženo (počet)	1876928	1089036337	19441279	1181598	37690	28386382
akutní nálezy (%)	0,00	0,03	2,94	0,00	0,00	0,68
chronické nálezy (%)	0,05	0,05	20,49	2,73	1,11	1,21
parazitární nálezy (%)	0,00	0,00	0,00	0,01	0,04	0,00
ostatní nálezy (%)	0,00	0,00	0,01	0,61	0,00	0,00

Diskuze

Výskyt všech nálezů na játrech je statisticky významně vyšší ve svém počtu u zvířat dospělých ve srovnání se zvířaty vykrmovanými a mladými, a to u skotu (dojnice 46,13 % x býci 8,12 % i jalovice 14,79 %), prasat (prasnice 17,43 % x prasata ve výkrmu 11,26%), ovci (ovce 13,07 % x jehňata 5,04 %), koz (kozy 4,04 % x kůzlata 0,75 %), slepic (nosnice 23,44 % x brojleři 0,08 %).

Toto zjištění dokládá skutečnost, že vykrmovaná a mladá zvířata jsou organismy s lepší jaterní kondicí než zvířata dospělá, u mladých zvířat je zatížení jater s ohledem na jejich věk kratší a je zde také lepší regenerační schopnost, což se projevuje nižším počtem nálezů na játrech, z pohledu jater jsou tak v lepší kondici zvířata mladá než zvířata dospělá, jejichž játra jsou zatížena dlouhodobě intenzivním metabolismem v důsledku dlouhodobé intenzivní produkce.

Výrazně déle zůstávají v chovech ve srovnání s ostatními kategoriemi hospodářských zvířat především dojnice, ale i krávy bez tržní produkce mléka. Průměrná délka produkčního života dojnic na farmách se pohybuje mezi 4,5–6 lety. V případě krav bez tržní produkce mléka bývá tato doba v průměru až dvakrát delší (Vries and Marcondes, 2020). Zvláště u dojnic má dlouhá doba chovu ve spojení s intenzivní produkcí mléka vliv na zdravotní kondici a také na možný výskyt produkčních onemocnění, které jsou spojeny s charakteristickými nálezy na orgánech včetně jater. Vliv věku na míru konfiskací na jatkách zmiňují i Dupuy et al. (2013) s tím, že nejvyšší míra konfiskací byla zaznamenána u zvířat poražených ve stáří 5-10 let (37,37 %).

Pokud jde o hospodářsky využívané druhy ptáků, je relativně dlouhá doba života (ve srovnání např. s brojlerovými kuřaty či vykrmovanými krůtami) spojená s intenzivní produkcí vajec typická zejména pro nosnice kura domácího. Doba chovu, způsob chovu (v ČR dosud převažuje klecový chov) a využití nosnic se výrazně liší od ostatní poražené drůbeže. Zatímco brojlerová kuřata, husy, kachny a krůty jsou poráženy po několika týdnech až měsících výkrmu (jde tedy obvykle o mladé ptáky v dobré kondici), nosnice jsou odesílány na porážku po přibližně roční intenzivní produkci vajec. Navíc bylo prokázáno, že klecový způsob chovu (ve srovnání s chovem na podestýlce či ve volném výběhu) je u nosnic jedním z environmentálních faktorů, které přispívají k rozvoji syndromu ztučnělých jater (Keutgen et al., 1999). Naše studie potvrdila tyto předpoklady, když v kategorii nosnic (kur domácí) byly zaznamenány léze na játrech u 23,44 % ze všech poražených jedinců, což představuje zdaleka nejvyšší podíl mezi drůbeží a třetí nejvyšší (po dojnících a selatech) hodnotu vůbec.

Pravděpodobnou příčinou neuspokojivého stavu jater je v případě nosnic výživa, která neodpovídá intenzitě jejich produkce. Pokud nosnice nepřijímají dostatek živin vzhledem k úrovni produkce vajec, může u nich docházet k proteolýze jater a svaloviny, lipolýze tukové tkáně a resorpci kostí (Gregory and Robins, 1998).

Efekt věku, způsobu a doby chovu je zvláště patrný v rozdílu mezi množstvím jaterních lézí u nosnic (chronické 20,49 %, akutní 2,94 %) a brojlerových kuřat (chronické 0,04 %, akutní 0,03 %), tedy kategorií v rámci stejného živočišného druhu (kur domácí).

Výskyt všech nálezů na játrech je statisticky významně vyšší ve svém počtu u mláďat vyřazovaných z chovu ve srovnání se zvířaty vykrmovanými, a to u skotu (telata 17,12 % x býci 8,12 % i jalovice 14,79 %) a prasat (selata 29,40 % x prasata ve výkrmu 11,26 %).

Toto zjištění dokládá skutečnost, že mláďata vyřazovaná z chovu pro špatnou kondici a nebo zdraví mají také nižší úroveň zdraví jater než zvířata ponechaná v chovu, tj. zvířata ve výkrmu a nebo zvířata mladá (a to i když jsou starší než vyřazovaná mláďata).

Výskyt všech nálezů na játrech je statisticky významně vyšší ve svém počtu při srovnání jednotlivých druhů, a to v pořadí skot, prasata, ovce a kozy, tzn. pro dospělá zvířata dojnice 46,13 %, prasnice 17,43 %, ovce 13,07 %, kozy 4,04 %. Toto zjištění dokládá skutečnost, že z pohledu jater je nejvyšší zatížení u dojnic, pravděpodobně nejvyšším

rozdílem mezi skutečnou výživou a potřebou metabolismu, což vede k enormnímu zatížení jater, jehož důsledkem jsou chronické či akutní změny jaterní tkáně. Vliv užítkovosti na míru konfiskace na jatkách zmiňují také Vial et al. (2015), kdy u mléčného skotu ve Švýcarsku byla tato podstatně vyšší (79 %) ve srovnání s masným skotem (21 %). Januskeviciene et al. (2010) a Ceccarelli et al. (2018), kteří v rámci svého výzkumu nerozlišovali jednotlivé kategorie skotu, udávají výskyt patoanatomických nálezů (zjištěných při postmortální veterinární prohlídce) na játrech skotu 25,09 %, respektive 7,87 %. Jako nejčastější nález na játrech skotu uvádí Ceccarelli et al. (2018) distomatózu, dále jaterní abscesy a hydatózu (*Echinococcus granulosus*).

U prasnic je s ohledem na charakter výživy založené na směsích s lepší kontrolou živin ve výživě tento dopad na játra podstatně nižší. Přesto jsou prasata druhem hospodářského zvířete, u kterého byl v rámci naší studie zaznamenán relativně vysoký počet nálezů na játrech (selata 29,4 %, prasnice 17,43 %, vykrmovaná prasata 11,26 %). Vysokou míru konfiskací u prasat v důsledku jaterních lézí (9,85 %, 31,79 %, 17,20 %) zmiňují i Ceccarelli et al. (2018), Januskeviciene et al. (2010) a Večerek et al. (2004). Januskeviciene et al. (2010) i Ceccarelli et al. (2018) shodně s naší studií zjistili nejvíce patologických lézí v játrech skotu a prasat, avšak na rozdíl od naší studie zaznamenaly relativně více nálezů u prasat než u skotu.

U ovcí, jejichž výživa se realizuje ve vegetačním období prostřednictvím pastvy, kdy organismus výběrem krmiva sám reguluje přísun živin s ohledem na metabolismu, je tento dopad na játra nižší. U koz je výživa realizována ve stájích a omezeně také pastvou a s ohledem na jejich obecnou citlivost na úroveň výživy a její změny je kozám ve výživě věnována zvláštní pozornost, což se projevuje nízkým počtem nálezů na játrech. Obecně lepší úroveň zdraví ovcí a koz ve srovnání se skotem a prasaty potvrzují ve své studii Januskeviciene et al. (2010) a také Ceccarelli et al. (2018), kteří detekovali patologické léze na játrech u 2,87 % ze všech poražených ovcí a koz, což kvantitativně odpovídá i našim zjištěním. Podle zjištění Ceccarelli et al. (2018) byla u ovcí právě játra orgánem, který byl patologií postižen nejčastěji (játra představovala 77,15 % ze všech konfiskovaných orgánů u ovcí). Chov ovcí je v České republice soustředěn do extenzivních podmínek. Ovce jsou chovány celoročně nebo po většinu roku na pastvinách, což může být spojeno s rizikem výskytu parazitů (Torina et al., 2004). Na rozdíl od ovcí, kozy nejsou charakteristickými pastevními zvířaty a přirozené je pro ně selektivní spásání zejména listů keřů a stromů. Na rozdíl od ovcí se rovněž vyhýbají pokáleným místům (Fox et al., 2013; Yiakoulaki and Papanastasis, 2009). Riziko infekce parazitárními stádii tak může být u koz nižší, což může být i příčinou lepší úrovně zdraví koz ve srovnání s ovcemi (Ninčáková et al., 2022).

Dále je výskyt nálezů na játrech statisticky významně vyšší ve svém počtu při srovnání jednotlivých druhů u vykrmovaných zvířat, a to v pořadí skot, prasata, ovce a kozy, tzn. jalovice 14,79 % a býci 8,12 %, prasata ve výkrmu 11,26 %, jehňata 5,04 %, kůzlata 0,75 %. Stejně pořadí druhů u vykrmovaných a mladých zvířat jako u dospělých zvířat je dokladem obdobné disproporce mezi skutečnou výživou a metabolickými potřebami také u vykrmovaných a mladých zvířat jaká je u zvířat dospělých.

Dále je statisticky významně vyšší ve svém počtu při srovnání jednotlivých druhů u vykrmované drůbeže a králíků, a to v pořadí krůty 3,35 %, kachny 1,89 %, husy 1,15 %, brojleři 0,08 % a králíci 0,05 %. Úroveň nálezů na játrech u drůbeže a králíků je poměrně nízká, pořadí podle nejvyšších počtů nálezů na játrech dokládá známou skutečnost z praxe o vyšší citlivosti u krůt na správný obsah živin ve výživě, nejnižší úroveň nálezů u brojlerů a králíků dokládá skutečnost odpovídajícího složení krmných směsí s ohledem na metabolické potřeby brojlerů anebo králíků v jednotlivých fázích jejich výkrmu.

Na jatky se dostává kategorie vykrmovaných králíků, což znamená, že se jedná o jedince v dobré kondici (Schwartzkopf-Genswein et al., 2012). Ani na polských jatkách nepatří nálezy na játrech mezi frekventované důvody konfiskace jatečných těl či orgánů

králíků, například jaterní kokcidióza byla v rámci postmortální veterinární prohlídky (prováděné v letech 2010 až 2018) detekována u 0,015 % ze všech poražených králíků (Drozd et al., 2019). Přitom ještě v letech 2007 až 2011 byla jaterní kokcidióza prokázána u 3,34 % králíků poražených v Polsku (Szkucik et al., 2014), což naznačuje příznivý klesající trend ve výskytu tohoto parazitárního poškození jater. Rampin et al. (2008), kteří se zabývali patologickými nálezy u králíků poražených na jatkách v Itálii, zjistili, poškození jater u 0,23 % ze všech poražených králíků, přičemž nejčastější příčinou narušení jaterní tkáně byla jaterní kokcidióza, steatóza a nekrotizující hepatitida. Conficoni et al. (2020), kteří se zabývali patologickými nálezy zjištěnými při postmortální veterinární prohlídce králíků na jatkách v Itálii v letech 2003 až 2017, jaterní léze mezi zaznamenanými nálezy na jatkách vůbec neuvádí.

Pokud jde o srovnání druhů vykrmované drůbeže oproti nosnicím byl zjištěn výrazně nižší počet jaterních lézí. Ze zjištěných nálezů vyplývá také vyšší citlivost krůt na správný obsah živin ve výživě ve srovnání s ostatními druhy vykrmované drůbeže. Patoanatomické nálezy na játrech byly detekovány u 3,35 % ze všech poražených krůt, jednalo se téměř výlučně o nálezy chronického charakteru. Obdobně Januskeviciene et al. (2010) zjistili, že ze všech sledovaných druhů vykrmované drůbeže (brojleři, krůty, kachny) vykazovaly krůty nejvíce patoanatomických nálezů, přičemž hned po končetinách (85,79 % z všech poražených krůt) byly nálezy na játrech nejčastější (45,68 % ze všech poražených krůt). Naopak brojleři obecně vykazují nejnižší počet patoanatomických nálezů ze všech sledovaných druhů a kategorií zvířat (Ninčáková et al., 2022; Januskeviciene et al., 2010), což souvisí se skutečností, že se zároveň jedná o kategorii poráženou v nejnižším věku. V souladu s výsledky naší studie ani Jakob et al. (1998) či Salines et al. (2017) nezmiňují nálezy na játrech jako důvody konfiskace jatečných těl brojlerů. Buzdugan et al. (2020) uvedli perihepatitidu jako třetí nejčastější příčinu konfiskace jatečných těl brojlerů v Anglii. Kanadská studie (Amini et al., 2015) reflektuje zvýšenou míru konfiskace jatečných těl brojlerů v důsledku patologických lézí na játrech (nekrotická hepatitis, perihepatitis a hemoragie). Jako primární příčina těchto jaterních lézí byla identifikována imunosuprese způsobená infekční bursitidou (IBDV).

Jen o málo vyšší četnost jaterních lézí než u brojlerových kuřat byla zaznamenána u hus (1,15 %). Pravděpodobným vysvětlením je, že se jedná o poměrně nenáročný a přizpůsobivý druh, který je navíc i za komerčním účelem často chován extenzivním způsobem (výběh s pastvou, přístup k vodě), který zohledňuje přirozené potřeby tohoto druhu (Mazanowski, 2012). Vzácně bývá u hus detekována nekróza jater, jejíž příčinou může být zánět či intoxikace (Benard et al., 1992). Rovněž u kachen bylo detekováno relativně málo nálezů na játrech (1,89 %). Zajímavé však je, že kachny v rámci vykrmované drůbeže vykazují nejvyšší četnost nálezů akutního charakteru (0,68 %), jejichž příčinou může být infekce (např. hepatitida B, reoviry) nebo intoxikace v důsledku pastvy (těžké kovy, aflatoxikóza) (Cova et al., 1994; Li et al., 2016; Tulayakul et al., 2018). Mezi chronická poškození jater lze u kachen zařadit steatózu nebo dokonce rakovinu jater (vyvolanou virem hepatitidy či aflatoxikózou) (Davail et al., 2005; Cova et al., 1994).

Při zhodnocení výskytu nálezů na játrech chronických, akutních a parazitárních je zřejmé, že chronické nálezy jsou statisticky významně vyšší než nálezy akutní a nebo parazitární u všech druhů a kategorií zvířat a akutní nálezy jsou statisticky významně vyšší než nálezy parazitární, a to u dojnic, telat, prasnic, selat, brojlerů, nosnic a kachen domácích, a naopak statisticky významně vyšší jsou parazitární nálezy než nálezy akutní u jalovic, býků ve výkrmu, prasat ve výkrmu, ovcí, jehňat, koz a kůzlat, králíků, krůt a hus domácích.

Pro chronické nálezy při porovnání počtu nálezů u zvířat dospělých ve srovnání se zvířaty vykrmovanými jsou nálezy vyšší u dospělých zvířat, a odpovídají zjištění nálezům celkovým, při porovnání nálezů u mláďat vyřazovaných z chovu ve srovnání se zvířaty

vykrmovanými jsou nálezy vyšší u mláďat, a odpovídají zjištění nálezům celkovým. Při srovnání jednotlivých druhů u dospělých zvířat je pořadí dojnice, prasnice, ovce a kozy, při srovnání jednotlivých druhů u vykrmovaných a mladých zvířat je pořadí jalovice a býci, prasata ve výkrmu, jehňata a kůzlata, a při srovnání jednotlivých druhů u vykrmované drůbeže a králíků je pořadí krůty, kachny, husy, brojleři a králíci. Tato porovnání odpovídají zjištěním pro celkové počty nálezů. Chronické nálezy představují dominantní podíl celkových nálezů na játrech, vysvětlení pro zjištění vyplývající pro chronické nálezy jsou obdobná, jako pro nálezy celkové, přičemž chronické nálezy jsou více přičítány dlouhodobému působení nevyvážené výživy než náhlým změnám ve výživě zvířat. Typickým příkladem chronického onemocnění jater u hospodářských zvířat je steatóza. Játra jsou místem, kde probíhá syntéza tuku, ale za určitých okolností se může nadbytečný tuk ukládat přímo v játrech, což způsobuje zdravotní problémy (Zaefarian et al., 2019). U drůbeže se vyskytuje syndrom ztučnělých jater (severe fatty liver syndrome), na jehož rozvoji se podílí řada faktorů (environmentální, hormonální, genetické), z nichž některé dosud nebyly zcela objasněny. Nejčastěji bývají tímto syndromem postiženy nosnice a krůty (Hansen and Walzem, 1993).

Pro akutní nálezy odpovídají zjištění nálezům celkovým (s výjimkou nálezů u koz a kůzlat a dále krůt, hus a králíků s nálezem 0 nebo 1). Akutní nálezy představují menší podíl nálezů z celkových nálezů, nicméně jejich stejná struktura jako u nálezů celkových dává obdobná vysvětlení pro akutní nálezy jako u nálezů celkových.

Ze všech druhů a kategorií sledovaných hospodářských zvířat bylo nejvíce nálezů akutního charakteru detekováno u selat (13,22 %), s odstupem následovaly krávy (5,21 %) a telata (5,15 %). Pokud jde o poměr počtu akutních nálezů k celkovému počtu nálezů, nejvyšší podíl akutních nálezů byl zjištěn u selat, brojlerů a telat, jedná se tedy o mladá zvířata, u nichž se chronické procesy dosud nestačily plně rozvinout. Akutní nálezy jsou více přičítány změnám ve výživě než dlouhodobému působení výživových vlivů. Kromě dietetických příčin se mohou akutní patologické procesy v jaterní tkáni rozvinout v důsledku infekce či intoxikace. Například u drůbeže jsou zjišťovány akutní léze na játrech v důsledku salmonelózy, kamylobakterií, aviární chřivky či Markovy choroby, z intoxikací bývá zaznamenávána aflatoxikóza (Verwoerd et al., 2000; Wieliczko et al., 2002; Rashid et al., 2013).

Pro parazitární nálezy je zřejmé, že četnost parazitárních nálezů je ovlivněna druhovou vnímavostí na různé druhy parazitů a také stářím zvířat, a tyto faktory vedou k jiné struktuře nálezů, než je tomu u chronických nebo akutních nálezů.

Při porovnání počtu parazitárních nálezů u zvířat dospělých ve srovnání se zvířaty vykrmovanými byl zjištěn statisticky významně vyšší výskyt u jalovic (1,50 %) ve srovnání s dojnicemi (0,74 %) a býky (0,56 %), a také u vykrmovaných prasat (3,76 %) ve srovnání s prasnicemi (0,61 %), naopak u ovcí byl zjištěn významně vyšší počet nálezů u ovcí (8,09 %) ve srovnání s jehňaty (3,84 %) a u koz (0,63 %) ve srovnání s kůzlaty (0,22 %). Tyto nálezy odpovídají systémům výživy různých druhů a kategorií zvířat ve vztahu k možnostem parazitární invaze. U skotu jsou pastevním způsobem krmeny především jalovice, proto je u jalovic vyšší úroveň parazitární invaze ve srovnání s dojnicemi a nebo s býky, jejichž krmení je stájové a založené na směsích, silážích a senážích. U prasat je výživa založena na směsích, nicméně pro nebezpečí invaze škrkavkami je vyšší parazitárně hygienická péče v chovech věnována prasnicím z důvodu jejich ceny a reprodukčního přínosu, než vykrmovaným prasatům, u nichž je parazitární poškození jater (askarióza) zaznamenáváno nejčastěji (3,76 %) ze všech kategorií prasat. Zamoření chovů prasat škrkavkami zmiňují i Ceccarelli et al. (2018), kteří uvádějí parazitární hepatitidu jako příčinu konfiskace u 96,2 % ze všech vyřazených prasečích jater.

U ovcí je zřejmé, že pastevní způsob výživy vede k parazitární invazi, jejíž dopad je vyšší u bahnic, kde s ohledem na jejich stáří je čtenější a delší, než je tomu u jehňat. Ovce (a

jehňata) jsou jediným druhem, u kterého dominovaly jaterní léze parazitárního původu. Toto zjištění potvrzují i Ceccarelli et al. (2018), kteří zjistili parazitární původ dokonce u 96,2 % ze všech jaterních lézí nalezených u ovcí. Torina et al. (2004) upozorňují, že až 80 % patologií u ovcí a koz je spojeno právě s přítomností parazitů.

U koz je způsob chovu ve stájích i pastevní, a proto je četnost parazitárních nálezů nízká a ve srovnání s kůzlaty je vyšší z důvodu možnosti delší doby pro nakažení u dospělých zvířat. Na rozdíl od naší studie zaznamenali Ceccarelli et al. (2018) významné množství patologických nálezů parazitárního původu na játrech (zejména askariózu a distomatózu) prakticky u všech druhů sledovaných hospodářských zvířat.

Při porovnání počtu parazitárních nálezů u mláďat vyřazovaných z chovu ve srovnání se zvířaty vykrmovanými byl zjištěn statisticky významně vyšší výskyt u jalovic (1,50 %) i býků (0,56 %) ve srovnání s telaty (0,13 %), a u prasat ve výkrmu (3,76 %) ve srovnání se selaty (1,28 %). U jalovic a býků je dopad parazitární invaze vyšší než u telat z důvodu jejich vyššího věku než věku telat a tím také delší časové možnosti parazitární invaze než u telat, obdobně je tomu také při porovnání prasat ve výkrmu a selat.

Při porovnání jednotlivých druhů u dospělých zvířat jsou počty nálezů statisticky významně vyšší v pořadí ovce (8,09 %), a po té dojnice (0,74 %) a kozy (0,63 %) a prasnice (0,61 %). Pořadí parazitárních nálezů u dospělých zvířat podle druhů odpovídá způsobu výživy ve spojení s možností parazitární invaze, vysoká je u ovcí, které jsou dlouhodobě paseny ve volné přírodě s vysokou možností parazitárního nakažení, u dojnic a prasnic je stájový chov a u koz je stájový a pastevní chov, s omezenou možností parazitární invaze, proto je ve srovnání s ovcemi úroveň parazitárních nálezů na játrech výrazně nižší.

Dále při porovnání jednotlivých druhů u vykrmovaných zvířat jsou počty nálezů statisticky významně vyšší v pořadí jehňata (3,84 %) a prasata ve výkrmu (3,76 %), ve srovnání s jalovicemi (1,50 %) a býky (0,56 %), a kůzlaty (0,22 %). Pořadí parazitárních nálezů u mladých a vykrmovaných zvířat podle druhů odpovídá způsobu výživy ve spojení s možností parazitární invaze, nejvyšší je u jehňat, které jsou s ovcemi paseny ve volné přírodě s vysokou možností parazitárního nakažení, u jalovic je také převážně pastevní odchov avšak s ohledem na charakter pastvin (nejedná se zpravidla o pastviny ve vlhkých a podmáčených částech luk) s nižší možností parazitární invaze, u prasat ve výkrmu je výskyt parazitární invaze škrkavkami, který je s ohledem na dobu výkrmu a ochranu masa před rezidui antiparazitik řešen jen velmi omezeně, proto je výskyt parazitárních nálezů na játrech u vykrmovaných prasat zaznamenáván, u kůzlat je s ohledem na dobu jejich výkrmu uskutečňován zpravidla spíše stájový než pastevní chov a je zde proto nízká možnost parazitární invaze. Parazitární nálezy u králíků s ohledem na výživu formou granulí jsou velmi nízké a v případě, že se ojediněle vyskytnou jsou spojeny zpravidla s jaterní kokcidiózou u zvířat pocházejících z menších chovů, kde je výživa uskutečňována také trávou a senem. U drůbeže jsou parazitární nálezy ojedinělé.

Závěr

Sledovali jsme poškození jater u skotu, prasat, ovcí, koz, králíků a drůbeže v letech 2010 až 2019 u všech zvířat chovaných porážených na jatkách v České republice. Zjišťovali jsme pro jednotlivé kategorie zvířat celkové počty nálezů na játrech a dále v jejich členění na akutní, chronické, parazitární, ostatní.

Zjistili jsme, že výskyt poškození jater celkem je u všech druhů vyšší u zvířat dospělých ve srovnání se zvířaty vykrmovanými a mladými, je u skotu a prasat vyšší u mláďat vyřazovaných z chovu ve srovnání se zvířaty vykrmovanými a mladými, je při porovnání druhů u dospělých zvířat nejvyšší v pořadí dojnice 46,13%, prasnice 17,43%, ovce 13,07%, kozy 4,04%, je při porovnání druhů u vykrmovaných a mladých zvířat nejvyšší v pořadí jalovice 14,79% a býci 8,12%, prasata ve výkrmu 11,26%, jehňata 5,04%, kůzlata 0,75%, je při porovnání druhů u mláďat vyřazovaných z chovu nejvyšší v pořadí selata 29,40%, telata 17,12%, a dále je pro drůbež a králíky nejvyšší v pořadí krůty 3,35%, kachny 1,89%, husy 1,15%, brojleři 0,08% a králíci 0,05%.

Nálezy chronické a akutní vykazují obdobnou strukturu jako nálezy celkové, nálezy parazitární tuto strukturu (pořadí) nálezů nemají, protože se vyskytují vyšší počty parazitárních nálezů zejména u ovcí, jehňat a prasat ve výkrmu.

Výsledky dokládají zjištění, že vykrmovaná a mladá zvířata mají lepší jaterní kondici než zvířata dospělá, že vyřazovaná mláďata z chovu mají horší jaterní kondici než věkem starší vykrmovaná zvířata, že nejvyšší rozdíl mezi skutečnou výživou a potřebou metabolismu způsobující porušení jater je u skotu, po té u prasat, po té u ovcí a po té u koz, a to jak u dospělých tak také u vykrmovaných a mladých zvířat. U parazitárního zatížení jater výsledky dokládají skutečnost, že způsob výživy ve vztahu k možnostem parazitární invaze se odráží na výskytu parazitárních nálezů na játrech a to nejvíce u zvířat pasených na loukách s parazitární invazí, tj. ovcí (8,09%) a jehňat (3,84%), po té u jalovic (1,5%) a dále u zvířat, kde z hlediska ochrany masa před rezidui antiparazitik je antiparazitární ochrana omezena, tj. u prasat ve výkrmu (3,76%). Zvířata chovaná ve stáji, tj. dojnice, býci, prasnice, ovce, kůzlata jsou zatížena parazitární invazí výrazně méně. U králíků a drůbeže je parazitární poškození jater zjišťováno ojediněle.

Zjištěné výsledky vytváří znalostní podklad pro opatření k zlepšení zdraví a kondice jater u potravinových zvířat.

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

Literatura

- Amini K, Zachar T, Popowich S, Knezacek T, Goodhope B, Willson P, Gomis S 2015: Association of increased rate of condemnation of broiler carcasses due to hepatic abnormalities with immunosuppressive diseases in the broiler chicken industry in Saskatchewan. *Can J Vet Res* 79: 261-267
- Benard, G, Pelletier, JF, Labie, C, Talenton, JY 1992: Liver necrosis in fat geese and ducks - cases and sanitary consequences. *Rev Med Vet-Toulouse* 143: 435-442
- Buzdugan SN, Chang YM, Huntington B, Rushton J, Guitian J, Alarcon P, Blake DP 2020: Identification of production chain risk factors for slaughterhouse condemnation of broiler chickens. *Prev Vet Med* 181: 105036
- Ceccarelli M, Leprini E, Sechi P, Iulietto MF, Grispoldi L, Goretti E, Cenci-Goga, BT 2018: Analysis of the causes of the seizure and destruction of carcasses and organs in a slaughterhouse in central Italy in the 2010-2016 period. *Ital J Food Saf* 7: 6899
- Conficoni D, Cullere M, Lago N, Alberghini L, Rossin T, Dalle Zotte A, Giaccone V 2020: Prevalence of post mortem lesions recorded in a large italian rabbit slaughterhouse over a fifteen-year period (2003-2017). *World Rabbit Sci* 28: 39-47
- Cova L, Mehrotra R, Wild CP, Chutimataewin S, Cao SF, Dufлот A, Prave M, Yu SZ, Montesano R, Trepo C 1994: Duck hepatitis-b virus-infection, aflatoxin b-1 and liver-cancer in domestic chinese ducks. *Brit J Cancer* 69: 104-109
- Davail S, Rideau N, Bernadet MD, Andre JM, Guy G, Hoo-Paris R 2005: Effects of dietary fructose on liver steatosis in overfed mule ducks. *Horm Metab Res* 37: 32-35

Drozd L, Paszkiewicz W, Pyz-Lukasik R 2019: Post-slaughter changes in rabbit carcasses in Poland between 2010 and 2018. *Med Weter* 75: 613-616

Dupuy C, Morignat E, Maugey X, Vinard JL, Hendriks P, Ducrot C, Calavas D, Gay E 2013: Defining syndromes using cattle meat inspection data for syndromic surveillance purposes: a statistical approach with the 2005-2010 data from ten French slaughterhouses. *BMC Vet Res* 9: 1-17

Fox NJ, Marion G, Davidson RS, White PCL, Hutchings MR 2013: Modelling Parasite Transmission in a Grazing System: The Importance of Host Behaviour and Immunity. *PLoS ONE* 8: 1-11

Gregory NG, Robins JK 1998: A body condition scoring system for layer hens. *N Z J Agric Res* 41: 555-559

Hansen RJ, Walzem RL 1993: Avian fatty liver hemorrhagic syndrome: a comparative review. *Adv Vet Sci Comp Med* 37: 451-468

Jakob HP, Morgenstern R, Albicker P, Hoop RK 1998: Condemnation reasons of slaughtered broilers from two major Swiss producing companies. *Schweiz Arch Tierh* 140: 60-64

Januskeviciene G, Paulauskas V, Dailidaviciene J, Juozaitiene V 2010: Analysis of pathologic lesions in the livestock and poultry slaughtered in the meat establishments of Lithuania. *Vet Zootec* 52: 33-42

Kaluža M, Večerek V, Voslářová E, Semerád Z, Passantino A 2020: Assessing the standard of health and welfare in individual categories of cattle from the viewpoint of intravital pathological changes. *Agriculture-Basel* 10: 619

Kaluža M, Večerek V, Voslářová E, Semerád Z, Passantino A 2021: Incidence of characteristic findings during veterinary carcass inspections 2010–2019 in the Czech Republic and the relation to the level of health and welfare of individual classes of cattle. *Animals* 11: 537

Keutgen H, Wurm S, Ueberschar S 1999: Pathologic changes in end-of-lay hens with regards to different housing systems. *Deut Tierarztl Woch* 106: 127-133

Lemos A, Morais L, Fontes MD, Pires I, Vieira-Pinto M 2015: *Campylobacter* spp. isolation from infected poultry livers with and without necrotic lesions. *Food Control* 50: 236-242

Lis H 1999: An evaluation of veterinary inspection of slaughtered animals and meat in Poland between 1987-1997. *Med Weter* 55: 243-246

Lis H 2002: Results of veterinary inspection of slaughtered animals and meat in Poland in 2000. *Med Weter* 58: 267-269

Li N, Hong TQ, Wang Y, Wang YL, Yu KX, Cai YM, Liu SD, Wei LM, Chai TJ 2016: The pathogenicity of novel duck reovirus in Cherry Valley ducks. *Vet Microbiol* 192: 181-185

Lupo C, Le Bouquin S, Allain V, Balaine L, Michel V, Petetin I, Colin P, Chauvin C 2010: Risk and indicators of condemnation of male turkey broilers in western France, February-July 2006. *Prev Vet Med* 94: 240-250

Mazanowski A 2012: Hodowla i chów gęsi. *Apra*, 402 p.

Ninčáková S, Večerek V, Válková L, Voslářová E, Kaluža M, Zavřelová V 2022: Health status of slaughtered animals as indicated by post-mortem inspection at slaughterhouses. *Acta Vet Brno* 91: in press

Rampin F, Piccirillo A, Schiavon E, Poppi L, Grilli G 2008: Detection of pathological lesions in slaughtered rabbits. *Ital J Anim Sci* 7: 105-111

Rashid N, Bajwa MA, Rafeeq M, Tariq MM, Abbas F, Awan MA, Khan MA, Shahzad I, Rehman A, Ahmad Z 2013: Prevalence of Aflatoxicosis in Broiler Chickens in Quetta, Pakistan. *Pak J Zool* 45: 1021-1026

Salines M, Allain V, Roul H, Magras, C, Le Bouquin S 2017: Rates of and reasons for condemnation of poultry carcasses: harmonised methodology at the slaughterhouse. *Vet Rec* 180: 516-516

Schwartzkopf-Genswein KS, Faucitano L, Dadgar S, Shand P, Gonzalez LA, Crowe TG 2012: Road transport of cattle, swine and poultry in North America and its impact on animal welfare, carcass and meat quality: A review. *Meat Sci* 92: 227-243

Szkucik K, Pyz-Lukasik R, Szczepaniak KO, Paszkiewicz W 2014: Occurrence of gastrointestinal parasites in slaughter rabbits. *Parasitology Research* 113: 59-64

Tabaran A, Dan SD, Reget O, Tabaran AF, Mihaiu M 2018: Slaughterhouse survey on the frequency of pathologies found in bovine post-mortem inspections. *Bull UASVM Vet Med* 75: 251-255

Torina A, Dara S, Marino AMF, Sparagano OAE, Vitale F, Reale S, Caracappa, S 2004: Study of gastrointestinal nematodes in Sicilian sheep and goats. *Ann N Y Acad Sci* 1026: 187-194

Tulayakul P, Mingkhwan R, Hananantachai H, Netvichian R, Khaodhiar S, Songserm T 2018: Heavy metal (Cd and Pb) and aflatoxin contamination in tissues and eggs from free grazing ducks and their environment in central Thailand. *Biol Trace Elem Res* 186: 514-520

Válková L, Večerek V, Voslářová E, Zavřelová V, Conte F, Semerád Z 2021: The health and welfare of rabbits as indicated by post-mortem findings at the slaughterhouse. *Animals* 11: 659

Večerek V, Kozák A, Malena M, Chloupek P, Pištěková V 2004: Organs of slaughter pigs as a source of potential risk for human health in the Czech Republic during the years 1995–2002. *Vet Med – Czech* 49: 75-78

Večerek V, Voslářová E, Semerád Z 2020a: Patho-anatomic findings in finisher pigs, sows and piglets detected during veterinary slaughterhouse inspection. *Acta Vet Brno* 89: 341-347

Večerek V, Voslářová E, Semerád Z, Passantino A 2020b: The health and welfare of pigs from the perspective of post mortem findings in slaughterhouses. *Animals* 10: 825

Verwoerd DJ 2000: Ostrich Diseases. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 19: 638-661

Vial F, Schärer S, Reist M 2015: Risk Factors for Whole Carcass Condemnations in the Swiss Slaughter Cattle Population. *PLoS One* 10: 1-17

Vries AD, Marcondes MI 2020: Review: Overview of factors affecting productive lifespan of dairy cows. *Anim* 14: 155-164

Wieliczko A, Dzimira S, Mazurkiewicz M 2002: Marek's disease in flocks of layers and broilers. *Med Weter* 58: 144-147

Yiakoulaki M, Papanastasis V 2009: Foraging behaviour of sheep and goats grazing on silvopastoral systems in Northern Greece. *Options Méditerran* 85: 79-84

Zaefarian FA, Abdollahi MR, Cowieson A, Ravindran V 2019: Avian Liver: The Forgotten Organ. *Animals* 9: 63

Zhao Y, Mao JJ, She RP, Hu FJ, Soomro MH, Liang RP, Yang YF, Du F, Wang TT, Guo ZJ, Cheng MH 2016: Hepatitis associated with hepatitis B virus in broilers. *J Integr Agr* 15: 191-199

Porovnání výskytu poškození ledvin u skotu, prasat, ovcí a koz zjišťovaných na jatkách jako ukazatele zdraví zvířat

Lenka Válková, Eva Voslářová, Vladimír Večerek

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

Abstrakt

Zabývali jsme se výskytem poškození ledvin u skotu, prasat, ovcí a koz u zvířat chovaných a porážených na jatkách v České republice v období 10 let, a to 2010 až 2019. Porovnávali jsme celkové počty nálezů poškození ledvin mezi jednotlivými kategoriemi porážených zvířat. Následně jsme porovnávali úroveň chronických, akutních a parazitárních nálezů navzájem u jednotlivých sledovaných kategorií zvířat. Naše výsledky ukázaly, že výskyt poškození ledvin je u skotu, prasat, ovcí i koz statisticky významně nižší u mladých vykrmovaných zvířat (býci ve výkrmu, prasata ve výkrmu, jehňata a kůzlata), než u dospělých zvířat (dojnice, prasnice, ovce, kozy). Dále jsme zjistili, že výskyt poškození ledvin je u skotu a prasat statisticky významně nižší u mladých vykrmovaných zvířat (býci ve výkrmu, prasata ve výkrmu), než u mláďat vyřazovaných z chovu pro nízkou kondici a nebo zdraví (telata, selata). Zjistili jsme při porovnání jednotlivých kategorií dospělých zvířat, že je statisticky nejnižší výskyt poškození ledvin u koz a ovcí (3,04 % a 3,09 %) (mezi ovcemi a kozami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl $P = 0,93$), následně u prasníc (28,92 %), a nejvyšší byl u dojnic (40,81 %). Při porovnání jednotlivých kategorií vykrmovaných zvířat navzájem jsme zjistili, že výskyt nálezů na ledvinách je statisticky významně nejnižší v pořadí kůzlata (0,26 %), jehňata (0,44 %), vykrmovaní býci (10,88 %) a prasata ve výkrmu (13,94 %). Porovnáním výskytu chronických, akutních a parazitárních poškození ledvin vždy u jednotlivých sledovaných kategorií zvířat jsme zjistili, že se statistickou významností nejvyšší výskyt je u chronických poškození, po té u akutních poškození a nejnižší u parazitárních poškození (s výjimkou statistického porovnání četnosti výskytu akutních a parazitárních nálezů při porovnání koz a kůzlat, kde nebyl zjištěn žádný nález, a s výjimkou ovcí ($P = 0,703$) a jehňat ($P = 0,096$), kde byly zjišťovány jen ojedinělé nálezy). Výsledky ukazují, že z pohledu výskytu ledvinových poškození jako převážný důsledek dysbalance mezi metabolickými potřebami organismu a poskytovanou výživou zvířatům, existují nedostatky významné úrovně, které dokládají stále výrazný prostor pro další optimalizaci výživy jednotlivých kategorií zvířat, zohledňující nejen užitkovost, celkové klinické zdraví, ale také subklinické zdraví zvířat, která povede k snížení výskytu poškození ledvin zjišťovaných při porážení zvířat na jatkách.

Úvod

Ledviny jsou metabolickým orgánem v organismu zvířat, který se podílí svojí vylučovací funkcí na metabolické rovnováze organismu (Skotnicka et al., 2007). Zhoršená funkce ledvin a nebo morfologicky zjištěné poškození ledvin zpravidla souvisejí se zhoršenou funkcí ledvin narušuje celkové subklinické a nebo dokonce klinické zdraví zvířat a tím také úroveň pohody zvířat. Nález poškození ledvin tak dokládá porušení metabolismu zvířete nebo parazitární invazi již v té míře, že se projevuje morfologickým nálezem při prohlídce zvířat po porážení na jatkách. Charakter porušení ledvin v rozlišení nálezu chronického, akutního nebo parazitárního poškození pak umožňuje určit bližší povahu původu poškození ledvin.

Výskyt patoanatomických nálezů na ledvinách porážených zvířat je zmiňován v některých studiích, které se zabývají příčinami konfiskace jatečných těl hospodářských

zvířat či komplexně patoanatomickými nálezy zjištěnými v rámci postmortální veterinární prohlídky na jatkách. Většina těchto studií se však zaměřila jen na konkrétní druh hospodářského zvířete, zejména na skot (Tabaran et al., 2018; Kaluža et al., 2020, 2021) a prasata (Lis, 1999, 2002; Večerek et al., 2004, 2020a,b). Jen málo studií srovnává výskyt patoanatomických nálezů u více druhů či kategorií hospodářských zvířat za stejných podmínek a ve stejném období. Januskeviciene et al. (2010) srovnávali výskyt patologických nálezů u skotu, prasat, ovcí, koz, koní, králíků, zvěře a drůbeže v Litvě v letech 2007–2009. Ceccarelli et al. (2018) analyzovali příčiny konfiskace jatečných těl a orgánů u skotu, prasat, ovcí a koní na vybraných jatkách v Itálii v letech 2010–2016. Lis (2005) sledoval výskyt patologických nálezů u skotu, prasat, ovcí a koní na jatkách v Polsku v roce 2003. Machold et al. (2007) srovnávali výskyt patologických lézí u prasat a skotu chovaných v konvenčních a ekologických chovech v Německu v období jednoho roku. Studie, které by se podrobněji zaměřovaly na výskyt poškození ledvin, mezidruhové srovnání a analýzu možných příčin a souvislostí, byly publikovány spíše mimo Evropu. Elgumaa et al. (2017) srovnávali patologické léze na ledvinách u různých druhů přežvýkavců zjištěné na jatkách v Egyptě. Výskyt a charakter nálezů na ledvinách byl popsán také u porážených velbloudů v Iránu (Rezaie et al., 2014), u skotu v Peru (Macias et al., 2020) nebo u prasat v Brazílii (Carrizo et al., 2011). V evropských podmínkách však takové studie téměř chybí, přestože Jansen and Nordstoga (1992) zjistili výskyt patologických lézí u 59 % z 668 prasat porážených v Norsku a vyšetřených v jejich studii. Na výskyt poškození ledvin u jatečných prasat upozorňují také Spiekermeier et al. (2017) a Scheinert et al. (2016).

Cílem práce bylo zjistit úroveň poškození ledvin u jednotlivých kategorií skotu, prasat, ovcí a koz porážených na jatkách, zjistit, zdali a případně na jaké úrovni se liší poškození ledvin vykrmovaných zvířat od starších dospělých zvířat, zdali a případně na jaké úrovni se liší poškození ledvin u vykrmovaných zvířat od mláďat vyřazovaných z chovu pro neodpovídající kondici a nebo zdraví, dále jak se liší úroveň zdraví ledvin mezi jednotlivými kategoriemi dospělých zvířat a jak se liší úroveň zdraví ledvin mezi jednotlivými kategoriemi vykrmovaných zvířat. Záměrem tohoto porovnání bylo zjistit na základě rozdílů v úrovni poškození ledvin pro různé kategorie zvířat, u kterých kategorií se vyskytuje poškození ledvin nejčastěji a u kterých nejméně a dovodit možná opatření k snížení výskytu poškození ledvin u jatečných zvířat. Dále cílem práce bylo u jednotlivých sledovaných kategorií zvířat porovnat výskyt chronických, akutních a parazitárních poškození ledvin a ze zjištěných rozdílů dovodit dominantní charakter poruchy vedoucí k narušení ledvin zjišťovaných při prohlídce porážených zvířat na jatkách s cílem směřování případných opatření ke zvýšení úrovně zdraví ledvin v chovech jednotlivých kategorií jatečných zvířat.

Materiál a metodika

Porovnávali jsme úroveň zdraví ledvin mezi jednotlivými kategoriemi skotu, prasat, ovcí a koz. Úroveň zdraví ledvin jsme zjišťovali na základě výskytu poškození ledvin, zjišťovaných při veterinární prohlídce zvířat porážených na jatkách.

Výskyt poškození ledvin jsme sledovali u skotu pro kategorie dojnice, jalovice, býci ve výkrmu a telata vyřazovaná z chovu, dále u prasat pro kategorie prasnice, prasata ve výkrmu, a selata vyřazovaná z chovu, dále u ovcí pro kategorie bahnice a jehňata, dále u koz pro kategorie kozy a kůzlata.

Období zahrnuté do sledování představovalo 10 let, a to roky 2010 až 2019. V tomto období jsme vyhodnocovali výskyt poškození ledvin u zvířat sledovaných kategorií chovaných a porážených na jatkách v České republice. Rozsah sledování byl vymezen všemi poráženými zvířaty, tj. počtem 1 136 754 porážených dojnic, 257 912 porážených jalovic, 1 015 541 porážených býků ve výkrmu, 104 459 porážených telat vyřazených z chovu pro kondiční a nebo zdravotní důvody, 586 245 porážených prasníc, 25 027 303 porážených

prasat ve výkrmu, 123 191 poražených selat vyřazených z chovu pro kondiční a nebo zdravotní důvody, 22 815 poražených ovcí, 114 264 poražených jehňat, 1 348 poražených koz, 5 778 poražených kůzlat.

Prohlídku ledvin porážených zvířat prováděli úřední veterinární lékaři na jatkách, přičemž zaznamenávali počty zdravých ledvin a počty poškozených ledvin s členěním na poruchy chronické, akutní a parazitární.

Zjištěné počty za celé sledované období pro každou kategorii zvířat jsme přepočítali na relativní počty jako podíl výskytu poškození ledvin k počtu poražených zvířat příslušné kategorie zvířat přepočtený na procenta.

Porovnávali jsme výskyt poškození ledvin mezi jednotlivými kategoriemi porážených zvířat, a to z pohledu srovnání zvířat ve výkrmu a dospělých zvířat, dále z pohledu srovnání zvířat ve výkrmu a mláďat vyřazovaných z chovu pro neodpovídající kondici a nebo zdraví, z pohledu porovnání kategorií dospělých zvířat navzájem a dále z pohledu porovnání kategorií zvířat ve výkrmu navzájem. Dále jsme porovnávali uvnitř příslušné kategorie zvířat výskyt chronického, akutního a parazitárního poškození ledvin.

K statistickému porovnání zjištěných počtů nálezů byl využit Chí kvadrát test.

Ze zjištěných výsledků jsme usuzovali na rozdíly v úrovni ledvinného zdraví mezi vykrmovanými zvířaty a dospělými, mezi vykrmovanými zvířaty a vyřazovanými mláďaty, mezi jednotlivými kategoriemi dospělých zvířat, mezi jednotlivými kategoriemi vykrmovaných zvířat a dále mezi výskytem chronických, akutních a parazitárních poškození ledvin. Záměrem tohoto porovnání bylo zjistit rozdíly v úrovni poškození ledvin pro různé kategorie zvířat a určit u kterých kategorií se vyskytují poškození ledvin nejčastěji a u kterých nejméně často a dovést důvody těchto rozdílů vedoucí k vymezení opatření zaměřených k snížení výskytu poškození ledvin u jatečných zvířat a ke zvýšení úrovně zdraví ledvin v chovech jednotlivých kategorií jatečných zvířat.

Výsledky

Výskyt poškození ledvin u skotu, prasat, ovcí a koz porážených na jatkách je uveden v grafu 1. Bylo zjištěno, že u zvířat vykrmovaných ve srovnání se zvířaty dospělými je statisticky významně nižší ve svém počtu, a to u skotu (býci 10,87 % i jalovice 16,24 % x dojnice 40,76 %), i u prasat (prasata ve výkrmu 13,94 % x prasnice 28,91 %), i u ovcí (jehňata 0,44 % x ovce 3,09 %), a i u koz (kůzlata 0,26 % x kozy 3,04 %).

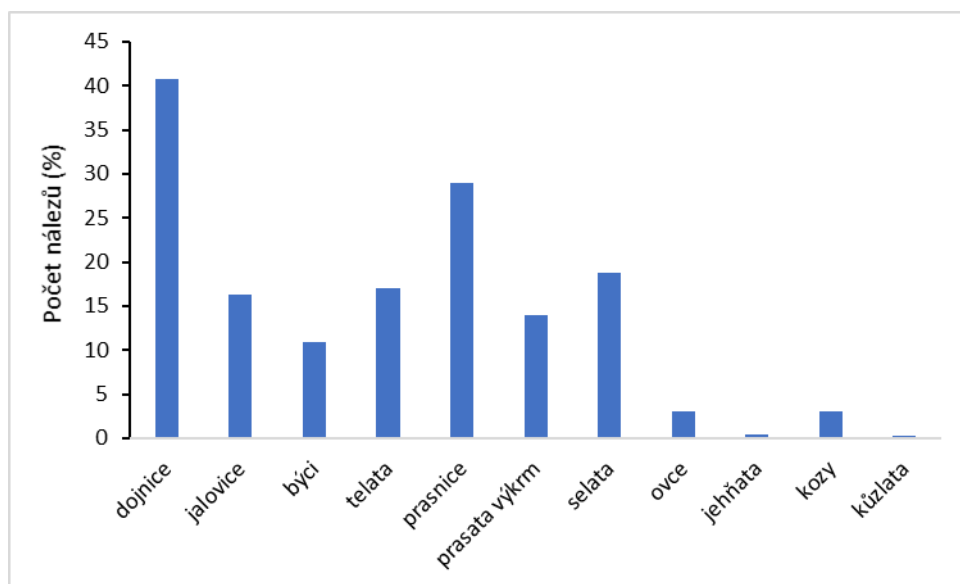
Při srovnání vykrmovaných zvířat s mláďaty vyřazovanými z chovu bylo zjištěno, že výskyt nálezů na ledvinách je statisticky významně nižší u zvířat vykrmovaných než u mláďat vyřazovaných z chovu, a to u skotu (býci 10,87 % i jalovice 16,24 % x telata 17,01 %) a u prasat (prasata ve výkrmu 13,94 % x selata 18,70 %).

Porovnáním jednotlivých druhů v kategorii dospělých zvířat navzájem jsme zjistili, že výskyt nálezů na ledvinách je statisticky významně nejnižší v pořadí ovce a kozy, prasata, skot, a to u dospělých zvířat v pořadí kozy a ovce (3,04 % a 3,09 %) (mezi ovce a kozami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl), prasnice (28,92 %), dojnice (40,81 %).

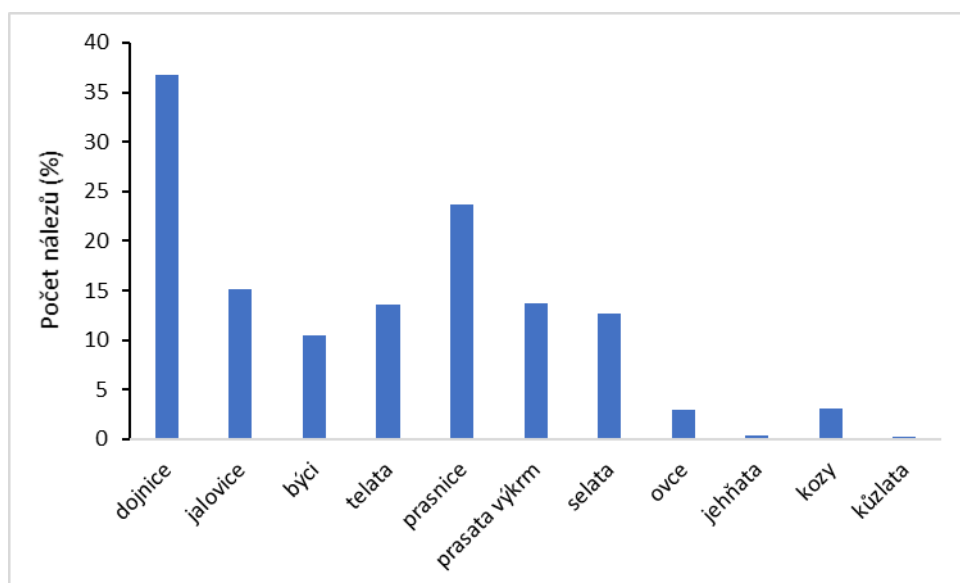
Porovnáním jednotlivých druhů v kategorii vykrmovaných zvířat navzájem jsme zjistili, že výskyt nálezů na ledvinách je statisticky významně nejnižší v pořadí kůzlata (0,26 %), jehňata (0,44 %), býci (10,88 %) a prasata ve výkrmu (13,94 %).

V grafu 2 je uveden výskyt chronického poškození ledvin, v grafu 3 je uveden výskyt akutního poškození ledvin a v grafu 4 je uveden výskyt parazitárního poškození ledvin u jednotlivých kategorií skotu, prasat, ovcí a koz porážených na jatkách.

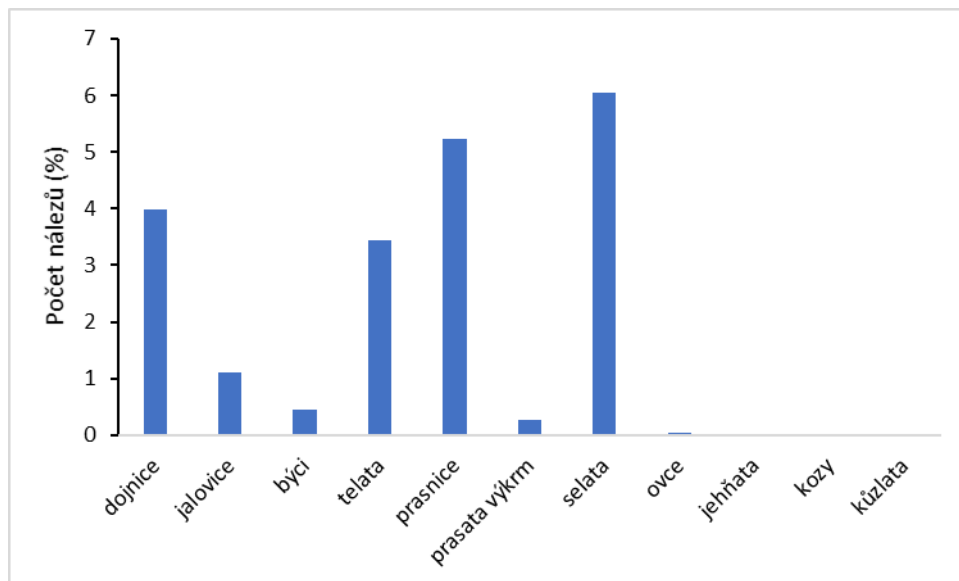
Graf 1. Výskyt poškození ledvin celkem u jednotlivých kategorií skotu, prasat, ovcí a koz porážených na jatkách



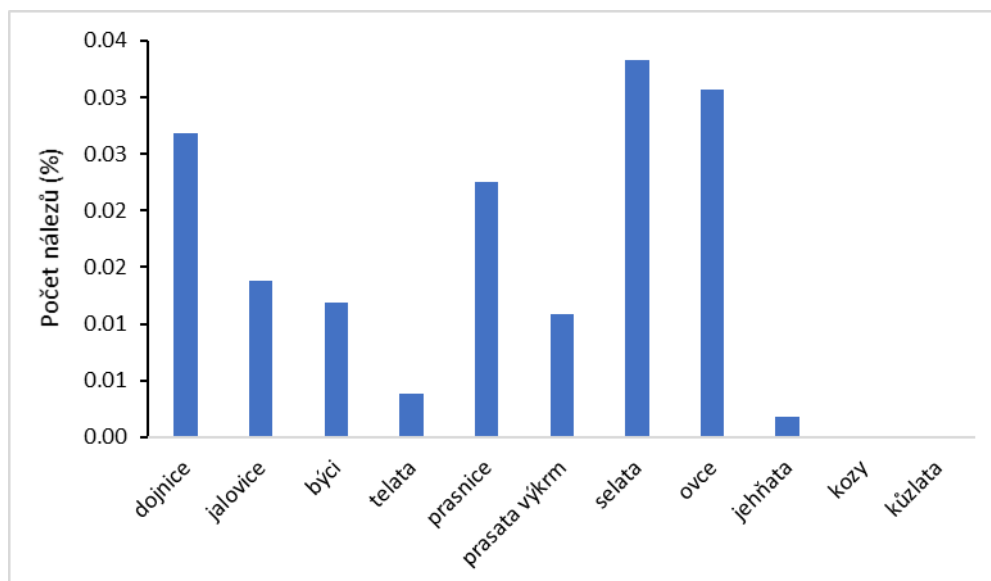
Graf 2. Výskyt chronického poškození ledvin u jednotlivých kategorií skotu, prasat, ovcí a koz porážených na jatkách



Graf 3. Výskyt akutního poškození ledvin u jednotlivých kategorií skotu, prasat, ovcí a koz porážených na jatkách



Graf 4. Výskyt parazitárního poškození ledvin u jednotlivých kategorií skotu, prasat, ovcí a koz porážených na jatkách



Porovnáním úrovní uvedených v grafech 2 až 4 výskytu nálezů chronického, akutního a parazitárního poškození ledvin u skotu, prasat, ovcí a koz zjišťovaných na jatkách je zřejmé, že úroveň nálezů u všech druhů a kategorií porážených zvířat je nejvyšší pro chronická poškození, po té pro akutní poškození a nejnižší pro parazitární poškození, při čemž statistické porovnání četnosti výskytu chronických a akutních nálezů vykazovalo statisticky významný rozdíl u všech kategorií, statistické porovnání četnosti výskytu chronických a parazitárních nálezů vykazovalo statisticky významný rozdíl u všech kategorií, statistické porovnání četnosti výskytu akutních a parazitárních nálezů vykazovalo statisticky významný rozdíl u všech kategorií s výjimkou koz a kůzlat, kde nebyl zjištěn žádný nález, a s výjimkou ovcí ($P = 0,703$) a jehňat ($P = 0,096$), kde byly zjišťovány jen ojedinělé nálezy.

Diskuze

Bylo zjištěno, že u zvířat vykrmovaných ve srovnání se zvířaty dospělými je statisticky významně nižší výskyt nálezů na ledvinách. Toto zjištění dokumentuje skutečnost, že zvířata vykrmovaná mladá mají lepší ledvinnou kondici než dospělá zvířata, protože vyšší věk a tím doba působení k narušení ledvin je u dospělých zvířat delší než u vykrmovaných mladých zvířat.

Při srovnání vykrmovaných zvířat s mláďaty vyřazovanými z chovu bylo zjištěno, že výskyt nálezů na ledvinách je statisticky významně nižší u zvířat vykrmovaných než u mláďat vyřazovaných z chovu, a to u skotu a u prasat. Z našeho zjištění je zřejmé, že vykrmovaná zvířata ponechaná v chovu na výkrm mají lepší ledvinnou kondici než mláďata vyřazovaná z chovu, z chovu vyřazovaná mláďata pro špatný výživný stav a nebo zdraví mají nižší úroveň zdraví ledvin než zvířata ponechaná v chovu.

Porovnáním jednotlivých druhů v kategorii dospělých zvířat navzájem jsme zjistili, že výskyt nálezů na ledvinách je statisticky významně nejnižší v pořadí ovce a kozy, prasata, skot, a to u dospělých zvířat v pořadí kozy a ovce (3,04 % a 3,09 %) (mezi ovce a kozami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl), prasnice (28,92 %), dojnice (40,81 %). Tyto výsledky dokládají, že nejnižší metabolické zatížení vedoucí k narušení ledvin (chronickému i akutnímu) je u koz a ovcí, kde je realizováno ve významné části přirozenou pastvou, kdy zvířata výběrem výživy pozitivně regulují metabolismus a v tomto důsledku pak je dopad na zatížení a následné poškození ledvin velmi malé. U prasnic je výživa realizována převážně krmnými směsmi a ve srovnání s dojnicemi je tato výživa z pohledu metabolismu prasnic méně zatěžující ledviny než u dojnic. Výživa dojnic, založená na silážích, senážích, a krmných směsích je z pohledu potřeb metabolismu nedostatečně vyvážená a tím dochází k výraznému zatěžování metabolismu dojnic s dopadem na ledviny a jejich následnému poškození, což se projevuje výskytem přes 40 % poškozených ledvin u dojnic a ve srovnání s ostatními druhy je enormní.

Porovnáním jednotlivých druhů v kategorii vykrmovaných zvířat navzájem jsme zjistili, že výskyt nálezů na ledvinách je statisticky významně nejnižší v pořadí kůzlata (0,26 %), jehňata (0,44 %), býci (10,88 %) a prasata ve výkrmu (13,94 %). Nejnižší metabolické zatížení vedoucí k narušení ledvin (chronickému i akutnímu) je u kůzlat a jehňat, kde je výživa realizována přirozenou pastvou a zvířata tak výběrem výživy mohou pozitivně regulovat metabolismus a dopad na poškození ledvin je velmi malý. U prasnic je výživa realizována převážně krmnými směsmi a ve srovnání s dojnicemi je tato výživa z pohledu metabolismu prasnic méně zatěžující ledviny než u dojnic. U býků je z hlediska potřeb metabolismu výživa částečně nedostatečně vyvážená a tím dochází k zatěžování jejich metabolismu a následnému poškození ledvin, intenzita zatížení je však nižší než u vykrmovaných prasat. Růst vykrmovaných prasat je podstatně intenzivnější než vykrmovaných býků, a proto nároky na výživu odpovídající tomuto intenzivnímu metabolismu jsou výrazně vyšší, krmné směsi ve výkrmu prasat však tuto potřebu nekryjí zcela dostatečně a tyto dysbalance se projevují dopadem na zatížení a následné poškození ledvin, jejichž výskyt je tak vyšší než u vykrmovaných býků.

Z výsledků je zřejmé, že metabolické zatížení ledvin při dysbalanci metabolických potřeb organismu a výživy zvířat je převážně nižšího stupně působící delší časové období mající dopad na chronická poškození ledvin. Výskyt akutních poškození ledvin souvisejících s náhlou výraznou změnou výživy zvířat s dopadem na výrazné zatížení metabolismu a tím také ledvin zvířat je v chovech sledovaných kategorií zvířat statisticky významně méně časté. Parazitární poškození ledvin se vyskytuje ve srovnání s chronickými a akutními nálezy statisticky významně málo a je víceméně velmi řídké, což souvisí se skutečností, že ledviny nejsou cílový orgán v případně invaze endoparazitů skotu, prasat, ovcí i koz.

Závěr

Zabývali jsme se výskytem poškození ledvin u skotu, prasat, ovcí a koz u zvířat chovaných a porážených na jatkách v České republice v období 10 let, a to 2010 až 2019. Porovnávali jsme celkové počty nálezů poškození ledvin mezi jednotlivými kategoriemi porážených zvířat. Následně jsme porovnávali úroveň chronických, akutních a parazitárních nálezů navzájem u jednotlivých sledovaných kategorií zvířat.

Naše výsledky ukázaly, že výskyt poškození ledvin je u skotu, prasat, ovcí i koz statisticky významně nižší u mladých vykrmovaných zvířat (býci ve výkrmu, prasata ve výkrmu, jehňata a kůzlata), než u dospělých zvířat (dojnice, prasnice, ovce, kozy).

Dále jsme zjistili, že výskyt poškození ledvin je u skotu a prasat statisticky významně nižší u mladých vykrmovaných zvířat (býci ve výkrmu, prasata ve výkrmu), než u mláďat vyřazovaných z chovu pro nízkou kondici a nebo zdraví (telata, selata).

Zjistili jsme při porovnání jednotlivých kategorií dospělých zvířat, že je statisticky nejnižší výskyt poškození ledvin u koz a ovcí (3,04 % a 3,09 %) (mezi ovcemi a kozami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl), následně u prasnic (28,92 %), a nejvyšší byl u dojníc (40,81 %).

Při porovnání jednotlivých kategorií vykrmovaných zvířat navzájem jsme zjistili, že výskyt nálezů na ledvinách je statisticky významně nejnižší v pořadí kůzlata (0,26 %), jehňata (0,44 %), vykrmování býci (10,88 %) a prasata ve výkrmu (13,94 %).

Porovnáním výskytu chronických, akutních a parazitárních poškození ledvin vždy u jednotlivých sledovaných kategorií zvířat jsme zjistili, že se statistickou významností nejvyšší výskyt je u chronických poškození, po té u akutních poškození a nejnižší u parazitárních poškození (s výjimkou statistického porovnání četnosti výskytu akutních a parazitárních nálezů při porovnání koz a kůzlat, kde nebyl zjištěn žádný nález, a s výjimkou ovcí a jehňat, kde byly zjištěny jen ojedinělé nálezy).

Výsledky ukazují, že z pohledu výskytu ledvinných poškození jako převážný důsledek dysbalance mezi metabolickými potřebami organismu a poskytovanou výživou zvířatům, existují nedostatky významné úrovně, které dokládají stále výrazný prostor pro další optimalizaci výživy jednotlivých kategorií zvířat, zohledňující nejen užitkovost, celkové klinické zdraví, ale také subklinické zdraví zvířat, která povede k snížení výskytu poškození ledvin zjišťovaných při porážení zvířat na jatkách.

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

Literatura

- Carrijo KD, do Nascimento ER, Tortelly R 2011: Porcine enzootic pneumonia: Relationship between microscopic lung and kidney lesions in Santa Catarina, Brazil. *Biosci J* 27: 439-443
- Ceccarelli M, Leprini E, Sechi P, Iulietto MF, Grispoli L, Goretti E, Cenci-Goga, BT 2018: Analysis of the causes of the seizure and destruction of carcasses and organs in a slaughterhouse in central Italy in the 2010-2016 period. *Ital J Food Saf* 7: 6899
- Elgumaa MM, Mohammed FF, Elmady MM, Bakeer AM, Gad MH 2017: Pathological characterization of renal lesions developed in some ruminant species in Egyptian slaughter house. *Res J Pharm Biol Chem Sci* 8: 1867-1878
- Jansen JH, Nordstoga K 1992: Renal lesions in Norwegian slaughter pigs - macroscopic and light microscopic studies. *J Vet Med A* 39: 582-592
- Januskeviciene G, Paulauskas V, Dailidaviciene J, Juozaitiene V 2010: Analysis of pathologic lesions in the livestock and poultry slaughtered in the meat establishments of Lithuania. *Vet Zootec* 52: 33-42

- Kaluža M, Večerek V, Voslářová E, Semerád Z, Passantino A 2020: Assessing the standard of health and welfare in individual categories of cattle from the viewpoint of intravital pathological changes. *Agriculture-Basel* 10: 619
- Kaluža M, Večerek V, Voslářová E, Semerád Z, Passantino A 2021: Incidence of characteristic findings during veterinary carcass inspections 2010–2019 in the Czech Republic and the relation to the level of health and welfare of individual classes of cattle. *Animals* 11: 537
- Lis H 1999: An evaluation of veterinary inspection of slaughtered animals and meat in Poland between 1987-1997. *Med Weter* 55: 243-246
- Lis H 2002: Results of veterinary inspection of slaughtered animals and meat in Poland in 2000. *Med Weter* 58: 267-269
- Lis H 2005: Results of veterinary inspection of slaughter animals and meat in Poland in 2003. *Med Weter* 61: 1160-1161
- Macias DIB, Goicochea CAB, Ruano MP, Ruales APR, Flores MAF, Loor LV, Rodriguez RAJ, Rodriguez OF 2020: Association between the presence of antibodies against *Leptospira* and kidney lesions in cattle. *Rev Invest Vet Peru* 31: 19028
- Machold U, Troeger K, Moje M 2007: Organic versus conventional livestock production systems. *Fleischwirtschaft* 87: 89-93
- Rezaie A, Mohamadian B, Anbari S, Hossein Zadeh K 2014: Histopathological investigations on renal lesions in slaughtered camel (*Camelus dromedarius*) in North East of Iran. *Kafkas Univ Vet Fak* 20: 501-506
- Scheinert J, Muller K, Meiler H, Schoon HA 2016: The pig kidney in the 21st century - which diagnoses could be made in the abattoir and how should they be interpreted? *J Food Saf Food Qual* 67: 64-71
- Skotnicka E, Muszczyński Z, Dudzińska W, Suska M 2007: A review of the renal system and diurnal variations of renal activity in livestock. *Irish Vet J* 60: 161-168
- Spiekermeier I, Freitag M, Baumgartner W 2017: Interstitial nephritis in pigs. *Tieraerztl Prax G N* 45: 350-356
- Tabaran A, Dan SD, Reget O, Tabaran AF, Mihaiu M 2018: Slaughterhouse survey on the frequency of pathologies found in bovine post-mortem inspections. *Bull UASVM Vet Med* 75: 251-255
- Večerek V, Kozák A, Malena M, Chloupek P, Pištěková V 2004: Organs of slaughter pigs as a source of potential risk for human health in the Czech Republic during the years 1995–2002. *Vet Med – Czech* 49: 75-78
- Večerek V, Voslářová E, Semerád Z 2020a: Patho-anatomic findings in finisher pigs, sows and piglets detected during veterinary slaughterhouse inspection. *Acta Vet Brno* 89: 341-347
- Večerek V, Voslářová E, Semerád Z, Passantino A 2020b: The health and welfare of pigs from the perspective of post mortem findings in slaughterhouses. *Animals* 10: 825

Využití infračervené termografie při hodnocení akutního stresu u králíka domácího

Gabriela Lukešová, Martina Volfová, Monika Šebánková, Eva Voslášková,
Vladimír Večerek

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

Abstrakt

Infračervená termografie je poměrně novou, ale nadějnou metodou v hodnocení stresu a zdravotních poruch u zvířat. Výhoda této metody spočívá především v distančním získávání dat bez nutnosti manipulace se zvířetem, která by mohla ovlivnit výsledek pokusu. Pro snímání králíka je ideálním místem vnitřní koutek oka, neboť zde není žádný pokryv srsti a je snadno dostupným místem pro získávání snímků. Pomocí termokamery byla změřena povrchová teplota vnitřního koutku oka 12 králíků vystavených stresovému faktoru, kterým byla manipulace a tetování uší. Bazální hodnota povrchové teploty naměřená v kotci před jakoukoli manipulací byla průměrně 36,75 °C ($\pm 0,29$ °C). Při následné fixaci a tetování došlo k výraznému nárůstu povrchové teploty v oblasti koutku oka ($p < 0,01$), přičemž svého maxima dosáhla během samotného tetování (průměrně 38,62 °C, $\pm 0,15$ °C). Rozdíl v naměřených teplotách nebyl významný pouze při porovnání teplot při fixaci před a po tetování ($p < 0,01$). Ani po 15-20 minutách nedosahovala hodnota povrchové teploty naměřené opět v kotci (průměr 37,78 °C, $\pm 0,16$ °C) bazální teploty naměřené před pokusem. Při znalosti techniky měření termokamerou a respektování vnějších faktorů, které mohou měření ovlivňovat, lze tuto metodu velmi snadno využít i k dalším studiím týkajícím se welfare králíků nebo k hodnocení jejich zdravotního stavu souvisejícím se změnám teploty na povrchu těla.

Úvod

Králíci jsou druhem hojně využívaným v intenzivních chovech pro získávání králíčího masa nebo jako laboratorní zvířata. Jejich život je v těchto chovech spjat s mnoha stresovými vlivy, které souvisí s podmínkami ustájení, jakou je například teplota (Dalmau et al., 2015), a také s přepravou (Mazzone et al., 2010). I přes snahy o zlepšení životních podmínek jsou stále některé aspekty intenzivního chovu pro králíky nevyhovující (Trocino and Xiccato, 2010). Rovněž laboratorní podmínky mají prokazatelně negativní vliv na welfare králíků a jsou spojovány s výskytem poruch chování v důsledku nevhodného sociálního uspořádání (Chu et al., 2004) nebo omezeného prostoru (Gunn and Morton, 1995). Vzhledem k snaze zajistit přijatelnou úroveň welfare zvířat v hospodářských nebo laboratorních chovech se výzkumy zaměřují na faktory, které tato zvířata ovlivňují, a na možnosti, jak vliv těchto faktorů na zvířata monitorovat.

Jednou z možností, jak získávat data o úrovni životní pohody zvířat, je detekce stresu. Možností, jak stanovit hladinu stresu u králíků, je více. Využívá se například laboratorní stanovení hladin glukokortikoidů, konkrétně kortikosteronu, který je u králíka dominantním hormonem, v krvi (Hudson et al., 2011), trusu (Prola et al., 2013) nebo ve slinách (Munari et al., 2020). Další možností je využití termokamery, která je schopná převádět infračervené záření vyzařující z těla králíka a převádět toto záření na výsledné hodnoty povrchové teploty. Je prokázáno, že akutní stres způsobuje změny na povrchu těla zvířat (Almeida et al., 2018; Bartolomé et al., 2019; Herborn et al., 2015) v důsledku působení glukokortikoidních hormonů (Cabezas et al., 2007) a prostřednictvím termokamery lze ze snímků získat data o těchto změnách. tato metoda se mimo jiné používá také k detekci některých zdravotních poruch u zvířat, která se také projevují změnou teploty na povrchu (Colak et al., 2008; Wilcox

et al., 2009). Výhodou této metody je její rychlost a především to, že se jedná o zcela bezkontaktní způsob měření – je tedy možné vyhnout se ovlivnění konečných hodnot přímou manipulací se zvířetem. Je však třeba počítat s určitými faktory, které mohou měření ovlivnit – například proudění vzduchu, sluneční záření nebo vlhkost (Travain and Valsecchi, 2021).

Cílem této práce bylo získat data o povrchové teplotě na vnitřním koutku oka králíků, naměřit hodnoty bazální teploty u králíka v kleci a následně je porovnat s hodnotami během manipulace, tetování a po něm.

Materiál a metodika

Ke snímání králíků byla využita termokamera testo 890-2 (Testo SE & Co. KGaA, Německo) s nastavenou emisivitou 0,97. Snímky byly pořizovány v pravém úhlu ke hlavě králíka ze vzdálenost 0,5 metru. Měření bylo prováděno na 12 králících tří plemen (kastorex, velký světlý stříbrný králík, meklenburský strakáč černý) ve stáří 7-8 měsíců. Králíci byli nejdříve snímáni termokamerou ve svých ubikacích (klecích), kde s nimi nebylo nijak manipulováno (bazální hodnota). Poté byli ze svých kotců přemístěni na stůl, kde byli zafixováni druhou osobu, která se při fixaci vyvarovala dotyku v oblasti očí, aby neovlivnila povrchovou teplotu. Při této manipulaci a znehybnění králíka (fixace 1) byli králíci snímáni po dobu 3 minut a následně bezprostředně v průběhu 1 minuty po tetování (tetování), které proběhlo tetovacími kleštěmi. Poté byla opět hlava králíka snímána po dobu dalších 3 minut (fixace 2) a následně byl králík vrácen do kotce, kde byl opět snímán po dalších 10 minutách (po ukončení). Výsledné hodnoty teplot byly odečítány z vnitřního koutku oka, které se pro tento účel jeví jako neoptimálnější – nedochází k ovlivnění vlhkosti, jako je tomu na nose. Vhodným místem pro snímání povrchové teploty jsou také uši králíka, které v tomto případě vzhledem k probíhajícímu tetování nemohly být využity.

Pro statistické zhodnocení byly hodnoty naměřené teploty u všech králíků rozděleny do následujících kategorií: bazální hodnota (v kleci před jakoukoli manipulací), fixace 1 (před tetováním u fixovaného králíka na stole), tetování (hodnoty naměřené do 1 minuty po provedení tetování), fixace 2 (během 2. – 4. minuty po tetování) a po ukončení (10 minut po návratu do kotce). Ke statistickému zpracování byl využit program UNISTAT 6.5 for Excel (Unistat Ltd., London, UK). Ke stanovení rozdílů mezi naměřenými hodnotami u jednotlivých kategorií (bazální teplota, fixace 1, tetování, fixace 2 a po ukončení) byla využita Friedmanova dvoufaktorová analýza rozptylu s mnohonásobným porovnáním pro t-rozdělení. Stanovené byly také minimální, maximální a průměrné hodnoty povrchové teploty u jednotlivých kategorií. Ve všech statistických testech byla hodnota $p < 0,01$ stanovena jako statisticky významná.

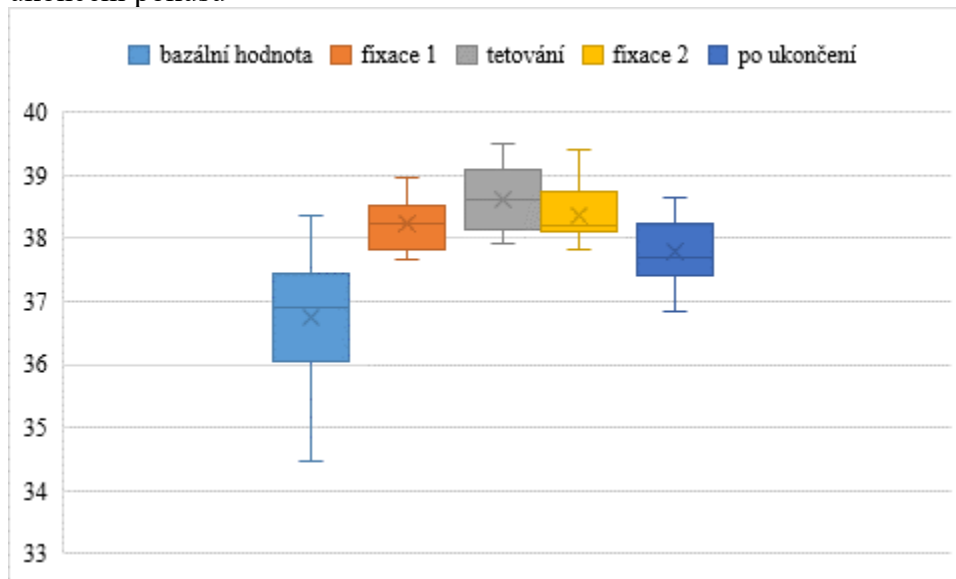
Výsledky

Během měření byl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) mezi všemi měřenými kategoriemi s výjimkou srovnání teplot naměřených při fixaci před tetováním (fixace 1) a fixaci po tetování (fixace 2), kde nebyl nalezen statistický rozdíl ($p > 0,01$). Tabulka č. 1 zobrazuje průměrné, minimální a maximální hodnoty naměřené během jednotlivých situací a graf č. 1 znázorňuje změny teploty v rámci jednotlivých kategorií.

Tabulka č. 1. Minimální, maximální a průměrné hodnoty povrchové teploty ve vnitřním koutku oka naměřená u všech 12 králíků v jednotlivých fázích měření

°C	bazální hodnota	fixace 1	tetování	fixace 2	po ukončení
průměr	36,75	38,22	38,62	38,37	37,78
minimum	34,45	37,65	37,9	37,81	36,85
maximum	38,35	38,95	39,5	39,41	38,65

Graf č. 1. Srovnání změn povrchových teplot 12 králíků v kleci, během fixace, tetování a po ukončení pokusu



Diskuze

Welfare králíků chovaných pro produkci masa, při přepravě, a v případě chovu v laboratorních podmínkách je aktuálně řešeným problémem (Cullere and Dalle Zotte, 2018), neboť tyto chovy mají negativní vliv nachování zvířat a snižují jejich životní úroveň (Dixon et al., 2010; Whary et al., 1993). U králíků v této studii bylo prokázáno, že teplota při akutním stresu v oblasti oka významně stoupá. Zvýšení povrchové teploty na oku obdobně jako u králíků v této studii bylo prokázáno také u koz (Bartolomé et al., 2019), koní (Yarnell et al., 2013) a také u psů, u kterých byl hodnocen vliv stresu při vyšetření veterinárním lékařem (Travain et al., 2015). U těchto psů byly hodnoty povrchové teploty nejvyšší během samotného vyšetření oproti hodnotám před a po vyšetření. Toto odpovídá našemu zjištění, kdy nejvyšší hodnota byla naměřena bezprostředně po tetování (38,62 °C) oproti teplotám před a po něm (38,22 °C, respektive 38,37 °C), všechny tyto teploty však zůstávaly významně vyšší než bazální hodnota (36,75 °C). Autoři u těchto psů také popisují, že termokamera měla na psy rušivý vliv, kdy zvířata na namířenou kameru reagovali odvracením hlavy, což u králíků nebylo pozorováno. K obdobným výsledkům přišly také další autoři při hodnocení akutního stresu u volně žijících druhů zvířat, konkrétně u sýkorek modřinek (Jerem et al., 2019). V tomto případě autoři popisují před vzestupem teploty také její pokles, zřejmě vlivem vazokonstrikce v dané oblasti bezprostředně po vystavení silnému stresovému faktoru. Tento pokles u králíků zaznamenán nebyl, což může být dáno odlišným provedením pokusu, případně k tomuto poklesu došlo v několika vteřinách po tetování, kdy vzhledem k pohybům hlavy v důsledku bolesti nebyly snímky provedeny. Mírný pokles povrchové teploty v oblasti očí králíků popisují také autoři Luzi et al. (2007), kteří naměřili jako průměr bazálních teplot naměřených v klecích v oblasti oka 35,4°C a po stresové zátěži 35,1 °C, nicméně v tomto případě byly snímky pořízeny až 15 minut po vystavení stresové situaci a je tedy možné, že během této doby mohlo dojít k opětovnému poklesu teplot, jak bylo zjištěno i v naší studii (teplota po ukončení fixace). Přesto na rozdíl od této studie se v našem případě se hodnoty po ukončení pokusu (37,78 °C) stále pohybovaly nad hodnotou bazální (36,75 °C). Nižší hodnoty při akutním stresu mohou být způsobeny vazokonstrikcí v dané oblasti (Herborn et al., 2015), ale vliv na vazokonstrikci nebo vazodilataci se zřejmě na těle může různit, jak bylo zjištěno u potkanů (Vianna and Carrive, 2005).

Stresová situace měla vliv na změnu povrchové teploty v koutku oka králíka a potvrdila tak vhodnost tohoto místa k získávání dat vzhledem k minimálnímu osrstění, jak

zmiňují také autoři Jaén-Télez et al. (2020). Vzhledem k tomu, že se jednalo o králíky do určité míry zvyklé na přítomnost člověka, což snižuje jejich strach z osob ve své blízkosti (Pongrácz et al., 2001), je možné, že nejvyšší teploty byly právě v reakci na bolest během tetování a u zvířat nenavyklých na blízkost člověka by již samotná manipulace mohla výrazněji zvyšovat povrchovou teplotu.

Závěr

Infračervená termografie dokáže poskytnout data o změnách povrchové teplotě v souvislosti s akutním stresem u králíků. Tato metoda je výhodná zejména z toho pohledu, že není nutné se zvířaty manipulovat a nedojde tak k ovlivnění výsledků. Při akutním stresu dochází ke stoupání teploty na oku králíka, které se jeví jako vhodné místo k měření, které není pokryto srstí a je dobře dostupné pro snímání. Akutní stresová reakce a bolest způsobují výrazné zvýšení teploty v této oblasti a klesá po určitou dobu po ukončení manipulace.

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

Literatura

- Bartolomé, E., Azcona, F., Cañete-Aranda, M., Perdomo-González, D.I., Ribes-Pons, J., Terán, E.M. 2019. Testing eye temperature assessed with infrared thermography to evaluate stress in meat goats raised in a semi-intensive farming system: a pilot study. *Arch. Anim. Breed.* 62: 199-204.
- Cabezas, S., Blas, J., Marchant, T.A., Moreno, S. 2007. Physiological stress levels predict survival probabilities in wild rabbits. *Hormones and Behavior* 51: 313-320.
- Colak, A., Polat, B., Okumus, Z., Kaya, M., Yanmaz, L.E., Hayirli, A. 2008. Short Communication: Early Detection of Mastitis Using Infrared Thermography in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 91: 4244–4248.
- Cullere, M., Dalle Zotte, A. 2018. Rabbit meat production and consumption: State of knowledge and future perspectives. *Meat Science* 143: 137-146.
- Dalmau, A., Catanese, B., Rafel, O., Rodriguez, P., Fuentes, C., Llonch, P., Mainau, E., Velarde, A., Ramón, J., Taberner, E., López-Béjar, M., Piles, M. 2015. Effect of high temperatures on breeding rabbit behaviour. *Anim. Prod. Sci.* 55: 1207.
- Dixon, L.M., Hardiman, J.R., Cooper, J.J. 2010. The effects of spatial restriction on the behavior of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Veterinary Behavior* 5: 302-308.
- Gunn, D., Morton, D.B. 1995. Inventory of the behaviour of New Zealand White rabbits in laboratory cages. *Applied Animal Behaviour Science* 45: 277-292.
- Herborn, K.A., Graves, J.L., Jerem, P., Evans, N.P., Nager, R., McCafferty, D.J., McKeegan, D.E.F. 2015. Skin temperature reveals the intensity of acute stress. *Physiology & Behavior* 152: 225-230.
- Hudson, R., Maqueda, B., Velázquez Moctezuma, J., Morales Miranda, A., Rödel, H.G. 2011. Individual differences in testosterone and corticosterone levels in relation to early postnatal development in the rabbit *Oryctolagus cuniculus*. *Physiology & Behavior* 103: 336-341.
- Chu, L., Garner, J.P., Mench, J.A. 2004. A behavioral comparison of New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) housed individually or in pairs in conventional laboratory cages. *Applied Animal Behaviour Science* 85: 121-139.
- Jaén-Télez, J.A., Sánchez-Guerrero, M.J., López-Campos, J.I., Valera, M., González-Redondo, P. 2020. Acute stress assessment using infrared thermography in fattening rabbits reacting to handling under winter and summer conditions. *Span J Agric Res* 18: e0502.
- Jerem, P., Jenni-Eiermann, S., McKeegan, D., McCafferty, D.J., Nager, R.G. 2019. Eye region surface temperature dynamics during acute stress relate to baseline glucocorticoids independently of environmental conditions. *Physiology & Behavior* 210: 112627.

- Luzi, F., Ludwig, N., Gargano, M., Milazzo, M., Carezzi, C., Verga, M. 2007. Evaluation of skin temperature change as stress indicator in rabbit through infrared thermography. *Italian Journal of Animal Science* 6: 769.
- Mazzone, G., Vignola, G., Giammarco, M., Manetta, A.C., Lambertini, L. 2010. Effects of loading methods on rabbit welfare and meat quality. *Meat Science* 85: 33-39.
- Munari, C., Ponzio, P., Macchi, E., Elkhawagah, A.R., Tarantola, M., Ponti, G., Mugnai, C. 2020. A multifactorial evaluation of different reproductive rhythms and housing systems for improving welfare in rabbit does. *Applied Animal Behaviour Science* 230: 105047.
- Pongrácz, P., Altbäcker, V., Fenes, D. 2001. Human handling might interfere with conspecific recognition in the european rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): Object-Specific Effect of Early Handling. *Dev. Psychobiol.* 39: 53–62.
- Prola, L., Cornale, P., Renna, M., Macchi, E., Perona, G., Mimosi, A. 2013. Effect of Breed, Cage Type, and Reproductive Phase on Fecal Corticosterone Levels in Doe Rabbits. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 16: 140–149.
- Travain, T., Valsecchi, P. 2021. Infrared Thermography in the Study of Animals' Emotional Responses: A Critical Review. *Animals* 11: 2510.
- Travain, T., Colombo, E.S., Heinzl, E., Bellucci, D., Prato Previde, E., Valsecchi, P. 2015. Hot dogs: Thermography in the assessment of stress in dogs (*Canis familiaris*)—A pilot study. *Journal of Veterinary Behavior* 10: 17-23.
- Trocino A., Xiccato G. 2010. Animal welfare in reared rabbits: a review with emphasis on housing systems. *World rabbit sci.* 14: 77-93.
- Vianna, D.M.L., Carrive, P. 2005. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. *European Journal of Neuroscience* 21: 2505-2512.
- Whary, M., Peper, R., Borkowski, G., Lawrence, W., Ferguson, F. 1993. The effects of group housing on the research use of the laboratory rabbit. *Lab Anim* 27: 330-341.
- Wilcox, C.S., Patterson, J., Cheng, H.W. 2009. Use of thermography to screen for subclinical bumblefoot in poultry. *Poultry Science* 88: 1176-1180.
- Yarnell, K., Hall, C., Billett, E. 2013. An assessment of the aversive nature of an animal management procedure (clipping) using behavioral and physiological measures. *Physiology & Behavior* 118: 32-39.

Hodnocení akutního stresu u králíka domácího (*Oryctolagus cuniculus f. domestica*) stanovením glukokortikoidů ve slinách

Gabriela Lukešová, Eva Voslášková, Martina Volfová, Vladimír Večerek

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

Abstrakt

Hodnocení stresu u hospodářských zvířat je aktuálním tématem a metody stanovení úrovně stresu jsou často diskutovány. Možnost stanovit hladinu kortikosteronu u králíků je spojena s mnoha výhodami, neboť se jedná o neinvazivní metodu sběru vzorků, které zároveň spolehlivě odráží momentální stav zvířete bez zkreslení výsledků, jako je tomu například při odběrech krve. V rámci hodnocení bylo 6 králíkům domácích při fixaci odebrán vzorek slin v 6, 9, 12, 15 a 18 hodin v průběhu tří po sobě jdoucích dnů. Hladiny kortikosteronu ve slinách u jednotlivých králíků vykazovaly obdobné kolísání v průběhu dne s významným navýšením mezi 12. a 15. hodinou ($p < 0,05$), a ačkoli variabilita v koncentracích byla poměrně vysoká, mezi jednotlivými králíky nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v koncentracích kortikosteronu. Ačkoli bazální hodnota kortikosteronu u králíků není známá a je těžké ji určit, tato studie jako jedna z mála předkládá výsledky kolísání koncentrací kortikosteronů ve slinách králíků a konkrétní výsledky naměřených koncentrací.

Úvod

Hodnocení stresu u zvířat je aktuálním tématem v oblasti welfare a vzhledem ke snaze rozvíjet postupy šetrné ke zvířatům jsou stále vyvíjeny a zdokonalovány neinvazivní metody. Jako matrice pro analýzu metabolitů glukokortikoidních hormonů kortizolu a kortikosteronu zde slouží různé biologické materiály, jako jsou sliny, srst, moč, mléko a výkaly (Verkerk et al., 1998, Kobelt et al., 2003, McCobb et al., 2005, Finkler and Terkel, 2010, Snyder et al., 2012, Volfova et al., 2019). V minulosti bylo nejužívanější metodou pro stanovení koncentrace glukokortikoidů odebrání krve zvířete (Romero, 2002). Odběr je však poměrně stresující, což může ovlivnit výsledné hodnoty. Problémem je také omezení použití invazivního odběru vzorků u velmi malých zvířat, který je kromě negativních dopadů na welfare jedince vysoce rizikovým úkonem spojeným s velkou ztrátou krve a následným úhynem, navíc není možné u takových zvířat odběr opakovat a hodnotit tak například hormonální status jedince během probíhající choroby (Touma and Palme, 2005). Vylučování glukokortikoidních hormonů je ovlivňováno cirkadiánními rytmy, kdy během 24hodinových cyklů, které jsou ovlivňovány jak endogenními, tak exogenními faktory (střídáním dne a noci), dochází ke kolísání v hladinách výše uvedených hormonů. Na základě koncentrací naměřených z krve tedy nelze přesně určit úroveň stresové reakce jedince, protože pouze vypovídají o aktuálním stavu zvířete, který je navíc ovlivněný samotným odběrem (Sapolsky et al., 2000).

Neinvazivní metody naopak nabízí oproti invazivním metodám řadu výhod. Například umožňují monitorovat nejen krátkodobé, ale i dlouhodobé změny v koncentracích metabolitů glukokortikoidů, které jsou podstatné při déle probíhajících studiích sledujících například kolísání hladin metabolitů během ročních období apod. (Touma et al., 2004). Hodnocení kortizolu či kortikosteronu ze slin je v současné době hojně využívanou metodou u hospodářských i zájmových zvířat (Kobelt et al., 2003). Dle dosavadních studií je zjištěno, že se hladina kortizolu v krvi odebíraného zvířete zvyšuje po 3 minutách od zahájení manipulace. Dle Kobelt et al. (2003) nedocházelo do 4 minut od zahájení manipulace se

zvířetem ke zvýšení hladin kortizolu ve slinách, což potvrzuje, že neinvazivní odběr vzorků je mnohem více reprezentativní a není ovlivněn samotným odběrem.

Králík domácí je druh hojně využívaný v intenzivních chovech pro produkci masa, ale také jako laboratorní zvíře. Během života se králíci setkávají s celou řadou stresových faktorů, které mají velký vliv na úroveň kvality jejich života (Dalmau et al., 2015; Mazzone et al., 2010). Pro hodnocení stresu u králíka již byly v minulosti využity invazivní metody jako je odběr krve (Hudson et al., 2011) nebo neinvazivní metody stanovení hladiny hormonů z trusu (Prola et al., 2013), a je známa pouze jedna studie, zabývající se odběrem a stanovení glukokortikoidů ze slin (Munari, 2020). Při hodnocení hladin stresových markerů u králíků ze slin je však potřeba si uvědomit, že na rozdíl od většiny savců je dominantně vylučován kortikosteron (Palme, 2019), nikoliv kortizol. Kortikosteron je ve větší míře také vylučován například u ptáků a hlodavců (Romero, 2004). Výhody použití neinvazivních metod spočívají nejen v šetrnosti vůči zvířeti, ale v případě stresu také nedochází ke zkreslení výsledků samotnou manipulací, případně doprovázenou bolestí, během odběru vzorku. Pro stanovení kortikosteronu ze slin je možné využít ELISA Immunoassay kitů (Palme, 2012).

Cílem studie bylo stanovení koncentrace kortikosteronu ve slinách u králíka domácího a jejího kolísání hladiny kortikosteronu v průběhu dne.

Materiál a metodika

Pro experiment bylo vybráno 10 dospělých králíků hybrid HYLEA (Farma Kočárovi s.r.o., Jaroměřice nad Rokytnou). Králíci byli umístěni v nerezových koutcích s plastovým roštem a plošinou v prostorách s kontrolovanými podmínkami prostředí, které zahrnovaly 12 h světelný režim. Teplota byla udržována v rozmezí 17 až 23 °C a vlhkost 45 % až 60 %. Voda byla podávána ad libitum, krmeni byli 1x denně kompletní krmnou směsí. Králíci mezi sebou měli vizuální, čichový i hlasový kontakt.

Série odběrů probíhala po dobu 3 dnů. Každý den byl odběr realizován v 6, 9, 12, 15 a 18 hodin. Celkově tedy bylo odebráno 15 vzorků od každého králíka. Odběr slin byl proveden z tlamy pomocí odběrového setu Salivette (Sarstedt, Nümbrecht, Německo). Odběrový tampón byl pomocí peánu vložen do koutku tlamy králíka, který jej následně žvýkal po dobu 60-90s. Salivette sety byly ihned po odběru centrifugovány (6000ot/ 15 min). Vzorek slin byl přesunut do zkumavek Eppendorf a zmražen a uchováván v teplotě -80 °C. Množství slin odebraných od jednotlivých králíků byl individuální v rozmezí 0,02 – 0,5 ml. Během odběrů byli vyřazeni králíci, u kterých nebyl odebrán dostatečný vzorek pro hodnocení – jednalo se o 4 králíky, vzorky slin tak byly hodnoceny od 6 králíků.

Pro detekci kortikosteronu ve slinách králíků byl využit Corticosterone Competitive ELISA Kit (ThermoFisher Scientific, Česká republika) určený pro stanovení kortikosteronu ve vzorcích trusu, plazmy, séra a moči bez ohledu na druh zvířete s citlivostí 18,6 pg/ml a detekčními limity 78,125-10 000 pg/ml. Hodnocení bylo provedeno na kalorimetrickém snímači při vlnové délce 450 nm a výsledky byly odečteny z křivky navržené v software Arigo 's ELISA calculator (www.arigobio.com).

Pro vyhodnocení byly výsledné hodnoty u každého králíka v určitou hodinu vypočítány jako průměr hodnot tří vzorků odebraných ve stejný čas (tedy v 6, 9, 12, 15 a 18 hodin). Ke statistickému zpracování byl využit program UNISTAT 6.5 for Excel (Unistat Ltd., London, UK). Ke stanovení rozdílů mezi naměřenými hodnotami u králíků v jednotlivých sledovaných časech a také pro zhodnocení kolísání hladin kortikosteronu u každého králíka během dne byla využita Friedmanova dvoufaktorová analýza rozptylu s mnohonásobným porovnáním pro t-rozdělení. Stanovené byly také minimální, maximální a průměrné hodnoty koncentrace kortikosteronu v daných časech odběru. Ve statistických testech byla hodnota $p < 0,05$ stanovena jako statisticky významná.

Výsledky

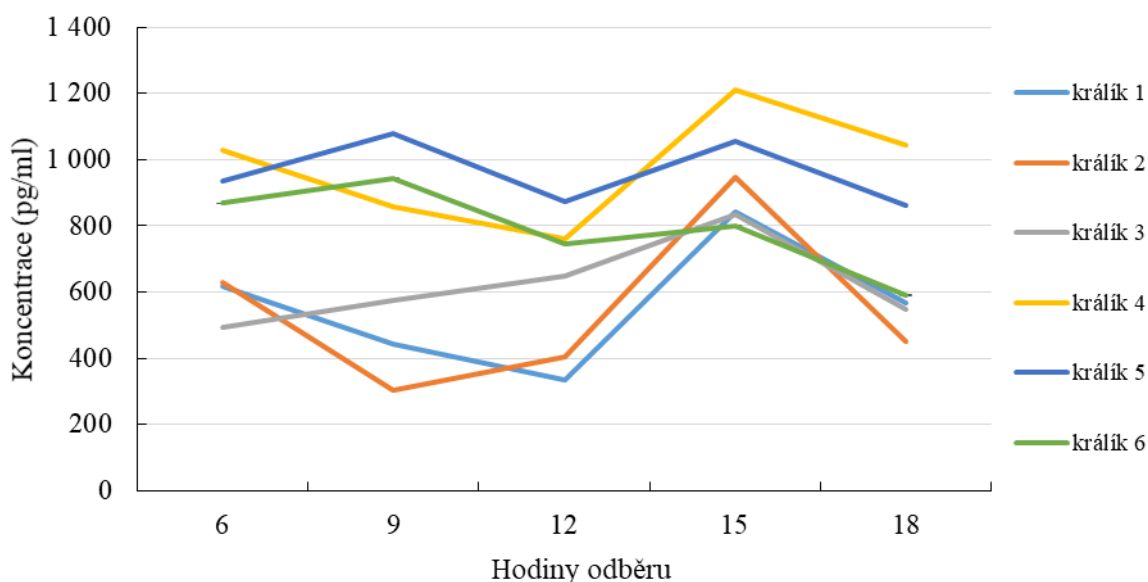
Pomocí testovací sady Corticosterone Competitive ELISA Kit byly zaznamenány následující průměrné koncentrace kortikosteronu ve slinách šesti králíků (Tabulka č. 1).

Tabulka č. 1. Průměrné koncentrace kortikosteronu ve slinách 6 králíků při odběrech v 6, 9, 12, 15 a 18 hodin (pg/ml).

Králík	Čas				
	6,00	9,00	12,00	15,00	18,00
1	617,52 ± 15,06	443,30 ± 63,45	336,07 ± 270,53	841,25 ± 186,80	568,97 ± 28,65
2	628,77 ± 325,76	304,61 ± 64,69	402,76 ± 236,15	947,55 ± 308,06	452,45 ± 203,58
3	493,18 ± 71,62	575,69 ± 179,60	650,35 ± 3,76	832,85 ± 143,86	548,12 ± 100,11
4	1 028,96 ± 145,31	857,17 ± 78,32	759,54 ± 152,34	1 211,77 ± 182,39	1 042,71 ± 310,62
5	935,75 ± 140,40	1 078,59 ± 54,34	873,01 ± 124,78	1 055,67 ± 123,67	859,94 ± 94,19
6	867,63 ± 79,76	944,20 ± 505,57	746,46 ± 465,28	799,61 ± 257,43	590,88 ± 307,34

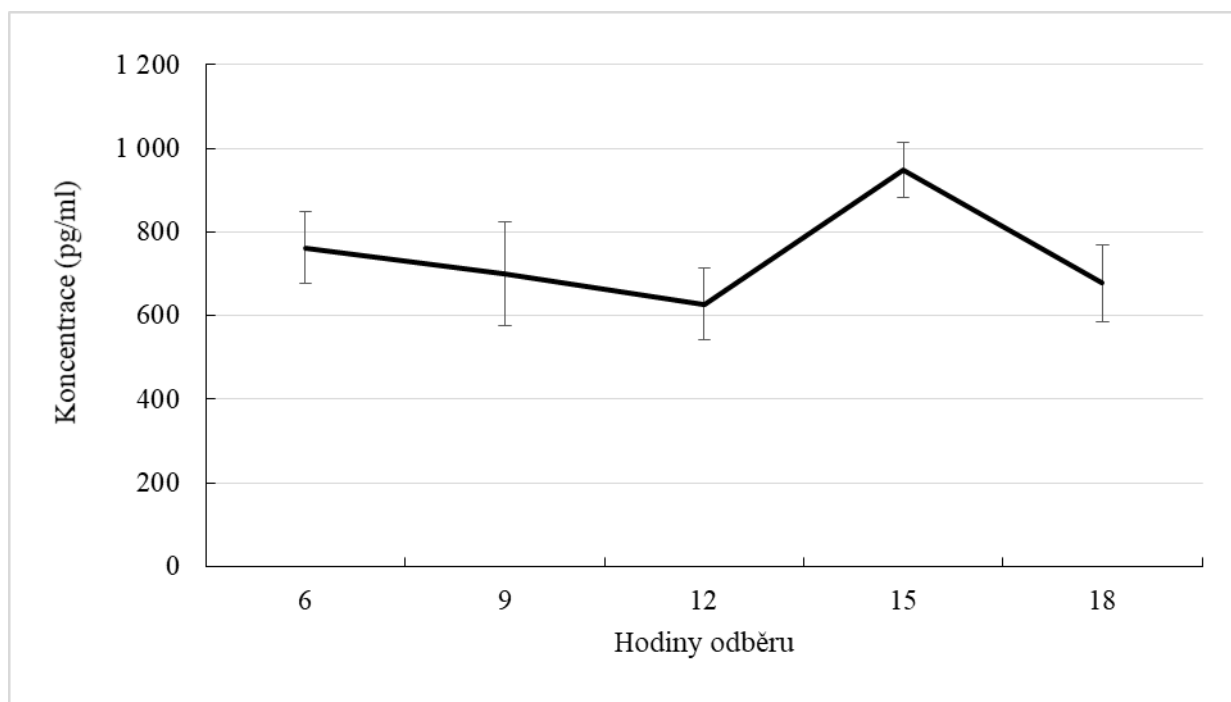
U naměřených průměrných koncentrací kortikosteronu ve slinách v jednotlivých časech nebyly mezi jednotlivými králíky zjištěny rozdíly významné rozdíly ($p > 0,05$) (graf č. 1).

Graf č. 1. Kolísání koncentrace kortikosteronu ve slinách všech šesti králíků během dne při odběrech v 6, 9, 12, 15 a 18 hodin.



V další fázi bylo sledováno kolísání hladin kortikosteronu ve slinách všech králíků v průběhu dne. Mezi hodnotami naměřenými v 12,00 a 15,00 byl významný rozdíl ($p < 0,05$) u všech šesti králíků (graf č.2).

Graf č. 2. Kolísání koncentrace kortikosteronu ve slinách králíků během dne při odběrech v 6, 9, 12, 15 a 18 hodin.



Kolísání koncentrací kortikosteronu naměřeného ve slinách u všech šesti králíků zvláště během dne ukazuje graf č. 2.

Diskuze

Jak vyplývá z našich výsledků, mezi sledovanými jedinci nedocházelo v jednotlivých časech odběrů k rozdílným v koncentracích slinného kortikosteronu. Všechny šest králíků tedy reagovalo na manipulaci (vytažení z klece a fixace z důvodu odběru slin) a následný odběr stejně. V jednotlivých časech byly patrné minimální nevýznamné odchylky v hladinách slinného kortikosteronu, kdy například v 6 hodin ráno byla nejnižší naměřená hodnota 493,18 pg/ml a nejvyšší 1 028,96 pg/ml. Rozdíly mezi jedinci jsou obvyklé, protože každý reaguje na stresovou zátěž rozdílně a velmi závisí na jeho charakteru, zkušenosti se stresem apod. (Touma and Palme, 2005). Nelze tedy jednoznačně stanovit referenční rozmezí koncentrací glukokortikoidů naměřených ve vzorcích, neboť výše hladiny závisí vždy na konkrétní situaci, konkrétních podmínkách, kde jsou zvířata umístěna a na jednotlivcích. Například hladiny kortikosteronu ve slinách králíků naměřené v naší studii jsou velmi odlišné od hladin naměřených u králíků ve studii Munari et al. (2020). Zde byly mimo jiné hodnoceny hladiny slinného kortikosteronu u ramlic v intenzivní reprodukci. Naměřené průměrné hodnoty kortikosteronu ze slin se pohybovaly v rozmezí 1036 až 2929 ng/ml, u našich králíků byly naměřené průměrné koncentrace slinného kortikosteronu v rozmezí 628 až 948 pg/ml. Tato skutečnost může být vysvětlována tím, že v naší studii se jednalo o králíky výrazně méně zatížené stresem, neboť autoři Munari et al. (2020) měli za cíl vyhodnotit nejlepší kombinaci systémů ustájení a reprodukčních rytmů. Bohužel další výzkumy zaměřující se na hladiny kortikosteronu ve slinách králíků autorům nejsou známy a nelze je porovnat se zjištěnými výsledky. Jsou známy pouze výsledky výzkumu a hladiny kortikosteronu v krvi králíků, kde se jako klidová hodnota uvádí koncentrace 15 200 pg/ml (Schoemaker and van Zeeland, 2021). Koncentrace zjištěná ve slinách by potom potvrzovala domněnku, že ve slinách se

nachází zhruba 10 % koncentrace v krvi (Fell et al., 1985; Fell and Shutt, 1986; Schoemaker and van Zeeland, 2021).

Jak bylo dále zjištěno, během dne dochází ke kolísání hladiny slinného kortikosteronu. Jak potvrzují jiné studie, diurnální kolísání ve vylučování glukokortikoidů je běžné a u různých druhů je pík zaznamenán v různých časech (Gianetto et al., 2014; Hambrecht et al., 2020; Touma and Palme, 2005; Verspeek et al., 2021). Například u většiny diurnálních zvířat obvykle nastává ke konci období tmy, zatímco u primárně nočních živočichů, dochází k vrcholu sekrece na konci světelné periody (Touma and Palme, 2005). U králíků v naší studii došlo mezi 6 hodinou ranní a 18 hodinou odpolední k významnému zvýšení hladin kortikosteronu ze slin v 15 hodin. V některých případech nemusí být kolísání v hladinách glukokortikoidů během dne zaznamenáno, především pokud dojde k působení silného stresoru, který může narušit diurnální rytmus, jak ve své studii dokazuje Hambrecht et al. (2020).

Závěr

Z hlediska welfare a ochrany zdraví zvířat chovaných pro laboratorní a hospodářské účely je nutné získat co nejvíce informací o jejich reakci na stresory souvisejícími s jejich chovem, a pokusit se je přizpůsobit tak, aby odpovídaly požadavkům zvířat a zvyšovaly úroveň jejich welfare. Enzymová imunoanalýza použitá v této studii se ukázala být dostatečně citlivá k detekci hladin kortikosteronů ze slin králíků a bylo prokázáno, že koncentrace kortikosteronu v průběhu dne kolísají i bez zjevného stresového faktoru a mohou tak být dále využity ve zdokonalování této metody a také v souvislosti s podmínkami chovu králíků.

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

Literatura

- Cook, N.J., Schaefer, A.L., Lepage, P., Jones, S.M. 1996. Salivary vs. Serum cortisol for the assessment of adrenal activity in swine. *Canadian Journal of Animal Science* 76: 329-335.
- Dalmau, A., Catanese, B., Rafel, O., Rodriguez, P., Fuentes, C., Llonch, P., Mainau, E., Velarde, A., Ramón, J., Taberner, E., López-Béjar, M., Piles, M. 2015. Effect of high temperatures on breeding rabbit behaviour. *Anim. Prod. Sci.* 55: 1207.
- Fell, L.R., Shutt, D.A. 1986. Adrenocortical response of calves to transport stress as measured by salivary cortisol. *Can. J. Anim. Sci.* 66: 637-641.
- Fell, L.R., Shutt, D.A., Bentley, C.J. 1985. Development of a salivary cortisol method for detecting changes in plasma “free” cortisol arising from acute stress in sheep. *Australian Vet J* 62: 403-406.
- Finkler, H., Terkel, J. 2010. Cortisol levels and aggression in neutered and intact free-roaming female cats living in urban social groups. *Physiology & Behavior* 99: 343-347.
- Giannetto, C., Fazio, F., Assenza, A., Alberghina, D., Panzera, M., Piccione, G. 2014. Parallelism of circadian rhythmicity of salivary and serum cortisol concentration in normal dogs. *Journal of Applied Biomedicine* 12: 229-233.
- Hambrecht, S., Oerke, A.K., Heistermann, M., Dierkes, P.W. 2020. Diurnal variation of salivary cortisol in captive African elephants (*Loxodonta africana*) under routine management conditions and in relation to a translocation event. *Zoo Biology* 39: 186-196.
- Hudson, R., Maqueda, B., Velázquez Moctezuma, J., Morales Miranda, A., Rödel, H.G. 2011. Individual differences in testosterone and corticosterone levels in relation to early postnatal development in the rabbit *Oryctolagus cuniculus*. *Physiology & Behavior* 103: 336-341.
- Kinn Rød, A.M., Harkestad, N., Jellestad, F.K., Murison, R. 2017. Comparison of commercial ELISA assays for quantification of corticosterone in serum. *Scientific Reports* 7: 6748.

- Kobelt, A.J., Hemsworth, P.H., Barnett, J.L., Butler, K.L. 2003. Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. *Research in Veterinary Science* 75: 157-161.
- Mazzone, G., Vignola, G., Giammarco, M., Manetta, A.C., Lambertini, L. 2010. Effects of loading methods on rabbit welfare and meat quality. *Meat Science* 85: 33-39.
- McCobb, E.C., Patronek, G.J., Marder, A., Dinnage, J.D., Stone, M.S. 2005. Assessment of stress levels among cats in four animal shelters. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 226: 548-555.
- Munari, C., Ponzio, P., Macchi, E., Elkhawagah, A.R., Tarantola, M., Ponti, G., Mugnai, C. 2020. A multifactorial evaluation of different reproductive rhythms and housing systems for improving welfare in rabbit does. *Applied Animal Behaviour Science* 230: 105047.
- Palme, R. 2012. Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assessment in farm animals. *Animal Welfare* 21: 331-337.
- Palme, R. 2019. Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. *Physiology & Behavior* 199: 229-243.
- Prola, L., Cornale, P., Renna, M., Macchi, E., Perona, G., Mimosi, A. 2013. Effect of Breed, Cage Type, and Reproductive Phase on Fecal Corticosterone Levels in Doe Rabbits. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 16: 140-149.
- Romero, L.M. 2002. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and Comparative Endocrinology* 128: 1-24.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews* 21: 55-89.
- Schoemaker, N.J., van Zeeland, Y.R.A. 2021. Endocrine Diseases of Ferrets, in: *Ferrets, Rabbits, and Rodents*. Elsevier, pp. 77-91.
- Snyder, R.J., Perdue, B.M., Powell, D.M., Forthman, D.L., Bloomsmith, M.A., Maple, T.L. 2012. Behavioral and hormonal consequences of transporting giant pandas from china to the united states. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 15: 1-20.
- Touma, C.H., Palme, R. 2005. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1046: 54-74.
- Touma, C.H., Palme, R., Sachser, N. 2004. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Hormones and Behavior* 45: 10-22.
- Verkerk, G.A., Phipps, A.M., Carragher, J.F., Matthews, L.R., Stelwagen, K. 1998. Characterization of milk cortisol concentrations as a measure of short-term stress responses in lactating dairy cows. *Animal Welfare* 7: 77-86.
- Verspeek, J., Behringer, V., Laméris, D.W. et al. 2021. Time-lag of urinary and salivary cortisol response after a psychological stressor in bonobos (*Pan paniscus*). *Scientific Reports* 7905: 1-12.
- Volfova, M., Machovcova, Z., Schwarzenberger, F., Voslarova, E., Bedanova, I., Vecerek, V. 2019. The effects of transport stress on the behaviour and adrenocortical activity of the black-and-white ruffed lemur (*Varecia variegata*). *Acta Veterinaria Brno* 88: 85-92.

Zmeny zdravotných indikátorov welfare u mačiek v útulku ustajnených v skupine

Veronika Vojtkovská, Eva Voslářová, Vladimír Večerek

Ústav ochrany a welfare zvierat a verejného veterinárneho lékařství, FVHE VETUNI

Abstrakt

Táto štúdia sa zameriavala na dlhodobý monitoring zdravotných indikátorov welfare u populácie skupinovo ustajnených mačiek umiestnených v no-kill útulku súkromného typu v Českej republike, s cieľom vyvrátenia alebo potvrdenia hypotézy o zmene stavu mačiek (zhoršení alebo zlepšení) v priebehu pobytu v útulku. Sledovanie populácie mačiek prebiehalo počas jedného kalendárneho roka, zaznamenávanie dát prebiehalo vždy v dvojtýždennom intervale. Mačky boli hodnotené pomocou protokolu obsahujúceho 8 zdravotne orientovaných indikátorov welfare: telesná kondícia (BCS), viditeľnosť tretieho viečka, výtok z oka, iritácia oka, výtok z nosa, prítomnosť patologických zvukov, kvalita srsti, prítomnosť abnormálneho postoja a krívania. Stav mačky v každom indikátore bol ohodnotený na 5 bodovej stupnici, kde stupeň 1 reprezentoval optimálny stav a stupeň 5 závažné zhoršenie stavu v danom indikátore s výnimkou indikátora body condition, kde stupeň 3 predstavoval optimálny stav. Počas pobytu v útulku bolo zhoršenie známky v aspoň jednom z indikátorov zaznamenané u 41.6% mačiek. V rámci porovnania skóre mačiek pri prvom a poslednom hodnotení, bolo významné zlepšenie stavu zaznamenané v indikátore BCS a kvalite srsti. Najväčší počet mačiek, u ktorých sa stav v priebehu útulku zhoršil, bol spomedzi indikátorov viažucich sa k výskytu horných dýchacích ciest, zaznamenaný u indikátora výtok z oka (oproti skóre pri prijatí sa stav trvalo alebo prechodne zhoršil u 18.4% mačiek). S predlžujúcim sa pobytom mačky v útulku môže dochádzať k narušeniu welfare vplyvom stresu a vystaveniu zvierat veľkému infekčného tlaku. Ustajnenie mačiek v jednej veľkej skupine je z pohľadu nastavenia managementu k zabráneniu šírenia nákaz problematické; vytváranie menších, oddelených skupín je kľúčové. Špecifikácia podmienok vhodných pre zriadenie útulku by mala byť súčasťou právnych predpisov na ochranu zvierat v jednotlivých krajinách.

Úvod

Cieľom zariadení poskytujúcich starostlivosť o opustené a túlavé zvieratá je vo všeobecnosti okrem úspešnej adopcie čo najväčšieho počtu zvierat resp. vrátenia zvierat a jeho pôvodnému vlastníkovi i zabezpečenie dočasného umiestnenia, ktoré napĺňa požiadavky zvierat z pohľadu vhodnej výživy, ustajnenia, zdravotnej starostlivosti a ľudského kontaktu. Útulky nie sú zariadeniami, ktoré by mohli zvieratám poskytnúť vhodné zázemie z dlhodobého hľadiska a nenahrádzajú nový domov v plnej miere (Vojtkovská et al., 2020); kvalita poskytovanej starostlivosti je kritickým aspektom welfare v mnohých útulkoch (Carlstead et al., 1993). Napĺňanie prirodzených požiadaviek mačiek sa môže výrazne líšiť naprieč rôznymi typmi zariadení (Turner et al., 2012); niektoré štáty (napr. Česká republika, Rakúsko, Taliansko, Nemecko, Grécko) (Barnard et al., 2016; Arhant & Troxler, 2017; Vojtkovská et al., 2020) implementovali tzv. „no-kill“ politiku útulkov do svojich národných legislatív (pre tieto zariadenia platí, že zvieratá nie je možné utrátiť z dôvodu preplnenosti útulku resp. z dôvodu nízkej adopčnej atraktivity zvierat a pre potenciálnych osvojiteľov, čo typicky platí pre staršie a handicapované mačky (Gouveia et al., 2011)). U zvierat teda vzhľadom na dlhodobé umiestnenie v útulku hrozí narušenie kvality života, prejavujúce sa v behaviorálnych prejavoch (zvieratá môžu dlhodobo prežívať stres) a v zhoršení zdravotného stavu (Vojtkovská et al., 2020).

Faktory prostredia útulku (umiestnenie do neznámeho, niekedy na stimuly chudobného zázemia, nedostatok miesta, zmenu denného režimu, veterinárne ošetrenia, prítomnosť iných

zvierat a neznámych osôb a celkovú nedostatočnú kontrolu nad prostredím) môže mačka vnímať ako stresujúce (Amat et al., 2016; Stella et al., 2016; Vitale et al., 2019). V skorších štúdiách bola spojenosť medzi stresom a narušením imunity, ktorej dôsledkom je rozvoj alebo reaktivácia ochorenia, dobre zdokumentovaná (Pruett, 2003; Tanaka et al., 2012; Gourkow et al., 2014). Zdravotný stav mačiek však môže byť okrem pretrvávajúceho stresu ohrozený i prítomnosťou mačiek s neznámou zdravotnou históriou, zvýšená koncentrácia mačiek je spájaná so zvýšenou morbiditou (Stavisky & Adams, 2018). Z pohľadu šírenia nákaz sa vytváranie veľkých skupín, ktoré nie sú stabilné (dochádza v nich k obmenám jedincov) neodporúča (Stavisky & Adams, 2018); napriek tomu k ich vytváraniu v mnohých útulkoch dochádza hlavne z dôvodu nedostatku priestoru (Gouveia et al., 2011). Skupinové ustajnenie mačiek v útulkoch je preferovaným typom ustajnenia v mnohých štátoch a jeho pozitíva a negatíva oproti individuálnemu ustajneniu sú predmetom štúdií vedeckej komunity (Kessler & Turner, 1997; Kessler & Turner, 1999; Ottway & Hawkins, 2003; Gourkow & Fraser, 2006; Finka et al., 2014; Foster & Ijichi, 2017; Suchak & Lamica, 2018). Vzhľadom na možnosť narušenia zdravotného stavu mačiek po umiestnení do útulku, by v prípade hodnotenia welfare v zariadeniach, kde môžu byť zvieratá kvôli no-kill politike umiestnené dlhodobo, mali byť do protokolu zahrnuté adekvátne zdravotné ukazovatele (Botreau et al., 2007). Indikátory by mali byť vybrané tak, aby odrážali najčastejšie pozorovateľné príznaky narušeného zdravia vyskytujúce sa u mačiek v útulkoch (Vojtkovská et al., 2020). K frekventovane vyskytujúcim sa zdravotným problémom patria infekcie horných dýchacích ciest (URTD) (Tanaka et al., 2012; Gourkow et al., 2013), preto je vhodné zaradiť do hodnotenia prítomnosť špecifických príznakov napr. výtok z očí a nosa (Tanaka et al., 2012). Hodnotenie telesnej kondície môže poskytnúť užitočné informácie, keďže zmena telesnej hmotnosti môže indikovať závažný zdravotný problém resp. prítomnosť stresu vo všeobecnosti (Tanaka et al., 2012; Stella et al., 2013). Neadekvátne starostlivosť o srst', nedostatočná výživa, sociálne konflikty v skupine a chronické ochorenia sa odrážajú v kvalite srsti, preto je vhodné zaradiť ju k welfare indikátorom (Scott et al., 2002), rovnako ako aj neschopnosť zvierat a normálne sa pohybovať v dôsledku zranenia alebo ochorenia (Kent et al., 2010; Bennett et al., 2012).

Prvým cieľom našej štúdie bol dlhodobý monitoring zmien vo vybraných, zdravotne orientovaných welfare indikátoroch mačiek v no-kill útulku súkromného typu, v ktorom sú zvieratá umiestnené spoločne v jednej veľkej skupine. Druhým cieľom bolo zistiť, či v priebehu pobytu mačiek v útulku dochádza k zlepšovaniu alebo k zhoršovaniu ich stavu.

Materiál a metodika

Charakteristika útulku

Zber dát pre analýzu bol realizovaný v súkromnom útulku so skupinovým ustajnením mačiek, nachádzajúcom sa v Českej republike. Útulok sa vyznačuje no-kill politikou, nakoľko utratenie zvierat a z iných než zdravotných dôvodov nie je v Českej republike povolené podľa platnej legislatívy (zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvierat proti týraniu). Kapacita tohto zariadenia je 25 mačiek, s ročným príjmom okolo 200 zvierat. Po prijatí do útulku sú všetky mačky najprv samostatne alebo v skupine (ak boli prijaté z rovnakého zdroja) umiestnené do karanténneho zariadenia (karanténnych boxov o veľkosti 80x40x60 cm), v ktorých majú k dispozícii mačaciu toaletu, misky na potravu a vodu, hračku a peliešok. Útulok disponuje spolu 5 karanténnymi boxami. Počas karantény, ktorej dĺžka sa líši podľa potreby (úroveň zdravotného stavu konkrétneho zvieratá, no zároveň nie je kratšia ako 5 dní), sú všetky jedince prehladnuté zmluvným veterinárnym lekárom a ošetrené (zaočkované, ošetrené proti vnútorným a vonkajším parazitom a vykastrované) ak to dovoľuje ich vek a zdravotný stav. Po absolvovaní karantény, sú mačky zaradené do jednej veľkej skupiny medzi ostatné zvieratá. K vlastnému ustajneniu slúži podlahová plocha o celkovej rozlohe 53 m²; útulok

tvoria dve miestnosti (38 m²) a vonkajšia voliéra (15m²); zmienené priestory sú navzájom prepojené. V prvej miestnosti sa nachádzajú karanténne boxy, vyšetrovací stôl a pomôcky slúžiace ku kŕmeniu a ošetrovaniu zvierat. Vo vnútorných priestoroch útulku, ktoré sú mačacím priechodom prepojené s vonkajšou voliérou sa spolu nachádza 8 mačacích toaliet, 5 misiek so suchým krmivom, 7 misiek s vodou, hračky a ďalšie objekty, do ktorých sa môžu mačky v prípade potreby skrýť alebo v nich odpočívať (pelechy a mačacie stromy). Opísané priestory, ktoré majú mačky k dispozícii nie je možné predeliť, čo útulku neumožňuje vytváranie homogénnych skupín (ustajnenie mačiek podobného veku alebo mačiek prijatých z jednej domácnosti). Výnimku tvoria mačky s mláďatami a mačky vo vysokom štádiu gravidity, pre ktoré má útulok k dispozícii samostatné priestory. Keďže je možné do tohto priestoru umiestniť iba jednu matku s potomstvom, sú z kapacitných dôvodov v prípade prijatia ďalšieho vrhu, zvieratá prevezené do iného útulku. O zvieratá sa stará jeden ošetrovateľ; okrem suchého krmiva, ktoré je stále k dispozícii, je mačkám mokré krmivo podávané 2x denne na 5 stanovištiach. Čistenie mačacích toaliet prebieha denne podľa potreby; rutinná dezinfekcia priestorov útulku prebieha 1 x za dva dni.

Hodnotenie mačiek

Na základe dostupných vedeckých poznatkov, konzultácií a predbežného skríningu prejavov zhoršeného zdravotného stavu mačiek vo vybranom útulku, bol v spolupráci s pracovníkom útulku, a veterinárnym lekárom špecializujúcim sa na medicínu mačiek vytvorený protokol pozostávajúci z 8 vizuálne hodnotiteľných, zdravotne orientovaných indikátorov welfare, odrážajúcich najčastejšie pozorovateľné príznaky zhoršeného zdravotného stavu mačiek v útulku. Za účelom zaznamenávania i menších odchýlok v stave mačiek v jednotlivých indikátoroch, bol navrhnutý 5-bodový systém, kde skóre 1 reprezentovalo najlepší možný stav, zatiaľ čo skóre 5, závažné zhoršenie stavu. V prípade indikátora hodnotiaceho úroveň telesnej kondície bola použitá 5 bodová hodnotiacia stupnica body condition score (BCS) od Shoveller et al. (2014) s optimálnym skóre 3. Bližšia špecifikácia indikátorov a opis stupňov je zhrnutý v tabuľke č. 1.

Za účelom zistenia zmien vo vybraných indikátoroch i u jedincov nachádzajúcich sa v útulku dlhšie časové obdobie, prebiehal monitoring populácie počas 12-tich kalendárnych mesiacov (zahájenie v marci 2019, ukončenie v marci 2020). Zaznamenávanie dát (vyplňanie protokolu s indikátormi u každého zvieratá), prebiehalo vždy v dvojtýždennom intervale. Znamka udelená v každom z indikátorov predstavovala známku reprezentujúcu stav mačky v danom indikátore v čase monitoringu; hodnota tejto známky nadobúdala vždy hodnotu 1 až 5. Monitorované boli vždy všetky jedince momentálne sa nachádzajúce v útulku, zber dát bol zahájený iba u novo prijatých zvierat (mačky, ktoré sa v útulku nachádzali pred zahájením zberu neboli do štúdie zahrnuté). Počas monitorovacieho obdobia bolo ohodnotených celkom 220 mačiek (všetky mačky boli ohodnotené minimálne 1 krát a to po prijatí do útulku). Maximálny počet hodnotení bol 14, žiadna mačka sa teda v útulku nenachádzala dlhšie ako 26 týždňov. Databáza útulku poskytla ku každej hodnotenej mačke dodatočné informácie týkajúce sa pohlavia, veku, plemena, dátumu prijatia a dátumu ukončenia pobytu v útulku. Monitoring zvierat vykonával pracovník útulku v spolupráci s odborníkom špecializujúcim sa na hodnotenie welfare mačiek (autor tejto štúdie).

Štatistická analýza

Získané dáta boli analyzované pomocou štatistického softwaru Unistat 6.5 for Excel (Unistat Ltd., UK). Za účelom overenia normálnej distribúcie dát bol použitý Shapiro-Wilkov test (zistená bola nepravidelná distribúcia). Rozdiely v počtoch zvierat vo vytvorených kategóriách boli analyzované χ^2 testom (kontingenčnými tabuľkami o formáte 2 x 2). Pri porovnávaní kategórií, kde počet členov presiahol 5 bola použitá Yatesova korekcia. Fisherov test sa použil v prípade, že počet členov v porovnávaných skupinách nepresiahol 5. Štatistická významnosť medzi známkami, ktoré boli mačkám udeľované v jednotlivých

indikátoroch bola testovaná neparametrickým Wilcoxonovým testom. Korelácia medzi dĺžkou pobytu (vypočítaná ako rozdiel medzi dátumom prijatia mačky do útulku a dátumom ukončenia pobytu v útulku v dňoch) a priemernými známami vypočítanými pre každú mačku zo všetkých udelených známok v rámci pobytu v každom indikátore, bola overovaná Spearmanovým korelačným koeficientom. Tento koeficient bol použitý i v prípade overenia korelácie medzi priemernými známami mačiek v jednotlivých indikátoroch navzájom. V prípade korelácie priemerných známok indikátora BCS s dĺžkou pobytu a ostatnými indikátormi, bola 5 bodová stupnica BCS prevedená do 3 bodového systému, kde skóre 3 predstavovalo optimálny stav, skóre 2 mierne zhoršený stav (podváha/nadváha) a skóre 1 výrazné zhoršenie stavu (výrazná podváha/obezita). Tento postup bol zvolený nakoľko stupnica BCS štandardne nemá charakter kontinua, kde najvyššia známka predstavuje najlepší alebo najhorší možný stav. Za štatisticky významnú bola považovaná hodnota $P \leq 0,05$.

Tabuľka č. 1. Hodnotiaci protokol – popis známok v jednotlivých indikátoroch.

indikátor	špecifikácia hodnotenia	skóre 1	skóre 2	skóre 3	skóre 4	skóre 5
BCS	množstvo telesného tuku	výrazná podváha	podváha	ideálna váha	nadváha	obezita
viditeľnosť tretieho viečka	intenzita viditeľnosti tretieho viečka	absentujúca	slabá	stredná	výrazná	úplné prekrytie oka tretím viečkom
výtok z oka	intenzita výtoku	bez výtoku	slabý výtok	stredne silný výtok	silný výtok	veľmi silný výtok
iritácia oka	začervenanie, opuch	bez iritácie	slabá iritácia	stredne silná iritácia	silná iritácia	veľmi silná iritácia
výtok z nosa	intenzita výtoku	bez výtoku	slabý výtok	stredne silný výtok	silný výtok	veľmi silný výtok
prítomnosť patologických zvukov	frekvencia výskytu patologických zvukov -kašeľ, kýchanie, chrčanie	bez patologických zvukov	patologické zvuky vyskytujúce sa veľmi zriedkavo	patologické zvuky vyskytujúce sa zriedkavo	patologické zvuky vyskytujúce sa často	patologické zvuky vyskytujúce sa veľmi často
kondícia srsti	kvalita srsti a stav kože	výborná kondícia	dobrá kondícia	uspokojivá kondícia	slabá kondícia	veľmi slabá kondícia
abnormálny postoj a krívanie	ľahkosť pohybu a chôdze	abnormálneho postoja a krívania, mačka sa pohybuje s ľahkosťou	vykazuje prítomnosť krívania alebo abnormálneho postoja	mačka vykazuje výraznú prítomnosť krívania alebo abnormálneho postoja	mačka vykazuje veľmi výraznú prítomnosť krívania alebo abnormálneho postoja	mačka je neschopná pohybovať sa v dôsledku krívania alebo abnormálneho postoja

Výsledky

Charakteristika sledovanej populácie

Počas monitoringu bolo spolu ohodnotených 220 mačiek; medián dĺžky pobytu mačiek v útulku bol 40 dní, priemer 58,9 dní. V tabuľke č. 2 je uvedený počet mačiek ohodnotených počas jednotlivých týždňov, tabuľka č. 3 uvádza charakteristiku sledovanej populácie mačiek v útulku.

Tabuľka č. 2. Počet mačiek ohodnotených v útulku počas jednotlivých týždňov hodnotenia.

počet hodnotení = zodpovedajúci počet týždňov, ktorí mačka strávila v útulku	počet mačiek, ktoré strávili v útulku daný počet týždňov	súhrnný počet mačiek, ktoré boli hodnotené minimálny uvedený počet
1 hodnotenie = 0 týždňov v útulku	82	220
2 hodnotenie = 2 týždne v útulku	43	138
3 hodnotenie = 4 týždne v útulku	39	95
4 hodnotenie = 6 týždňov v útulku	23	56
5 hodnotenie = 8 týždňov v útulku	8	33
6 hodnotenie = 10 týždňov v útulku	7	25
7 hodnotenie = 12 týždňov v útulku	5	18
8 hodnotenie = 14 týždňov v útulku	1	13
9 hodnotenie = 16 týždňov v útulku	4	12
10 hodnotenie = 18 týždňov v útulku	2	8
11 hodnotenie = 20 týždňov v útulku	1	6
12 hodnotenie = 22 týždňov v útulku	2	5
13 hodnotenie = 24 týždňov v útulku	0	3
14 hodnotenie = 26 týždňov v útulku	3	3

Tabuľka č. 3. Sledovaná populácia – charakteristika (pohlavie, vek, plemeno).

	n	%
pohlavie		
samce	87	39,5
samice	133	60,5
vek		
≤ 6 mesiacov	112	50,9
6 < x ≤ 12 mesiacov	41	18,6
1 < x ≤ 8 rokov	59	26,8
> 6 rokov	8	3,6
plemenná príslušnosť		
domáca krátkosrstá	188	85,5
domáca dlhosrstá	8	3,6
čistokrvná	24	10,9

Výsledky hodnotenia zdravotného stavu mačiek pri prijatí do útulku

Z celkového počtu 220 mačiek, malo pri prijatí zhoršený stav (známka 2 a horšia, udelená v aspoň jednom z indikátorov, resp. známka 1,2,3,4 u indikátora BCS) 120 zvierat (54,5%), 100 mačiek (45,5%) bolo pri prijatí v optimálnom stave (získalo vo všetkých indikátoroch známku 1, resp. 3 v prípade indikátora BCS).

Tabuľka č. 4 a č. 5 podáva informácie o stave mačiek pri prijatí do útulku v jednotlivých zdravotných indikátoroch. Vo všetkých indikátoroch sa počet mačiek s nezmenenou známkou pri prijatí (známka 1, resp. známka 3 u indikátora BCS) štatisticky

významne líšil ($P = 0,0000$) od počtu mačiek, ktoré mali pri prijatí do útulku zhoršenú známku (známku 2 až 5 resp. známku 1,2,4,5 u indikátora BCS).

Tabuľka č. 4. Počet mačiek so zmenenou a nezmenenou známkou po prijatí do útulku v jednotlivých zdravotných indikátoroch.

indikátor	neoptimálne skóre pri prijatí (%) *	optimálne skóre pri prijatí (%) **
BCS	83 (37.7)	137 (62.3)
viditeľnosť tretieho viečka	11 (5.0)	209 (95.0)
výtok z oka	38 (17.3)	182 (82.7)
iritácia oka	25 (11.4)	195 (88.6)
výtok z nosa	15 (6.8)	205 (93.2)
prítomnosť patologických zvukov	23 (10.5)	197 (89.5)
kondícia srsti	33 (15.0)	187 (85.0)
abnormálny postoj a krívanie	12 (5.5)	208 (94.5)

*neoptimálne skóre=známka 2-5, v prípade indikátora BCS známka 1,2,4,5

**optimálne skóre= známka 1, v prípade indikátora BCS známka 3

Tabuľka č. 5. Počet mačiek, ktoré získali konkrétne známky v jednotlivých indikátoroch pri prijatí do útulku.

indikátor	počet mačiek v individuálnych známkach pri prijatí do útulku				
	skóre 1	skóre 2	skóre 3	skóre 4	skóre 5
BCS	2 (0,9 %)	60 (27,3 %)	137 (62,3 %)	20 (9,1 %)	1 (0,5 %)
viditeľnosť tretieho viečka	209 (95,0 %)	9 (4,1 %)	1 (0,5 %)	0 (0 %)	1 (0,5 %)
výtok z oka	182 (82,7 %)	25 (11,4 %)	7 (3,2 %)	5 (2,3 %)	1 (0,5 %)
iritácia oka	195 (88,6 %)	15 (6,8 %)	6 (2,7 %)	2 (0,9 %)	2 (0,9 %)
výtok z nosa	205 (93,2 %)	10 (4,5 %)	4 (1,8 %)	1 (0,5 %)	0 (0 %)
prítomnosť patologických zvukov	197 (89,5 %)	12 (5,5 %)	10 (4,5 %)	1 (0,5 %)	0 (0 %)
kondícia srsti	187 (85,0 %)	15 (6,8 %)	17 (7,7 %)	1 (0,5 %)	0 (0 %)
abnormálny postoj a krívanie	208 (94,5 %)	4 (1,8 %)	2 (0,9 %)	2 (0,9 %)	4 (1,8 %)

Výsledky hodnotenia vývoja zdravotných indikátorov počas pobytu mačiek v útulku

Zhoršenie známky počas pobytu v útulku v aspoň jednom z indikátorov bolo zaznamenané u 52 (41,6%) zo 125 mačiek (mačky hodnotené minimálne 2 krát a zároveň tie, ktoré ukončili svoj pobyt v útulku v priebehu monitoringu). Naopak u 37 mačiek (29,6%) nedošlo počas pobytu k žiadnej zmene známky vo všetkých indikátoroch oproti známke, ktorá im bola udelená pri prijatí. 33 mačiek z 37 si počas celého pobytu vo všetkých indikátoroch udržalo optimálnu známku (známku 3 v indikátore BCS a známku 1 v ostatných indikátoroch).

Zo 125 mačiek ohodnotených minimálne 2 krát a zároveň tých, ktoré ukončili svoj pobyt v útulku počas monitoringu, bolo pri poslednom hodnotení v ideálnom stave (vo všetkých indikátoroch udelená známka 1, resp. 3 u indikátora BCS) 66 zvierat (52,8%), 59 zvierat (47,2%) získalo známku 2 alebo horšiu (resp. známku 1,2,4,5 v indikátore BCS) v aspoň jednom z indikátorov; významný rozdiel medzi počtom mačiek v optimálnom stave a zhoršenom stave teda nebol zaznamenaný ($P=0,4479$). Rovnako nebol zaznamenaný významný rozdiel ($P=0,1286$) pri porovnaní počtu mačiek, ktoré pri prijíme získali optimálnu známku ($n=53$) a mačiek, ktorých stav bol optimálny pri poslednom hodnotení ($n=66$) a pri porovnaní počtu mačiek, ktorých stav bol zhoršený na začiatku ($n=72$) a na konci pobytu ($n=59$). Počet mačiek, u ktorých sa známka zmenila (zlepšila/zhoršila), resp. nezmenila počas

pobytu v útulku v jednotlivých indikátoroch, sumarizuje tabuľka č. 6. Do hodnotenia boli zahrnuté iba mačky, ktoré boli hodnotené minimálne 2x. Z hodnotenia boli vylúčené mačky, ktoré svoj pobyt v útulku neukončili do momentu ukončenia zberu dát.

Porovnanie známok, ktoré boli mačkám udelené pri prijatí a pri poslednom hodnotení v útulku pred ukončením pobytu v jednotlivých indikátoroch, priemerné začiatkové a posledné známky v jednotlivých indikátoroch a celková priemerná známka sú zhrnuté v tabuľke č. 7.

Tabuľka č. 7. Porovnanie známok udelených mačkám pri prijatí a ukončení pobytu v útulku v jednotlivých indikátoroch.

indikátor	*priemerná známka pri prijatí do útulku ^a	*Priemerná známka pri ukončení pobytu v útulku ^b	P-hodnota ^{ab}
BCS	2,752	2,928	0,0093
viditeľnosť tretieho viečka	1,056	1,032	>0,05
výtok z oka	1,344	1,248	>0,05
iritácia oka	1,280	1,128	>0,05
výtok z nosa	1,128	1,072	>0,05
prítomnosť patologických zvukov	1,216	1,080	>0,05
kondícia srsti	1,288	1,112	0,0451
abnormálny postoj a krívanie	1,168	1,088	>0,05
celková súhrnná známka**	1,404	1,336	>0,05

* vypočítané zo zvierat, ktoré boli hodnotené minimálne 2 krát; vylúčené boli zvieratá hodnotené iba raz a zvieratá, ktoré v útulku zostali

** celková súhrnná známka = vypočítané ako priemerná známka zo známok získaných vo všetkých indikátoroch

S predlžujúcou sa dobou pobytu v útulku dochádzalo k zhoršovaniu stavu mačiek v niektorých indikátoroch; korelácie priemerných známok mačiek vypočítaných zo všetkých hodnotení v jednotlivých indikátoroch a dĺžok pobytu v útulku sú sumarizované v tabuľke č. 8. Korelácie priemerných známok medzi indikátormi sú uvedené v tabuľke č. 9.

Tabuľka č. 8. Korelácie dĺžok pobytu a priemerných známok mačiek v jednotlivých indikátoroch.

indikátor	Spearmanov korelačný koeficient	P-hodnota
BCS	-0,1187	>0,05
viditeľnosť tretieho viečka	0,0767	>0,05
výtok z oka	0,2771	0,0001
iritácia oka	0,3211	0,0000
výtok z nosa	0,1947	0,0053
prítomnosť patologických zvukov	0,2080	0,0028
kondícia srsti	0,1005	>0,05
abnormálny postoj a krívanie	0,2329	0,0008

Tabuľka č. 6. Počet mačiek, ktorým sa známka v jednotlivých indikátoroch zmenila (zhoršila alebo zlepšila; najprv zhoršila a potom zlepšila alebo najprv zlepšila a potom zhoršila) alebo nezmenila kedykoľvek počas pobytu v útulku.

indikátor	* nezmenené skóre (%) ^A	**zmena skóre (%) ^B	<i>P</i> -hodnota ^{AB}	& zlepšenie skóre (%) ^C	#zhoršenie skóre (%) ^D	<i>P</i> -hodnota ^{CD}	^a zlepšenie a následné zhoršenie skóre (%) ^E	^b zhoršenie a následné zlepšenie skóre (%) ^F	<i>P</i> -hodnota ^{EF}
BCS	73 (58,4)	52 (41,6)	0,0114	30 (2,0)	10 (8,0)	0,0010	7 (5,6)	5 (4,0)	>0,05
	2 (4), 3 (63), 4 (6)								
viditeľnosť tretieho viečka	117 (93,6)	8 (6,4)	0,0000	3 (2,4)	2 (1,6)	>0,05	1 (0,8)	2 (1,6)	>0,05
	1 (116), 2 (1)								
výtok z oka	88 (70,4)	37 (29,6)	0,0000	14 (11,2)	6 (4,8)	>0,05	2 (1,6)	15 (12,0)	0,0026
	1 (83), 2 (4), 3 (1)								
iritácia oka	98 (78,4)	27 (21,6)	0,0000	13 (10,4)	4 (3,2)	0,0445	2 (1,6)	8 (6,4)	>0,05
	1 (93), 2 (5)								
výtok z nosa	108 (86,4)	17 (13,6)	0,0000	6 (4,8)	3 (2,4)	>0,05	3 (2,4)	5 (4,0)	>0,05
	1 (106), 2 (2)								
prítomnosť patologických zvukov	102 (81,6)	23 (18,4)	0,0000	11 (8,8)	2 (1,6)	0,0227	3 (2,4)	7 (5,6)	>0,05
	1 (100), 2 (2)								
kondícia srsti	102 (81,6)	23 (18,4)	0,0000	18 (14,4)	4 (3,2)	0,0037	0 (0,0)	1 (0,8)	>0,05
	1 (98), 2 (3), 3 (1)								
abnormálny postoj a krívanie	119 (95,2)	6 (4,8)	0,0000	5 (4,0)	1 (0,8)	>0,05	0 (0,0)	0 (0,0)	>0,05
	1 (117), 2 (1), 5 (1)								

*počet mačiek, ktorým sa známka počas celého pobytu v útulku nezmenila; známka zostala rovnaká počas celého pobytu,

**počet mačiek, ktorým sa známka počas celého pobytu v útulku zmenila kedykoľvek počas pobytu oproti známke pri prijatí,

& počet mačiek, ktorým sa známka počas celého pobytu v útulku zlepšila, # počet mačiek, ktorým sa známka počas celého pobytu v útulku zhoršila,

^a počet mačiek, ktorým sa známka počas celého pobytu v útulku najprv zlepšila a potom zhoršila, ^b počet mačiek, ktorým sa známka počas celého pobytu v útulku najprv zhoršila a potom zlepšila

Tabuľka č. 9. Korelácie priemerných známk jednotlivých indikátorov (Spearmanov korelačný koeficient a *P*- hodnoty).

indikátor	viditeľnosť tretieho viečka	výtok z oka	iritácia oka	výtok z nosa	prítomnosť patologických zvukov	kondícia srsti	abnormálny postoj a krívanie
BCS	$r_s = -0,506$ $P > 0,05$	$r_s = -0,0094$ $P > 0,05$	$r_s = 0,0128$ $P > 0,05$	$r_s = -0,0261$ $P > 0,05$	$r_s = 0,0078$ $P > 0,05$	$r_s = -0,2137$ $P = 0,002$ 0	$r_s = 0,0670$ $P > 0,05$
viditeľnosť tretieho viečka	-	$r_s = 0,3609$ $P = 0,0000$	$r_s = 0,3233$ $P = 0,0000$	$r_s = 0,3359$ $P = 0,0000$	$r_s = 0,1018$ $P > 0,05$	$r_s = 0,171$ 2 $P = 0,013$ 7	$r_s = 0,0520$ $P > 0,05$
výtok z oka	-	-	$r_s = 0,6614$ $P = 0,0000$	$r_s = 0,4702$ $P = 0,0000$	$r_s = 0,3733$ $P = 0,0000$	$r_s = 0,208$ 2 $P = 0,002$ 6	$r_s = 0,0955$ $P > 0,05$
iritácia oka	-	-	-	$r_s = 0,3359$ $P = 0,0000$	$r_s = 0,3743$ $P = 0,0000$	$r_s = 0,134$ 4 $P > 0,05$	$r_s = 0,0402$ $P > 0,05$
výtok z nosa	-	-	-	-	$r_s = 0,5326$ $P = 0,0000$	$r_s = 0,044$ 9 $P > 0,05$	$r_s = 0,0817$ $P > 0,05$
prítomnosť patologických zvukov	-	-	-	-	-	$r_s = 0,155$ 1 $P = 0,025$ 7	$r_s = 0,0579$ $P > 0,05$
kondícia srsti	-	-	-	-	-	-	$r_s = 0,0743$ $P > 0,05$
abnormálny postoj a krívanie							

Vývoj priemerných známk počas pobytu v útulku, ktoré získali mačky v jednotlivých indikátoroch a počet mačiek, ktoré mali v jednotlivých hodnoteniach zhoršenú známku je sumarizovaný v tabuľke č. 10.

V indikátore BCS boli známky mačiek pri prijatí významne nižšie ako v 14. týždni ($P = 0,0463$), 16. týždni ($P = 0,0487$) a 18. týždni ($P = 0,0409$). V indikátore výtok z oka boli známky v 6. týždni ($P = 0,0450$), v 24. týždni ($P = 0,0429$) a 26. týždni ($P = 0,0429$) významne vyššie ako pri prijatí. Významne vyššie boli známky v 24. a 26. týždni oproti prijatiu ($P = 0,0061$) v indikátore iritácia oka. Znáмка v 4. týždni bola významne nižšia ako pri prijatí ($P = 0,0489$) v indikátore kvalita srsti. V indikátore abnormálny postoj a krívanie sa mačkám oproti prijatiu zvýšila známka významne v 18. týždni ($P = 0,0241$), 20. týždni ($P = 0,0053$), 24. týždni ($P = 0,0332$) a 26. týždni ($P = 0,0332$).

Tabuľka č. 10. Zmeny priemerných známok udelených mačkám počas sledovaného obdobia v jednotlivých indikátoroch a počty mačiek, ktoré mali v jednotlivých hodnoteniach zhoršené známky.

	0 týždňov (220 ohodnote ných mačiek)	2 týždne (138 ohodnote ných mačiek)	4 týždne (95 ohodnoten ých mačiek)	6 týždňov (56 ohodnote ných mačiek)	8 týždňov (33 ohodnote ných mačiek)	10 týždňov (25 ohodnote ných mačiek)	12 týždňov (18 ohodnote ných mačiek)	14 týždňov (13 ohodnote ných mačiek)	16 týždňov (12 ohodnote ných mačiek)	18 týždňov (8 ohodnote ných mačiek)	20 týždňov (6 ohodnote ných mačiek)	22 týždňov (5 ohodnote ných mačiek)	24 týždňov (3 ohodnote né mačky)	26 týždňov (3 ohodnote né mačky)
BCS (priemerné skóre)	2,809	2,870	2,905	2,893	2,939	2,880	3,056	3,154	3,167	3,250	3,167	3,200	3,333	3,333
*suboptimálne skóre (%)	83 (37,7)	36 (26,1)	14 (14,7)	11 (19,6)	9 (27,3)	6 (24,0)	3 (16,6)	4 (30,7)	4 (33,3)	2 (25,0)	1 (16,6)	1 (20,0)	1 (33,3)	1 (33,3)
viditeľnosť tretieho viečka (priemerné skóre)	1,068	1,051	1,063	1,036	1,061	1,040	1,056	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
*suboptimálne skóre (%)	11 (5,0)	4 (2,9)	5 (5,2)	2 (3,6)	2 (6,1)	1 (4,0)	1 (5,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
výtok z oka (priemerné skóre)	1,264	1,275	1,232	1,357	1,303	1,200	1,167	1,231	1,333	1,375	1,167	1,400	1,667	1,667
*suboptimálne skóre (%)	38 (17,3)	29 (21,0)	18 (18,9)	17 (30,4)	10 (30,3)	5 (20,0)	3 (16,7)	3 (23,1)	4 (33,3)	2 (25,0)	1 (16,7)	2 (40,0)	2 (66,7)	2 (66,7)
iritácia oka (priemerné skóre)	1,186	1,174	1,147	1,214	1,273	1,280	1,222	1,308	1,167	1,375	1,167	1,400	1,667	1,667
*suboptimálne skóre (%)	25(11,4)	20 (14,5)	13 (13,7)	11 (19,6)	8 (24,2)	6 (24,0)	4 (22,2)	4 (30,8)	2 (16,7)	2 (25,0)	1 (16,7)	2 (40,0)	2 (66,7)	2 (66,7)
výtok z nosa (priemerné skóre)	1,095	1,094	1,095	1,054	1,030	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,333
*suboptimálne skóre (%)	15 (6,8)	11 (8,0)	9 (9,5)	2 (3,6)	1 (3,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (33,3)
prítomnosť patologických zvukov (priemerné skóre)	1,159	1,116	1,137	1,214	1,121	1,080	1,056	1,000	1,000	1,000	1,167	1,000	1,000	1,000

*suboptimálne skóre (%)	23 (10,5)	13 (9,4)	13 (13,7)	8 (14,3)	4 (12,1)	2 (8,0)	1 (5,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
lvalita srsti (priemerné skóre)	1,236	1,181	1,084	1,089	1,030	1,040	1,056	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
*suboptimálne skóre (%)	33 (15,0)	19 (13,8)	7 (7,4)	5 (8,9)	1 (3,0)	1 (4,0)	1 (5,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
abnormálny postoj a krívanie (priemerné skóre)	1,136	1,167	1,221	1,232	1,273	1,320	1,278	1,385	1,417	1,625	1,833	1,800	2,333	2,333
*suboptimálne skóre (%)	12 (5,5)	10 (7,2)	9 (9,5)	6 (10,7)	4 (12,1)	3 (12,0)	2 (11,1)	2 (15,4)	2 (16,7)	2 (25,0)	2 (33,3)	1 (20,0)	1 (33,3)	1 (33,3)

*suboptimálne skóre (%) = počet mačiek, ktoré boli ohodnotené známkou inou ako 1 resp. 3 v prípade BCS

Diskusia

K zhodnoteniu výskytu a intenzity vplyvov, ktoré môžu mať negatívny dopad na welfare zvierat je možné použiť rôzne ukazovatele; hodnotenie sa dnes zväčša orientuje na použitie parametrov fyzického a psychického zdravia (na tzv. animal – based indikátory) (Arhant et al., 2015). Hoci ucelený, validný nástroj pre hodnotenie welfare mačiek v útulku, z ktorého by bolo možné pri zostavení protokolu vychádzať, nie je momentálne k dispozícii (Vojtkovská et al., 2020), bolo použitie rôznych zdravotne orientovaných ukazovateľov (najčastejšie BCS, indikátor kvality srsti a príznakov výskytu horných dýchacích ciest) študované a opísané v publikáciách hodnotiacich kvalitu života mačiek v rôznych kontextoch (Scott et al., 2002; Tanaka et al., 2012; Arhant et al., 2015; German et al., 2017; Gilhofer et al., 2019; Zito et al., 2019). V tejto štúdii sme sa zamerali na zaznamenávanie zmien v 8 zdravotne orientovaných indikátoroch welfare (BCS, viditeľnosť tretieho viečka, výtok z oka, iritácia oka, nose výtok z nosa, prítomnosť patologických zvukov, kvalita srsti, abnormálny postoj a krívanie) u skupinovo ustajnených mačiek v no-kill útulku pomocou 5 bodovej hodnotiacej stupnice.

Z našich výsledkov vyplýva, že viac ako polovica zvierat nebola pri prijatí do útulku v optimálnom stave. Zo všetkých indikátorov, bol najväčší počet mačiek v zhoršenom stave zistený v indikátore BCS – 28,2% prijatých mačiek bolo podvyživených, 9,1% mačiek malo naopak miernu nadváhu. Optimálny BCS malo 62,3% mačiek, čo je podobný výsledok ako ten, ktorý vo svojej štúdii opísali Marston a Bennett (2009) – 70,6 % mačiek prijatých do útulku bolo v optimálnej kondícii. Tanaka et al. (2012) zaznamenali pokles váhy u 62% mačiek v priebehu 2. týždňa v útulku; toto zistenie sa nepotvrdilo v našom prípade – naopak v druhom týždni bolo oproti prijatiu zaznamenané zvýšenie priemernej známky BCS. Presné určovanie telesnej hmotnosti však v našom prípade na rozdiel štúdie od Tanaka et al. (2012), neprebiehala, subtílné zmeny telesnej hmotnosti teda vzhľadom na zvolenú metodiku (5 bodovú hodnotiacu stupnicu BCS) nebolo možné monitorovať. Aby bolo možné zmenu danou stupnicou zaznamenať, muselo u mačiek dôjsť k zmene množstva telesného tuku asi o 7%, keďže približne toto percento reprezentuje rozdiel medzi jednotlivými stupňami (Shoveller et al., 2014). Štatisticky významné zvýšenie bolo zaznamenané pri porovnaní známok, ktoré získali mačky pri prvom a poslednom hodnotení pred ukončením pobytu v útulku, čo naznačuje výrazné zlepšenie fyzickej kondície mačiek. Na druhej strane však v priebehu pobytu došlo k trvalému zhoršeniu telesnej kondície u 8% mačiek, u ďalších 9,6% mačiek došlo k prechodnej zmene telesnej hmotnosti – najprv teda k zlepšeniu a následne k zhoršeniu stavu, alebo naopak. U zvierat ustajnených v skupine môže byť monitoring, či každá mačka prijala dostatočné množstvo potravy problematické; počet zdrojov (v tomto prípade misiek s potravou) sa odporúča prispôbiť počtu mačiek plus poskytnúť jeden navyše (pravidlo $n+1$, kde n predstavuje počet mačiek) (Westropp & Buffington, 2004). V útulku, kde zber dát prebiehal nebolo toto odporúčanie uplatnené. K ďalším faktorom negatívne ovplyvňujúcim príjem potravy môže patriť prítomnosť pasívnej agresivity medzi jedincami, kedy dochádza k situácii, že si zvieratá navzájom bránia v prístupe k zdrojom (Vojtkovská et al. 2020); tie je teda nutné rozmiestniť na rôzne stanovištia v rámci ustajňovacej jednotky. V nami vybranom útulku mali zvieratá k dispozícii 5 miest, na ktorých sa vždy nachádzali misky so suchou potravou, mokrá potrava bola mačkám poskytovaná na ďalších 5 stanovištiach 2 krát denne. V zariadeniach, kde nie je distribúcia rozdielnych typov potravy rovnomerná môže dôjsť k odlišnostiam v stavbe krmenej dávky u zvierat, ktoré sa k zdroju dostanú vždy a u zvierat, ktoré k nemu majú obmedzený alebo žiadny prístup keďže im v ňom bránia iné jedince. Nie iba sociálne konflikty ale stres vo všeobecnosti súvisí so zníženým príjmom potravy u mačiek (Stella et al., 2013). U väčšiny zvierat však dochádza k jeho znižovaniu s predlžujúcim sa pobytom v útulku (mačky sa na prostredie útulku adaptujú zvyčajne v priebehu 2-5 týždňov) (Kessler and Turner, 1999). Domnievame sa, že stres vyvolaný umiestnením do nového prostredia, mohol hrať úlohu u tých zvierat, u ktorých došlo k zhoršeniu fyzickej kondície prvých pár týždňov po prijatí do útulku, pravdepodobne už ale nehral významnú rolu u tých zvierat, u ktorých sa objavilo zhoršenie stavu po týždňoch pobytu (teda zvierat u ktorých sa predpokladá vyšší stupeň adaptácie na prostredie ako u práve prijatých mačiek). Na druhej strane, mačky vnímajú a reagujú na stresujúce stimuly veľmi

odlišne (Stella and Croney, 2019); v prípade pôsobenia chronického stresu sa zmena vo fyzickej kondícii môže prejavíť až po dlhšom čase. Zníženie hmotnosti môže byť okrem stresu a neadekvátnej výživy spôsobené i zdravotnými problémami, napr. výskytom infekcie horných dýchacích ciest (URTD), ktorá predstavuje častý zdravotný problém objavujúci sa u mačiek v útulkoch (Bannasch and Foley, 2005), prejavujúci sa dobre pozorovateľným komplexom príznakov (zvyčajne zahŕňajúcich výtok z oka, z nosa a prítomnosť patologických zvukov spojených s dýchaním). Korelácia medzi priemernými známkami BCS a priemernými známkami v indikátoroch výtok z nosa, iritácia oka, výtok z nosa, prítomnosť patologických zvukov sa ale nepotvrdila, hoci u niektorých zvierat sa zníženie skóre BCS vyskytlo súčasne so zvýšením skóre v zmienených indikátoroch. Tento výsledok sa zhoduje so zisteniami Tanaka et al. (2012); autori zmienujú, že zníženie hmotnosti nebolo priamo spojené s rozvojom URTD, hoci tendencia rozvoja URTD bola u mačiek s vysokou úrovňou stresu, ktorá spôsobila zníženie príjmu potravy, 5,6 krát vyššia ako u mačiek s nízkou úrovňou stresu.

Stres predstavuje rizikový faktor k rozvoju infekcie, pretože môže inhibovať produkciu protilátok slizníc, najmä imunoglobulínu A (S-IgA) (Gourkow et al., 2014). Medzi pôvodcov spôsobujúcich URTD patrí najčastejšie felinný kalicivírus (FCV) a felinný herpesvírus-1 (FHV-1), *Bordetella bronchiseptica*, *Chlamydomphila felis* a *Mycoplasma species* sa uplatňujú v menšej miere (kniha útulky). Indikátory výtok z oka, iritácia oka, výtok z nosa, prítomnosť patologických zvukov boli zahrnuté do hodnotiaceho protokolu pretože predstavovali najbežnejšie spozorované príznaky u mačiek v útulku. Spomedzi týchto indikátorov, vykazoval pri prijatí do útulku najväčší počet mačiek výtok z oka (zaznamenaný bol u 17,3% mačiek). Trend zmien priemerných známok v indikátoroch iritácia oka, výtok z nosa, prítomnosť patologických zvukov naznačuje mierne zlepšenie stavu do dvoch týždňov od prijatia, čo mohlo byť spôsobené umiestnením jedincov po prijatí do karantény, kde prebiehala liečba zvierat, ktoré vykazovali príznaky ochorenia. Po absolvovaní karantény boli jedince zaradené do skupiny medzi ostatné mačky. Hoci očkovanie mačiek proti kaliciviróze a herpesvírusu v útulku prebiehalo rutinne, je nutné brať do úvahy, že v prípade herpesvírusu nie je vakcinácia schopná ochrániť mačku pred infekciou virulentného kmeňa vírusu (Day et al., 2016); platí, že vírus prechádza do latentnej formy a môže byť reaktivovaný v období stresu. Reaktivovaný vírus teda môže vyvolať klinické príznaky i u vakcinovaných zvierat alebo byť vylučovaný. Očkovanie proti kaliciviróze nezabráni infekcii, hoci v mnohých prípadoch dokáže zmierniť závažné príznaky. Existencia mnohých kmeňov kalicivírusu bola potvrdená (Radford et al., 1998), s mierne prebiehajúcim ochorením sa preto môžeme stretnúť i u vakcinovaných zvierat. Keďže medzi mačkami v skupine dochádza k priamemu fyzickému kontaktu, zdieľaniu spoločných priestorov, toaliet, misiek na potravu a vodu je prenos infekcií veľmi pravdepodobný. Bolo zistené, že iba 4 % mačiek vylučuje herpesvírus pri príchode do útulku; po týždni sa jeho vylučovanie zistilo až u 52 % mačiek, v prípade kalicivírusu u 15 % mačiek (Pedersen et al., 2004). K zhoršeniu stavu v indikátoroch viažucich sa na URTD došlo v priebehu pobytu v útulku u 8,8 – 18,4 % mačiek v závislosti od indikátora (najväčší počet mačiek, u ktorých došlo k zhoršeniu známky bol zaznamenaný u indikátora výtok z oka, najmenší u indikátora výtok z nosa), čo naznačuje trend vzájomného prenosu a rozvoja infekcie v nami sledovanej populácii.

Viditeľnosť tretieho viečka nie je u mačiek fyziologická; zvyčajne sa objavuje z dôvodu výskytu očného, neurologického alebo systémového ochorenia (Mitchell, 2012); abnormálna protrúzia sa môže prejavíť na oboch alebo iba na jednom oku. Zatiaľ čo očný problém sa zvyčajne vyskytuje na jednom z očí, sa systémové ochorenie zvyčajne prejaví na oboch očiach. Viditeľnosť tretieho viečka môže byť subtílnym ukazovateľom zhoršeného stavu u mačiek - môže sa vyskytnúť napr. v súvislosti so zníženom hmotnosti alebo dehydratáciou (Mitchell, 2012), čo sa však v našom prípade nepotvrdilo (korelácia medzi viditeľnosťou tretieho viečka a BCS nebola zistená). Podobne ako predchádzajúce indikátory, sa však môže i tento príznak viazať k výskytu URTD – tretie viečko môže byť viditeľné z dôvodu zápalu očných spojiviek (Stiles, 2014); korelácia medzi viditeľnosťou tretieho viečka a príznakmi URTD (výtok z oka, iritácia oka a výtok z nosa) sa v našej štúdii potvrdila. Viditeľnosť očného viečka sa objavila u 11 prijatých mačiek do útulku, u 9 mačiek bola spozorovaná mierna viditeľnosť, u 1 mačky stredná viditeľnosť. U 1 mačky bol zaznamenané úplné prekrytie oka –

táto mačka uhynula v dôsledku kalicivirózy. U 1 mačky nebola zaznamenaná zmena skóre v priebehu pobytu v útulku, u 3 mačiek došlo k trvalému zlepšeniu skóre, u 2 mačiek k trvalému zhoršeniu; u 3 mačiek došlo k prechodnému zlepšeniu resp. zhoršeniu. Zvyšné dve mačky umreli na kalicivirózu krátko pred druhým hodnotením. Príčinou objavenia sa tretieho viečka bola u väčšiny mačiek URTD, u jednej mačky sa spoločne s viditeľnosťou tretieho viečka objavili nešpecifické príznaky ako apatia a zvracanie, u inej bolo príčinou ochorenie oka. Tretie viečko sa tiež objavilo u mačky, ktorej bola diagnostikovaná vlhká forma infekčnej peritonitídy.

Stav srsti môže byť ovplyvnený radom faktorov – kvalitou potravy, chronickým ochorením, výskytom sociálnych konfliktov a zmenami normálneho správania – nedostatočnou alebo naopak prehnanou starostlivosťou o srst' (Little, 2012). Veľkosť skupiny sa zdá byť prepojená s kvalitou srsti mačiek, súvislosť bola naznačená v rámci štúdie v útulku (Arhant et al., 2015) i v kontexte hodnotenia welfare ferálnych mačiek v kolóniách (Gilhofer et al., 2019). Súvislosť dlhšej doby pobytu v útulku so zvýšením percentom mačiek, u ktorých sa objavila zhoršená kvalita srsti, popísali Arhant et al., (2015); v našej štúdii sa však korelácia medzi kvalitou srsti a dĺžkou pobytu v útulku nepotvrdila. Len 15 % (n=33) zvierat nemalo pri prijatí optimálny stav srsti; viac ako polovici z týchto mačiek bolo udelené skóre 3. Toto percento je nižšie ako bolo zistené v štúdii od Zito et al. (2019), čo však možno vysvetliť tým, že zmienená štúdia bola zameraná na monitoring ferálnych mačiek, zatiaľ čo do nami vybraného útulku boli prijímané mačky i od súkromných chovateľov. Počet prijatých mačiek od majiteľov je neznámy; ako už bolo zmienené, informácie o pôvode mačiek databáza útulku neobsahovala. U väčšiny mačiek, ktoré boli do útulku prijaté so zníženým skóre sa však kvalita srsti zlepšila, zistený bol významný pokles pri porovnaní známok udelených mačkám na pri prvom a poslednom hodnotení. Toto zistenie môže reflektovať príjem kvalitnej potravy, poukazovať na adekvátnu veterinárnu starostlivosť v útulku (aplikácia antiparazitárnych prípravkov, liečba ďalších problémov súvisiacich so stavom srsti a kože), no i na malý výskyt vážnych sociálnych konfliktov v skupine. Hoci sledovanie interakcií medzi mačkami nebolo predmetom našej štúdie, v priebehu monitoringu neboli v populácii zjavné výrazné konflikty vedúce k priamemu boju, ktorých dôsledkom by bolo poškodenie povrchu kože. K trvalému zhoršeniu kvality srsti z iných príčin ale došlo v priebehu pobytu v útulku u 4 mačiek, k prechodnému zhoršeniu u 1 mačky. U všetkých 5 mačiek sa súčasne so zhoršenou kvalitou srsti vyskytli i iné zdravotné problémy – URTD a nešpecifické príznaky ako hnačka a apatia. Korelácia kvality srsti s výtokom z oka, s prítomnosťou patologických zvukov a s viditeľnosťou tretieho viečka sa potvrdila; podobnú súvislosť naznačuje aj štúdia od Gilhofer et al. (2019), kde sa u polovice mačiek so zhoršenou kvalitou srsti vyskytovali i príznaky URTD.

Abnormálny postoj a krívanie bol ďalším zo sledovaných indikátorov; väčšina mačiek (94,5 %) prijatých do útulku nevykazovala známky zhoršenia pohyblivosti. U takmer všetkých mačiek, ktorých skóre bolo pri prijatí zhoršené (teda iné ako 1) sa stav zlepšil, čo bolo výsledkom nasadenia liečby resp. chirurgického ošetrenia po prijatí (príčinou problémov s pohyblivosťou boli zväčša úrazy). Trvalé zhoršenie stavu bolo zaznamenané iba u jedného zvieratá; šlo o mačku s neurologickými problémami prejavujúcimi sa nekoordinovaným pohybom a abnormálnym postojom. Stav tejto mačky sa v priebehu pobytu v útulku zhoršoval a neskôr uhynula. U dvoch ďalších mačiek sa zhoršený stav pri prijatí, v priebehu pobytu nezmenil - u prvej mačky bol problém s pohyblivosťou spôsobený vrodenou neurologickou vadou, v druhom prípade šlo o ľahké krívanie z dôvodu staršieho zranenia panvovej končatiny. Korelácia medzi indikátorom abnormálny postoj a krívanie a ostatnými indikátormi sa nezistila; podľa TerWee et al. (1997) však existuje súvislosť medzi krívaním a URTD, nakoľko niektoré kmene kalicivírusu môžu u infikovaných mačiek vyvolať bolesťou sprevádzané krívanie. Zistená však bola závislosť medzi abnormálnym postojom a krívaním a dĺžkou pobytu mačky v útulku; mačky so zhoršeným skóre strávili v útulku dlhšiu dobu, čo možno vysvetliť zníženým adopčným potenciálom týchto mačiek. Zdravotný stav zvieratá je jedným z významných faktorov ovplyvňujúcich adopčné preferencie potenciálnych osvojiteľov (Vitulova et al., 2019).

Celkovo došlo v priebehu pobytu v útulku k zhoršeniu stavu v aspoň jednom z indikátorov až u 41,6 % mačiek (n=52); k zmene stavu nedošlo u 29,6 % mačiek (n=37) (mačky, ktoré si od prijmu

až po ukončení pobytu zachovali rovnaké skóre vo všetkých indikátoroch bez ohľadu na to, či bolo optimálne alebo nie), z toho si 33 mačiek zachovalo optimálne známky vo všetkých indikátoroch. Zistený bol kolísavý trend zmien priemerných známok v indikátoroch výtok z oka, iritácia oka, výtok z nosa, prítomnosť patologických zvukov, ktorý potvrdzuje zlepšovanie a zhoršovanie stavu mačiek v priebehu pobytu v útulku. Pri porovnaní celkovej súhrnnej známky mačiek (priemernej známky zo známok získaných vo všetkých indikátoroch pri prvom a poslednom hodnotení) pri prijatí a pred ukončením pobytu v útulku nebol zistený významný rozdiel, hoci pri porovnaní udelených známok pri prijatí a ukončení pobytu v jednotlivých indikátoroch, bolo významné zlepšenie stavu zaznamenané v indikátore BCS a kvalita srsti. Domnievame sa, že toto zistenie do istej miery odráža skladbu indikátorov, ktoré boli do hodnotiaceho protokolu začlenené – 4 indikátory z 8 sa priamo viazali k príznakom URTD. V týchto indikátoroch neboli zmeny v známkach, udelených mačkám na začiatku a na konci hodnotenia významné, čo sa podpísalo na celkovom hodnotení. Niektoré potenciálne vhodné indikátory, ktoré by mohli doplniť celkový obraz o vývoji zdravotného stavu, ale nebolo možné do protokolu zahrnúť, vzhľadom ku ustajneniu mačiek vo veľkej skupine. Medzi významné indikátory viažuce sa k zhoršeniu zdravotného stavu patria napr. ukazovatele súvisiace s elimináciou (hnačka, príznaky ochorenia dolných močových ciest) (German et al., 2017; Westropp et al., 2006). Zvieratá v skupine spoločne zdieľali toalety, čo znemožňuje identifikáciu konkrétnych jedincov s problémom. Navyše, kontrola vybraného jedinca, u ktorého existuje podozrenie na výskyt problému, môže byť značne náročná, keďže mačky často odmietajú eliminovať, keď sú rušené (McGowan et al., 2017) (napr. ak sú pod stálym dohľadom človeka).

Podstatným výsledkom našej štúdie je zistenie pozitívnej korelácie medzi dĺžkou pobytu mačky v útulku a známkami reprezentujúcimi zdravotný stav mačiek. Tento poznatok potvrdzuje teóriu zvyšujúceho sa rizika narušenia welfare pri dlhodobom pobyte zvieratá v útulku (Turner et al., 2012). Ten je typický v zariadeniach, v ktorých nie je možné (z dôvodu dodržania legislatívy alebo z ideologického dôvodu) nechcené, resp. nadbytočné, no inak zdravé zvieratá utratiť. Úsilie útulkov by preto malo byť v čo najväčšej možnej miere orientované na posilňovanie faktorov, ktoré skrátiť pobyt na minimum s výsledkom úspešnej adopcie resp. vrátenia zvieratá pôvodnému majiteľovi. V prípade, že zariadenie nemá z dôvodu nedostatku priestoru možnosť selektovať zvieratá a vytvárať menšie stabilné celky, čo bol i prípad zariadenia v našej štúdii, je ustajnenie veľkého počtu mačiek v skupine rizikovým faktorom prospievajúcim k rozvoju a šíreniu nákaz (Stavisky & Adams, 2018) i napriek dôslednej karanténizácii prijatých jedincov. V Českej republike nie sú do právnych predpisov týkajúcich sa ochrany zvierat a veterinárnej starostlivosti zahrnuté špecifické požiadavky týkajúce sa vybavenia, usporiadania a chodu útulkov, k dispozícii sú iba odporúčania, ktoré však nie sú právne vymáhateľné. Zariadenia teda môžu byť prevádzkované i v priestoroch, ktoré nie sú z nálezového hľadiska optimálne prispôbené pre chod útulku. V zariadení, v ktorom monitoring populácie prebiehal, napríklad nebola karanténna časť útulku úplne oddelená od ostatných priestorov, do ktorých mali mačky mimo karantény prístup, čím sa jej efektívnosť značne stráca. Z hľadiska prežívania patogénov sa zdali problematické i ďalšie časti útulku (napr. nevhodne zvolený, neumývateľný povrch vo voliére alebo zložito členený resp. preplnený vlastný ubytovací priestor, tvorený množstvom úkrytov z rôznych materiálov). Hoci tieto aspekty prostredia naplňujú behaviorálne potreby mačiek a pomáhajú znižovať stres (Van der Leij et al., 2019), na strane druhej, sťažujú sanitáciu a neumožňujú udržiavanie vysokého hygienického štandardu, ktorý je v prípade skupinového ustajnenia veľkého počtu zvierat mimoriadne dôležitý. Patogény sa tak môžu v prostredí vyskytovať dlhodobo napr. v prípade felinného parvovírusu alebo napr. oocýst izospóry aj mesiace až roky (Möstle et al., 2013).

Hoci primárnym cieľom tejto štúdie bolo overiť hypotézu meniaceho sa skóre zdravotného stavu mačiek v útulkoch, počas zberu dát sme mali i možnosť overiť praktickosť 5-bodovej hodnotiacej stupnice. Jej použitie sa v priebehu monitoringu javilo ako výhodné, pretože ňou bolo možné v hodnotení zohľadniť i malé zmeny stavu v danom indikátore. Na druhej strane bol proces rozhodovania sa medzi jednotlivými stupňami občas problematický - to platilo hlavne pre indikátory výtok z oka, iritácia oka a výtok z nosa. Za účelom nastavenia rovnakého počtu stupňov u všetkých

indikátorov, bola u hodnotenia BCS namiesto 9– bodovej, zvolená 5 bodová hodnotiacia stupnica, pretože jej použitie je oproti 9 bodovej stupnici praktickejšie. Na druhej strane sú však rozdiely medzi stupňami väčšie, čo neumožňuje monitoring malých zmien. Celkovou nevýhodou hodnotenia animal-based indikátorov je ich subjektivita (Kessler and Turner, 1997); v našej štúdií hodnotili mačky 2 evaluátori, z ktorých jeden bol priamym zamestnancom útulku. Zapojenie osoby, ktorá je priamo zodpovedná za starostlivosť o zvieratá do hodnotenia, je výhodné, pretože táto osoba má o zmenách stavu u zvierat najlepší prehľad. Účasť ďalších (preškolených no nestranných) osôb je ale potrebná, aby nedochádzalo k skresľovaniu výsledkov.

Limitáciou tejto štúdie je skutočnosť, že sledovanie vplyvu dlhodobého pobytu v útulku na zmeny v zdravotných ukazovateľoch mohlo byť ovplyvnené nízkou počtom mačiek zostávajúcich v útulku dlhšie ako 2 týždne – hoci bolo možné pri prijatí ohodnotiť všetky zvieratá, do porovnávacích analýz bolo možné zahrnúť iba mačky, ktoré boli ohodnotené minimálne 2 krát a viac (teda zvieratá, ktoré strávili v útulku 2 a viac týždňov). Iba 3 mačky zostali v útulku po dobu 26 týždňov (boli ohodnotené 14 krát, čo bol najvyšší počet hodnotení zaznamenaný v našej štúdií); zber dostatočného počtu dát, ktoré by vypovedali o vplyve dlhodobého umiestnenia mačky v útulku na zmeny v indikátoroch môže byť problematický, keďže väčšina zvierat ukončí svoj pobyt v útulku skôr.

Záver

Mačky prijímané do útulkov často vykazujú rôzne známky zhoršeného stavu, v našej štúdií sa to týkalo viac ako polovice prijatých mačiek. V rozpore s možným očakávaním, že zdravotný stav mačiek sa počas pobytu v útulku vzhľadom na zaistenie ošetrovania, veterinárnej starostlivosti, krmiva, tepelného komfortu bude jednoznačne zlepšovať, došlo naopak v priebehu pobytu v útulku k zhoršeniu stavu v aspoň jednom z indikátorov až u 41% mačiek. Podmienky v útulku môžu byť aj napriek zaisteniu základných potrieb pre mačky stresujúce, čo sa môže premietnuť z dlhodobého hľadiska aj do ich zdravotného stavu. Navyše ustajnenie mačiek v jednej veľkej skupine môže byť problematické z pohľadu zabránenia šíreniu nákaz, hoci pri porovnaní priemernej známky udelennej mačkám na začiatku a na konci hodnotenia v indikátoroch viažucich sa k výskytu URTD sa zmena známky štatisticky neprejavila.

Táto štúdia bola finančne podporená projektom ITA VETUNI (Projekt č. 2021ITA22).

Literatúra

- Amat, M., Camps, T., Manteca, X. 2016. Stress in owned cats: behavioral changes and welfare implications. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 18: 577-586. doi: 10.1177/1098612X15590867
- Arhant, C., Troxler, J. 2017. Is there a relationship between attitudes of shelter staff to cats and the cats' approach behavior? *Applied Animal Behaviour Science* 187: 60-68. doi: 10.1016/j.applanim.2016.11.014
- Arhant, C., Wogritsch, R., Troxler, J. 2015. Assessment of behavior and physical condition of shelter cats as animal-based indicators of welfare. *Journal of Veterinary Behavior* 10:399-406. doi: 10.1016/j.jveb.2015.03.006
- Bannasch, M.J., Foley J.E. 2005. Epidemiologic evaluation of multiple respiratory pathogens in cats in animal shelters. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 7: 109-119. doi: 10.1016/j.jfms.2004.07.004
- Barnard, S., Pedernera, C., Candeloro, L., Ferri, N., Velarde, A., Dalla Villa, P. 2016. Development of a new welfare assessment protocol for practical application in long-term dog shelters. *Veterinary Record* 178: 18. doi:10.1136/vr.103336
- Bennett, D., Zainal Ariffin, S.M.B., Johnston P. 2012. Osteoarthritis in the cat: 1. How common is it and how easy to recognize? *Journal of Feline Medicine and Surgery* 14:65-75. doi: 10.1177/1098612X11432828
- Botreau, R., Veissier I., Butterworth, A., Bracke, B.M.B., Keeling, L.J. 2007. Definition of criteria for overall assessment of animal welfare. *Animal Welfare* 16:225–228.

- Carlstead, K., Brown, J.L., Strawn, W. 1993. Behavioral and physiological correlates of stress in laboratory cats. *Applied Animal Behavior Science* 38: 143-158. doi: 10.1016/0168-1591(93)90062-T
- Day, M.J., Horzinek, M.C., Schult, R.D., Squires, R.A. 2016. WSAVA guidelines for the vaccination of dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice* 57: E1. doi: 10.1111/jsap.2_12431
- Finka, L.R, Ellis, S.L, Stavisky, J.A. 2014. Critically appraised topic (CAT) to compare the effects of single and multi-cat housing on physiological and behavioral measures of stress in domestic cats in confined environments. *BMC Veterinary Research* 10: 1-12. doi: 10.1186/1746-6148-10-73
- Foster, S., Ijichi, C. 2017. The association between infrared thermal imagery of core eye temperature, personality, age and housing in cats. *Applied Animal Behavior Science* 189: 79-84. doi: 10.1016/j.applanim.2017.01.004
- German, A.C., Cunliffe, N.A., Morgan, K.L. 2017. Faecal consistency and risk factors for diarrhea and constipation in cats in UK rehoming shelters. *Journal of Feline Medicine Surgery* 19: 57-65. doi:10.1177/1098612X15610370
- Gilhofer, E.M, Windschnurer, I., Troxler, J., Heizmann, V. 2019. Welfare of feral cats and potential influencing factors. *Journal of Veterinary Behavior* 30: 114-123. doi: 10.1016/j.jveb.2018.12.012
- Gourkow, N., Fraser, D. 2006. The effect of housing and handling practices on the welfare, behavior and selection of domestic cats (*Felis silvestris catus*) by adopters in an animal shelter. *Animal Welfare* 15: 371- 377.
- Gourkow, N., LaVoy, A., Dean, G.A., Phillips, C.J. 2014. Associations of behavior with secretory immunoglobulin A and cortisol in domestic cats during their first week in an animal shelter. *Applied Animal Behaviour Science* 150: 55-64. doi: 10.1016/j.applanim.2013.11.006
- Gourkow, N., Lawson, J.H, Hamon, S.C, Phillips, C.J.C. 2013. Descriptive epidemiology of upper respiratory disease and associated risk factors in cats in an animal shelter in coastal western Canada. *Canadian Veterinary Journal* 54: 132-138.
- Gouveia, K., Magalhães, A., De Sousa, L. 2011. The behavior of domestic cats in a shelter: residence time, density and sex ratio. *Applied Animal Behaviour Science* 130: 53-59. doi: 10.1016/j.applanim.2010.12.009
- Kent, M., Platt, S.R., Schatzberg, S.J. 2010. The neurology of balance: function and dysfunction of the vestibular system in dogs and cats. *Veterinary Journal* 185: 247-258. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.10.029
- Kessler, M.R, Turner, D.C. 1999. Socialization and stress in cats (*Felis silvestris catus*) housed singly and in groups in animal shelters. *Animal Welfare* 8:15-26.
- Kessler, M.R, Turner, D.C. 1997. Stress and adaptation of cats (*Felis silvestris catus*) housed singly, in pairs and in groups in boarding catteries. *Animal Welfare* 6: 243-254.
- Kessler, M. R., Turner, D. C. 1999. Effects of density and cage size on stress in domestic cats (*Felis silvestris catus*) housed in animal shelters and boarding catteries. *Animal Welfare*, 8: 259-267.
- Little, S.E. 2012. *The Cat*. Elsevier Saunders. St. Louis.
- Marston, L.C., Bennett, P.C. 2009. Admissions of cats to animal welfare shelters in Melbourne, Australia. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 12: 189-213. doi: 10.1080/10888700902955948
- McGowan, R.T., Ellis, J.J., Bensky, M.K., Martin, F. 2017. The ins and outs of the litter box: A detailed ethogram of cat elimination behavior in two contrasting environments. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 194: 67-78. doi: 10.1016/j.applanim.2017.05.009
- Mitchell, N. 2012. Third eyelid protrusion in dogs and cats. *Veterinary Ireland Journal* 2: 205-209.
- Möstl, K., Egberink, H., Addie, D., Frymus, T., Boucraut-Baralon, C., Truyen, U., Horzinek, M.C. 2013. Prevention of infectious diseases in cat shelters: ABCD guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 15: 546-554. doi: 10.1177/1098612X13489210
- Ottway, D.S., Hawkins, D.M. 2003. Cat housing in rescue shelters: a welfare comparison between communal and discrete-unit housing. *Animal Welfare* 12: 173-189.

- Pedersen, N.C., Sato, R., Foley, J.E., Poland, A.M. 2004. Common virus infections in cats, before and after being placed in shelters, with emphasis on feline enteric coronavirus. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 6: 83-88. doi: 10.1016/j.jfms.2003.08.008
- Pruett, S.B. 2003. Stress and the immune system. *Pathophysiology* 9: 133–153. doi: 10.1016/S0928-4680(03)00003-8
- Radford, A.D., Turner, P.C., Bennett, M., McArdle, F., Dawson, S., Glenn, MA, Williams R,A., Gaskell, R.M. 1998. Quasispecies evolution of hypervariable region of the feline calicivirus capsid gene in cell culture and in persistently infected cats. *Journal of General Virology* 79: 1-10. doi: 10.1099/0022-1317-79-1-1
- Scott, K.C., Levy, J.K., Gorman, S.P., Newell, S.M. 2002. Body condition of feral cats and the effect of neutering. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 5: 203-213. doi: 10.1207/S15327604JAWS0503_04
- Shoveller, A.K, DiGennaro, J., Lanman, C., Spangler, D. 2014. Trained vs untrained evaluator assessment of body condition score as a predictor of percent body fat in adult cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 16: 957-965. doi: 10.1177/1098612X14527472
- Stavisky, J., Adams, W. 2018. Principles of infectious disease and transmission. In: Dean, R., Roberts, M., Stavisky, J. (Eds.): *BSAVA Manual of Canine and Feline Shelter Medicine. Principles of Health and Welfare in a Multi-animal Environment*, British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, pp. 101-111.
- Stella, J., Croney, C., Buffington, T. 2013. Effects of stressors on the behavior and physiology of domestic cats. *Applied Animal Behavior Science* 143: 157-163. doi: 10.1016/j.applanim.2012.10.014
- Stella, J., Croney, C., Buffington, T. 2014. Environmental factors that affect the behavior and welfare of domestic cats (*Felis silvestris catus*) housed in cages. *Applied Animal Behaviour Science* 160: 94-105. doi: 10.1016/j.applanim.2014.08.006
- Stella, J., Croney, C. 2019. Coping styles in the domestic cat (*Felis silvestris catus*) and implications for cat welfare. *Animals* 9: 370. doi: 10.3390/ani9060370
- Stiles, J. 2014. Ocular manifestations of feline viral diseases. *Veterinary Journal* 201: 166-173. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.11.018
- Suchak, M., Lamica, J.A. 2018. Comparison of cats (*Felis silvestris catus*) housed in groups and single cages at a shelter: a retrospective matched cohort study. *Animals* 8: 29. doi: 10.3390/ani8020
- Tanaka, A., Wagner, D.C., Kass, P.H., Hurley, K.F. 2012. Associations among weight loss, stress, and upper respiratory tract infection in shelter cats. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 240: 570-576. doi: 10.2460/javma.240.5.570
- TerWee, J., Lauritzen, A.Y., Sabara, M., Dreier, K.J., Kokjohn, K. 1997. Comparison of the primary signs induced by experimental exposure to either a pneumotrophic or a 'limping' strain of feline calicivirus. *Veterinary Microbiology* 56: 33-45. doi: 10.1016/S0378-1135(96)01344-2
- Turner, P., Berry, J., MacDonald, S. 2012. Animal shelters and animal welfare: raising the bar. *Canadian Veterinary Journal* 53: 893-896.
- Van Der Leij, W.J.R., Selman, L.D.A.M., Vernooij, J.C.M., Vinke, C.M. 2019. The effect of a hiding box on stress levels and body weight in Dutch shelter cats; a randomized controlled trial. *PloS One* 14: e0223492. doi: 10.1371/journal.pone.0223492
- Vitale, K.R, Behnke, A.C., Udell, M.A.R. 2019. Attachment bonds between domestic cats and humans. *Current Biology* 29: R864-R865. doi: 10.1016/j.cub.2019.08.036
- Vitulova, S., Voslarova, E., Vecerek, V., Bedanova, I., Volfova, M. 2019. The health of shelter dogs and its impact on their adoption. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 132: 325-333.
- Vojtkovská, V., Voslářová, E., Večerek, V. 2020. Methods of assessment of the welfare of shelter cats: a review. *Animals* 10: 1527. doi: 10.3390/ani10091527
- Westropp, J.L., Buffington, C.A. 2004. Feline idiopathic cystitis: current understanding of pathophysiology and management. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 34: 1043-1055. doi: 10.1016/j.cvsm.2004.03.002

Westropp, J.L., Kass, P.H., Buffington, C.A.T. 2006. Evaluation of the effects of stress in cats with idiopathic cystitis. *American Journal of Veterinary Research* 67: 731-736. doi:10.2460/ajvr.67.4.731

Zito, S., Walker, J., Gates, M.C., Dale, A. 2019. A preliminary description of companion cat, managed stray cat, and unmanaged stray cat welfare in Auckland, New Zealand using a 5-component assessment scale. *Frontiers in Veterinary Science* 6: 40. doi: 10.3389/fvets.2019.00040

Zmeny sociability mačiek v útulku

Veronika Vojtkovská¹, Eva Voslářová¹, Vladimír Večerek¹, Lenka Tomečková²

¹Ústav ochrany a welfare zvierat a verejného veterinárneho lékařství, FVHE VETUNI, ČR,

²Klinika verejného veterinárneho lékařství a ochrany zvierat, Univerzita veterinárskeho lékařství a farmácie v Košiciach, SR

Abstrakt

Táto štúdia bola realizovaná za účelom dlhodobého monitoringu zmien v sociabilite skupinovo ustajnených mačiek voči ošetrovateľovi v súkromnom útulku. Sociabilita sledovanej populácie mačiek bola hodnotená v dvojtýždňovom intervale v priebehu jedného kalendárneho roka. Celkovo 158 zvierat bolo ohodnotených 5 bodovou stupnicou, ktorej jednotlivé stupne predstavovali úroveň sociability (1-veľmi priateľská mačka až 5-veľmi nepriateľská mačka). Hodnotenie prebiehalo vizuálnym sledovaním reakcie mačiek na priblíženie a kontakt človeka. Pri prvom hodnotení vykazovala viac ako tri štvrtina mačiek (81%) veľmi priateľské (skóre 1) alebo priateľské správanie (skóre 2). Z 88 mačiek, ktoré boli ohodnotenú minimálne dvakrát a zároveň ukončili svoj pobyt v útulku počas monitorovacieho obdobia, nedošlo u 56 mačiek (63,6%) počas pobytu v útulku k žiadnej zmene skóre (k zhoršeniu ani k zlepšeniu). Medzi mačkami, u ktorých bola zaznamenaná zmena, došlo u významne vyššieho počtu mačiek ($P < 0,001$) počas pobytu v útulku k trvalému zlepšeniu skóre ako k jeho trvalému zhoršeniu (26 (29,5%) a 3 (3,4%)). K prechodnému zlepšeniu resp. zhoršeniu skóre došlo u 3 mačiek (3,4%). Zlepšenie skóre sociability počas pobytu v útulku sa týkalo predovšetkým mačiek, ktorých správanie bolo pri prvom hodnotení označené za neutrálne (skóre 3), nepriateľské (skóre 4) alebo veľmi nepriateľské (skóre 5). Dĺžka pobytu v útulku (LOS) korelovala s mierou sociability mačiek pri prvom ($r_{\text{tau}} = 0,72$, $P < 0,001$) i poslednom hodnotení ($r_{\text{tau}} = 0,23$, $P = 0,007$), LOS ale sama nepredikovala mieru sociability ($P > 0,05$). Bolo zistené, že miera sociability pri prvom hodnotení bola prediktorom pre mieru sociability pri poslednom hodnotení ($P < 0,001$). Výsledky našej štúdie naznačujú, že v priebehu pobytu v útulku dochádza u mačiek k zlepšovaniu sociability voči známej osobe. Hoci sa ukazuje, že mačky s nižšou úrovňou sociability zostávajú v útulku dlhšiu dobu, vplyvom zlepšovania môže dochádzať k zvyšovaniu ich adopčného potenciálu. Podpora programov pre zvyšovanie sociability mačiek je potrebná a je vhodné jej venovať pozornosť v ďalšom výskume.

Úvod

Hodnotenie welfare v útulkoch, obzvlášť v tých, kde môžu byť zvieratá vplyvom národných právnych predpisov (napr. v Českej republike, Rakúsku, Taliansku) držané i dlhšie časové obdobie je témou, ktorá priťahuje pozornosť (Arhant et al., 2015). V týchto krajinách nie je možné zvieratá utradiť z dôvodu preplnenia útulku. Zvieratá, ktoré nie sú z útulkov adoptované v krátkom čase, v nich teda môžu zotrvať rôzne dlhú dobu. V rakúskych útulkoch bol medián doby pobytu mačiek v útulku 2 mesiace (Arhant et al., 2011), podobne dlhú dobu strávia v útulku do adopcie i mačky v Českej republike (medián 69 dní) (Kubesová et al., 2017). Bolo však zistené, že až štvrtina mačiek v rakúskych útulkoch zostáva v útulku dlhšie ako jeden rok (Arhant et al., 2011). Dlhší pobyt v útulku sa týka najmä zvierat so zníženým adopčným potenciálom, medzi ktoré možno zaradiť i staršie zvieratá; v Českej republike bol medián dĺžky pobytu mačiek nad 6 rokov až 296 dní (Vojtkovská et al., 2019). Bez ohľadu na dĺžku pobytu, je zvieratám umiestneným v útulku, nevyhnutné zabezpečiť zázemie, v ktorom by negatívne faktory, napr. stres, mali byť minimalizované.

Množstvo predchádzajúcich prác zdokumentovalo súvislosť medzi stresom a umiestnením mačky do útulku (napr. Stella et al., 2011; Tanaka et al., 2012; Vinke et al., 2014). Jedným zo spôsobov ako odhaliť prebiehajúcu stresovú reakciu je stanovenie hladiny špecifických produktov, ktoré sú v organizme prítomné v dôsledku narušenia rovnováhy vnútorného prostredia. Stres je však okrem zmien v hladinách týchto látok zväčša manifestovaný i v behaviorálnej rovine (Stella et al.,

2013). Okrem inhibície normálneho správania, ktoré sa zvyčajne prejavuje znížením frekvencie explorácie prostredia, hravého správania, eliminácie, snahami o útek a ukrytie sa, odmietaním potravy a nedostatočnou starostlivosťou o srst', môže byť indikátorom stresu i absencia alebo negatívna odpoveď na interakciu iniciovanú človekom (Casey and Bradshaw, 2005). U mačiek je dokumentovaná široká variabilita v behaviorálnych prejavoch indikujúcich stres. Odpoveď na stres sa okrem prostredia odvíja i od temperamentu mačky, ktorý je ovplyvnený genetikou, prostredím (Réale and Dingemans, 2012) a rannými skúsenosťami (Amat et al., 2016). Vysoká úroveň stresu môže viesť k nesprávnemu označeniu vystrašenej mačky v útulku, ktorá by za normálnych okolností bola priateľská k neznámym ľuďom, za ferálnu (Slater et al., 2010), v dôsledku čoho môže dôjsť k jej vypusteniu do pôvodného prostredia alebo k eutanázii (v krajinách, kde sú mačky s nízkou šancou na adopciu utrácané).

K testovaniu ochoty kontaktu mačky s človekom sa v súčasnosti uplatňuje viacero prístupov zväčša založených na sledovaní a následnom hodnotení reakcie mačky na človeka na škálach, kde jednotlivé stupne reprezentujú mieru ochoty kontaktu (Kessler and Turner, 1999; Kry and Casey, 2007; Marston and Bennett, 2009; Stella et al., 2014; Arhant and Troxler, 2017). Nakoľko bolo zistené, že u väčšiny mačiek dochádza s predlžujúcim sa pobytom v útulku k redukcii stresu a k navyknutiu si na nové prostredie v priebehu 2 až 5 týždňov (Rochlitz et al., 1998) bol cieľom našej štúdie dlhodobý monitoring zmien v ochote kontaktu s človekom u skupinovo ustajnených mačiek. Je známe, že k výraznej redukcii stresu u mačiek dochádza najmä v prvých dňoch po prijatí do útulku, to znamená v čase, kedy sú zvieratá umiestnené v karanténe. Zaujímalo nás, aký stupeň sociability ale budú zvieratá vykazovať k ošetrovateľovi po čase strávenom v karanténe, počas ktorej si mali možnosť aspoň čiastočne navyknúť na manipuláciu človekom a po zaradení do skupiny medzi ostatné zvieratá a či a do akej miery bude zmena v sociabilite mačiek pokračovať počas ďalšieho časového obdobia stráveného v útulku.

Materiál a metodika

Charakteristika útulku

Za účelom realizácie štúdie a zberu dát bola nadviazaná spolupráca so súkromným útulkom v Českej republike. Zvieratá boli v tomto zariadení ustajnené skupinovo. Kapacita útulku je 25 mačiek – nakoľko zariadenie nedisponuje možnosťou predelenia priestoru a vytvárania menších skupín mačiek, sú všetky zvieratá ustajnené spoločne v 1 veľkej skupine. Výnimku tvoria mačky s mačatami a mačky vo vysokom štádiu gravidity, pre ktoré má útulok vyhradené samostatné priestory. Vybrané zariadenie uplatňuje politiku, ktorá neumožňuje utratiť zvieratá z iných ako zdravotných dôvodov (toto nastavenie vyplýva z národných právnych predpisov na ochranu zvierat v Českej republike). Po prijatí do útulku sú zvieratá umiestnené do karanténnych boxov o veľkosti 40x80x60 cm, v ktorých majú k dispozícii misku na potravu a vodu, pelech a toaletu s podstielkou. Počas trvania karantény sú mačky prehliadnuté zmluvným veterinárnym lekárom a ak to dovoľuje ich vek a zdravotný stav, ošetrované (zaočkované, ošetrované proti vnútorným a vonkajším parazitom a vykastrované). Dĺžka karantény je individuálna u každej mačky, priemerná dĺžka karantény mačiek, zahrnutých do štúdie bola 14 dní. Po skončení karantény sú mačky umiestnené do skupiny k ostatným zvieratám; k vlastnému ustajneniu slúži podlahová plocha o celkovej rozlohe 53 m². Útulok tvoria 2 navzájom prepojené miestnosti; v prvej miestnosti sú umiestnené karanténne boxy, druhá miestnosť je mačacím priechodom prepojená s vonkajšou voliérou. Obe miestnosti a voliéra sú vybavené miskami na potravu a vodu, mačacími toaletami, úkrytmi a stromami na šplhanie. O zvieratá sa stará 1 ošetrovateľ. V čase zberu dát nepoužíval útulok u novo prijatých zvierat žiaden formálny hodnotiaci protokol, ktorý by slúžil k diskriminácii socializovaných od nesocializovaných mačiek.

Hodnotenie mačiek

K hodnoteniu vývoja miery ochoty kontaktu k pozorovateľovi počas pobytu mačky v útulku bola použitá modifikovaná 5 bodová škála vychádzajúca zo stupnice Kesslera and Turnera (1997), kde stupeň 1 predstavoval najlepší možný stav (priateľská mačka) a stupeň 5 najhorší možný stav (nepriateľská mačka). Bližšia špecifikácia jednotlivých stupňov je uvedená v tabuľke č. 1.

Tabuľka č. 1. Opis hodnotiacej stupnice, ktorá bola použitá pri hodnotení mačiek (Kessler and Turner, 1997, modifikované).

Skóre	Špecifikácia skóre
1 – mačka je veľmi priateľská	Mačka aktívne iniciuje kontakt s človekom v prípade priblíženia sa.
2 – mačka je priateľská	Mačka reaguje neutrálne v prípade priblíženia sa ale v prípade kontaktu reaguje priateľsky pradením/ otieraním sa / olizovaním.
3 – mačka reaguje neutrálne – ani priateľsky ani nepriateľsky	Mačka reaguje neutrálne (ani pozitívne ani negatívne) keď je človek nablízku i v prípade snahy o fyzický kontakt.
4 – mačka reaguje nepriateľsky	Mačka reaguje neutrálne (ani pozitívne ani negatívne) keď je človek nablízku, v prípade snahy o fyzický kontakt reaguje negatívne syčaním/vrčaním/pokusmi o uhryznutie.
5 - mačka reaguje veľmi nepriateľsky	Mačka reaguje negatívne (vyhnutím sa kontaktu a snahou o útek) v prípade že je človek nablízku.

Pravidelné hodnotenie mačiek vykonával 1 vyškolený pozorovateľ, ktorý bol s mačkami v opakovanom kontakte i počas dní, kedy boli mačky umiestnené v karanténe. Aby bolo možné zhodnotiť vývoj ochoty kontaktu mačiek k pozorovateľovi z dlhodobého hľadiska, bolo hodnotenie mačiek realizované v dvojtýždennom intervale. Hodnotenie prebiehalo vždy v rovnakom čase v rámci kontroly zvierat (ráno (9:00) a večer (19:00) – známky oboch pozorovaní boli spriemerované a zaokrúhlené tak aby bolo výsledkom celé číslo) a zároveň mimo návštevných hodín útulku, keďže prítomnosť ďalších osôb by mohla ovplyvniť správanie zvierat. Zvieratá neboli v čase hodnotenia kŕmené alebo inak vyrušované (napr. asanáciou prostredia alebo záujemcami o adopciu). Zber dát prebiehal 12 kalendárnych mesiacov a bol zahájený len u novo prijatých mačiek (maximálny počet hodnotení bol 14, žiadna mačka nebola hodnotená viac ako 14 krát). Ohodnotených bolo spolu 158 mačiek; do hodnotenia neboli zahrnuté mačky mladšie ako 12 týždňov. Prvé hodnotenie prebiehalo nasledujúci deň po skončení karantény (medzi ukončením karantény a prvým hodnotením bol vždy rozstup o dĺžke minimálne 12 hodín). Procedúra hodnotenia mačiek zahŕňala priblíženie sa k mačke pomalým, plynulým pohybom na vzdialenosť asi 1 meter a natiahnutie ruky smerom k hlave mačky. Dodatočné informácie týkajúce sa pohlavia, veku, plemena, dĺžky pobytu mačiek v útulku a spôsobu ukončenia pobytu boli získané z online databázy útulku, ktorý súhlasil s poskytnutím týchto údajov.

Štatistická analýza

χ^2 test, Wilcoxonov test

χ^2 test a Wilcoxonov test boli prevedené v štatistickom programe Unistat 6.5 for Excel (Unistat Ltd., UK). Najprv bola otestovaná normalita získaných dát Shapiro-Wilkovým testom. χ^2 test (kontingenčné tabuľky o formáte 2 x 2 a k x m) bol použitý k analýze rozdielov v počte zvierat vo vytvorených skupinách mačiek podľa získaného skóre (1-5) v rámci prvého hodnotenia. Tento test bol tiež použitý v prípade porovnania počtu mačiek, u ktorých v priebehu pobytu došlo a nedošlo k zmene skóre a pri porovnaní počtu mačiek, ktorým sa skóre v priebehu pobytu v útulku zhoršilo a zlepšilo. Štatistická významnosť medzi známkami, ktoré boli mačkám udelené pri prvom a poslednom hodnotení bola testovaná neparametrickým Wilcoxonovým testom. Za štatisticky významnú bola považovaná hodnota $P \leq 0.05$.

Korelačná analýza, logistická regresia

Korelačná analýza a logistická regresia boli vykonané v štatistickom programe Jamovi (verzia 1.6, Sydney, Austrália). Vzhľadom na charakter dát (5 bodová stupnica) a na absenciu normality boli použité neparametrické analýzy. Neparametrický korelačný koeficient Tau Kendall bol zvolený

k overeniu vzťahu medzi vybranými premennými (pohlavie, vek, stupeň sociability pri prvom a poslednom hodnotení, dĺžka pobytu v útulku – vypočítaná v dňoch ako rozdiel medzi dátumom príjmu a ukončenia pobytu v útulku). Logistická regresia bola zvolená k overeniu dĺžka pobytu v útulku ako prediktora úrovne sociability pri poslednom hodnotení. P hodnota $\leq 0,05$ bola považovaná za ukazovateľ štatistickej významnosti.

Výsledky

Charakteristika sledovanej populácie

Do útulku bolo počas celého kalendárneho roka prijatých 220 zvierat, 62 zvierat bolo z hodnotenia vyradených z dôvodu nízkeho veku (menej ako 3 mesiace) a z dôvodu ukončenia pobytu v útulku ešte pred zaradením do skupiny medzi ostatné mačky. Minimálne raz bolo ohodnotených všetkých 158 mačiek, minimálne dvakrát bolo ohodnotených 101 mačiek. Medián dĺžky pobytu mačiek v útulku (bez ohľadu na spôsob ukončenia pobytu v útulku) bol 37 dní, priemerne strávili zvieratá v útulku 60 dní. Charakteristika sledovanej populácie mačiek (n=158) je uvedená v tabuľke č. 2.

Tabuľka č. 2. Charakteristika sledovanej populácie (pohlavie, vek, osud, plemeno).

	n	%
pohlavie		
samec	58	36,7
samica	100	63,3
vek		
$3 < x \leq 6$ mesiacov	61	38,6
$6 < x \leq 12$ mesiacov	38	24,1
$1 < x \leq 8$ rokov	52	32,9
> 8 rokov	7	4,4
spôsob ukončenia pobytu v útulku		
adopcia	123	77,8
úhyn/eutanázia	20	12,7
vypustenie do lokality odchyty	1	0,6
vrátenie majiteľovi	1	0,6
zostalo v útulku	13	8,2
plemenná príslušnosť		
domáca krátkosrstá	133	84,2
domáca dlhosrstá	6	3,8
čistokrvná	19	12,0

Hodnotenie úrovne sociability mačiek pri prvom hodnotení a v priebehu pobytu v útulku

χ^2 test, Wilcoxonov test

Zo všetkých zvierat, ktoré boli ohodnotenú aspoň raz (n=158), bolo pri prvom hodnotení známku veľmi priateľská mačka (skóre 1) ohodnotených 88 mačiek (55,7%), priateľských mačiek (skóre 2) bolo 40 (25,3%), 16 mačiek (10,1%) reagovalo na človeka neutrálne (ani pozitívne, ani negatívne), 12 mačiek (7,6%) bolo označených za nepriateľské (skóre 4). Iba s dvoma mačkami (1,3 %) nebol kontakt vôbec možný, preto boli označené za veľmi nepriateľské (skóre 5). Pri prvom hodnotení bolo zaznamenaných významne viac ($P < 0,001$) mačiek priateľských a veľmi priateľských ako mačiek, ktoré na človeka reagovali neutrálne, nepriateľsky alebo veľmi nepriateľsky.

Z 88 mačiek, ktoré boli ohodnotenú minimálne dvakrát a zároveň ukončili svoj pobyt v útulku počas monitorovacieho obdobia, nedošlo u 56 mačiek (63,6%) počas pobytu v útulku k žiadnej zmene skóre (k zhoršeniu ani k zlepšeniu). 41 mačiek (73,2%) si zachovalo počas celého pobytu v útulku skóre 1,

11 mačiek (19,6%) skóre 2, 2 mačiek (3,6%) skóre 3, 2 mačky (3,6%) skóre 4. Ani jedna mačka si počas celého pobytu v útulku nezachovala známku 5.

K zmene skóre kedykoľvek počas pobytu v útulku došlo u 32 mačiek (36,4%). U významne vyššieho počtu mačiek teda počas pobytu v útulku k zmene skóre nedošlo ($P < 0,001$). Medzi mačkami, u ktorých bola zaznamenaná zmena, došlo u významne vyššieho počtu mačiek ($P < 0,001$) počas pobytu v útulku k trvalému zlepšeniu skóre ako k jeho trvalému zhoršeniu (26 (29,5%) a 3 (3,4%)). Väčšinu z mačiek (17 z 26 mačiek), u ktorých došlo počas pobytu v útulku k trvalému zlepšeniu skóre tvorili zvieratá správajúce sa k človeku pri prvom hodnotení neutrálne (skóre 3), nepriateľsky (skóre 4) alebo veľmi nepriateľsky (skóre 5). Trvalé zlepšenie skóre bolo u 20 mačiek z 26 zaznamenané v rámci druhého hodnotenia, u 6 mačiek došlo k zlepšeniu skóre neskôr (u 3 mačiek bolo zlepšenie zaznamenané v rámci 3 hodnotenia, u 1 mačky v rámci 4, u ďalšej v rámci 5 hodnotenia a u jednej až v rámci 6 hodnotenia). K prechodnému zlepšeniu resp. zhoršeniu skóre došlo u 3 mačiek (3,4%).

Priemerné skóre, ktoré mačky získali pri prvom hodnotení bolo vyššie ako priemerné skóre pri poslednom hodnotení (1.898 a 1.568), rozdiel známok prvého a posledného hodnotenia bol významný ($P < 0,001$). Znamky prvého a posledného hodnotenia, ktoré získali iba nepriateľské mačky (skóre 3, 4 alebo 5 pri prvom hodnotení) sa líšili významne ($P < 0,001$), avšak rozdiel medzi známkami prvého a posledného hodnotenia priateľských mačiek (skóre 1 alebo 2 pri prvom hodnotení) nebol významný ($P > 0,05$).

Korelačná analýza

Výsledky korelačnej analýzy sú uvedené v tabuľke č. 3. Úroveň sociability mačiek pri poslednom hodnotení súvisela s dĺžkou pobytu v útulku ($r_{\text{tau}} = 0,23$, $P = 0,007$) a s úrovňou sociability pri prvom hodnotení ($r_{\text{tau}} = 0,72$, $P < 0,001$). Úroveň sociability nesúvisela s vekom ($r_{\text{tau}} = 0,01$, $P > 0,05$) ani s pohlavím ($r_{\text{tau}} = 0,09$, $P > 0,05$). Čím vyššia bola úroveň sociability pri prvom hodnotení, tým vyššia bola jej úroveň pri poslednom hodnotení a naopak. Čím dlhší bol pobyt mačky v útulku, tým vyššia bola úroveň sociability pri poslednom hodnotení a naopak.

Tabuľka č. 3. Výsledky korelačnej analýzy.

	Sociabilita (posledné hodnotenie)	Sociabilita (prvé hodnotenie)	Dĺžka pobytu	Vek	Pohlavie
Sociabilita (posledné hodnotenie)	-				
Sociabilita (prvé hodnotenie)	0.72***	--			
Dĺžka pobytu	0.23**	0.26**	-		
Vek	0.01	0.01	-0.11	-	
Pohlavie	0.09	0.16	0.10	-	-
				0.17	

pozn.: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

Regresná analýza

Keďže vzťah medzi úrovňou sociability a dĺžkou pobytu mohol byť ovplyvnený úrovňou sociability mačiek pri prvom hodnotení alebo charakterom sledovanej populácie, rozhodli sme sa zohľadniť tieto premenné prostredníctvom komplexnejšieho modelu logistickej regresie. Do prvého bloku sme zahrnuli skóre sociability mačiek prvého hodnotenia, vek a pohlavie mačky. Do druhého bloku bola zahrnutá aj dĺžka pobytu.

Vo výsledkoch bolo zaznamenané významné zlepšenie oproti nulovému modelu, keď bola zahrnutá úroveň sociability mačiek v prvom hodnotení, vek a pohlavie. Tento model predstavoval 43

% rozptylu premennej (R2N=0,43; odchýlka = 104,30; AIC=116,30). Úroveň sociability mačiek pri prvom hodnotení ($p < 0,001$) predpovedala sociabilitu pri poslednom hodnotení na rozdiel od veku alebo pohlavia ($P > 0,05$) (tabuľka 4).

Tabuľka č. 4. Koefficienty prvého bloku.

prediktor	odhad	95% Interval spoľahlivosti		SE	Z	P	miera pravdepodobnosti
		dolný	horný				
vek	-0,13	-0,71	0,43	0,29	-0,46	0,645	0,88
pohlavie 1 – 0	-0,35	-1,61	0,92	0,64	-0,54	0,586	0,71
úroveň sociability pri prvom hodnotení	2,08	1,46	2,84	0,35	5,98	<0,001	8,04

Podobne došlo k výraznému zlepšeniu zhody oproti nule, keď bola dĺžka pobytu zahrnutá do druhého bloku [$\chi^2(4)=63,16$, $P < 0,001$] (tabuľka č. 5). Model predstavoval 44 % rozptylu premennej (R2N = 0,44; odchýlka = 103,48; AIC = 117,48). Rozdiely medzi prvým a druhým blokom boli zanedbateľné a štatisticky nevýznamné ($\chi^2(1)=0,83$, $P=0,264$). Rozhodujúce je, že pri kontrole úrovne sociability pri prvom hodnotení, veku a pohlavia, nebola dĺžka pobytu štatisticky významným prediktorom. V súlade s predchádzajúcou analýzou, čím vyššie bolo skóre na škále sociability v prvom hodnotení, tým vyššie bolo skóre na škále sociability v poslednom hodnotení.

Tabuľka č. 5. Koefficienty druhého bloku.

prediktor	odhad	95% Interval spoľahlivosti		SE	Z	P	miera pravdepodobnosti
		dolný	horný				
vek	-0,13	-0,71	0,43	0,29	-0,47	0,641	0,87
pohlavie 1 – 0	-0,35	-1,61	0,93	0,64	-0,54	0,587	0,71
úroveň sociability pri prvom hodnotení	2,21	1,52	3,05	0,39	5,73	<0,001	9,14
dĺžka pobytu v útulku	-0,00	-0,01	0,00	0,00	-0,88	0,380	1,00

Diskusia

Cieľom tejto štúdie bolo preskúmať vývoj sociability mačiek v priebehu pobytu v útulku vo vzťahu k ošetrovateľovi a vzhľadom na skutočnosť, že pred začiatkom sledovania už zvieratá v útulku strávili určitý čas v karanténe počas ktorej sa mali možnosť adaptovať na prítomnosť a manipuláciu človekom. Výsledky poukazujú na skutočnosť, že napriek tomu, že zvieratá absolvovali v útulku aklimatizačné obdobie v podobe karantény, ktorá trvala v priemere 14 dní, dochádzalo vplyvom ich ďalšieho pobytu k zvyšovaniu úrovne sociability. Tento jav sa ukázal ako platný hlavne v prípade mačiek, ktoré pri prvom hodnotení vykazovali k hodnotiacej osobe neutrálne, nepriateľské alebo veľmi nepriateľské správanie. Počet týchto zvierat bol významne nižší (19 % zo všetkých zvierat, ktoré boli ohodnotené aspoň 1 krát) ako počet mačiek, ktoré sa pri prvom hodnotení javili ako

priateľské alebo veľmi priateľské, no zároveň zhodný ako v prípade austrálskej štúdie od Marston and Bennett (2009), ktorí uvádzajú 18.7 % do útulku prijatých nepriateľských mačiek k ľuďom. Hoci sú výsledky tejto a našej štúdie takmer identické, je na nich nutné nahliadať opatrne nakoľko boli zvieratá v našej štúdii hodnotené prvýkrát až po absolvovaní karantény, zatiaľ čo austrálska štúdia dokumentuje výsledky úrovne sociability mačiek 24 hodín po prijatí do útulku. Každopádne je pri interpretácii výsledkov získaných v tejto štúdii možné brať do úvahy viaceré faktory.

Jedným z týchto faktorov je, ako už bolo uvedené, absolvovanie karantény pred prvým hodnotením, počas ktorej mohlo dôjsť k návyku na ošetrovateľa a na zníženie stresu spôsobeného prijatím do útulku vo všeobecnosti. Predchádzajúce výskumné aktivity zamerané na zostavenie protokolu, ktorého cieľom bolo diskriminovať medzi socializovanými a nesocializovanými mačkami (Slater et al., 2013) brali do úvahy iba trojdňovú periódu, počas ktorej boli zvieratá sledované a počas ktorých sa očakávalo, že ak bola mačka predtým priateľská k ľuďom, sa táto črta prejaví v dôsledku zníženia intenzity stresu z prijatia do útulku a čiastočného návyku na nové prostredie. 3 dňové sledovanie bolo zvolené na základe prieskumnej štúdie, ktorá ukázala, že polovica (prevažne amerických) útulkov drží zvieratá vo svojich zariadeniach aspoň 3 dni (Slater et al., 2010). Hoci bola v štúdii od Slater et al. (2013) braná do úvahy iba pomerne krátke sledovacie obdobie, neznamená to, že v priebehu ďalších dní k znižovaniu stresu nedochádza. Kessler and Turner (1997) študovali zmeny správania 140 mačiek počas dvoch týždňov pomocou hodnotiacej stupnice Cat Stress Score. Z výsledkov vyplynulo, že hoci bolo významné zníženie úrovne stresu mačiek zaznamenané už po prvých štyroch dňoch, dve tretiny mačiek sa prispôbili do dvoch týždňov strávených v útulku. Až 5 týždňové adaptačné obdobie mačiek umiestnených v karanténe bolo dokumentované v štúdii od Rochlitz et al. (1998). Reakcia mačky na človeka a schopnosť adaptácie úzko súvisí i s jej individuálnym temperamentom (v literatúre sa možno stretnúť i s inými pojmami – napr. osobnosť alebo copingový štýl (Travnik et al., 2020); rôzne pojmy však označujú rovnaký koncept, ktorý možno definovať ako prítomnosť individuálnych rozdielov v správaní, ktoré sú stabilné v čase a v odlišných kontextoch (Stamps and Groothuis, 2010; Hudson et al., 2015)), ktorého vývoj závisí na genetike a vplyvoch prostredia (Travnik et al., 2020) kam možno zaradiť aj socializáciu voči človeku. Socializačné obdobie mačiat je viazané na konkrétne senzitivné obdobie; mláďatá ktoré prešli procesom socializácie medzi druhým až dvanástym týždňom života sa k ľuďom správali priateľskejšie na rozdiel od mláďat, ktoré socializované neboli (McCune, 1995). Veľké percento priateľských mačiek pri prvom hodnotení zistených v našej štúdii teda mohlo byť potenciálne spôsobené i prijatím veľkého počtu predtým socializovaných zvierat do útulku. V rámci tejto štúdie sme však nemali k dispozícii dáta, ktoré by odkazovali na pôvod mačiek; okolnosti prijatia do útulku by však mohli pomôcť pri interpretácii výsledku, nakoľko sa javí podstatné, či sa mačka dostala do útulku po tom, čo ju tam umiestnil jej pôvodný majiteľ alebo bola odchytená v pôvodnom prostredí napr. v rámci realizácie kastrovacieho programu (Marston and Bennett, 2009).

Je pravdepodobné (hoci to nebolo predmetom tejto štúdie a ďalší výskum v tejto oblasti je potrebný), že reakcie mačiek k pozorovateľovi mohli do významnej miery odrážať skúsenosti s touto osobou nadobudnuté počas karantény. Zdravotný stav mačiek (napr. vnímanie bolesti) môže vyvolať negatívnu reakciu voči človeku (Mills et al., 2020), rovnako opakované podstupovanie liečebných procedúr vnímajú mačky negatívne (Mariti et al., 2016) a to najmä ak sú spojené s fixáciou a bolesťou, čo môže narušiť vzťah s danou osobou. Bolo zistené, že zvieratá sú pravdepodobne schopné zapamätať si osobu, ktorá im spôsobila utrpenie (Marzluff et al., 2010).

V priebehu pobytu v útulku nedošlo u viac ako polovice mačiek k žiadnej zmene skóre; najviac mačiek sa počas celého pobytu v útulku správalo veľmi priateľsky (skóre 1) alebo priateľsky (skóre 2). Len 2 mačky sa správali počas celého pobytu v útulku k ošetrovateľovi neutrálne, a 2 mačky zostali nepriateľské (skóre 4). Obe tieto mačky však boli ohodnotené iba dva krát, pretože krátko po druhom hodnotení uhynuli v dôsledku kalicivirózy. Vzhľadom ku krátkej dobe pobytu týchto mačiek v útulku nie je možné s určitosťou odhadnúť, či boli nepriateľské reakcie mačiek spôsobené nízkym stupňom socializácie, pretrvávajúcim stresom z nového prostredia alebo zdravotným stavom. Hoci sa predpokladá, že u socializovaných mačiek dôjde v priebehu pobytu v útulku k postupnej úprave

reakcií voči človeku v dôsledku postupného znižovania stresu ako už bolo zmienené, mačky reagujú na stresové situácie rozdielnymi spôsobmi (Stella and Croney, 2019). U niektorých zvierat teda môže navykanie na nové prostredie trvať dlhšiu dobu. Rozlíšenie vystresovaných no socializovaných mačiek od zvierat, ktorých kontakt s človekom bol minimálny alebo úplne chýbal, je problematické, keďže ako sa zmieňuje v štúdiu od Slater et al. (2013), strach vykazovaný oboma skupinami zvierat nebolo možné od seba odlišiť. Socializované, no vystrašené mačky môžu byť teda mylne označené za nesocializované a to hlavne v prípade, že im nie je poskytnutý žiaden čas pre aklimatizáciu. Opačným problémom je ale i situácia, kedy je skutočne nesocializované zviera držané v útulku dlhšiu dobu s domnienkou, že sa na nové podmienky adaptuje. V nami vybranom zariadení, v ktorom dochádzalo k hodnoteniu mačiek, nebol žiaden formálny protokol k diskriminácii mačiek využívaný. Povinnosť použitia hodnotiacich nástrojov nie je v Českej republike stanovená právnymi predpismi, zmienka o týchto nástrojoch sa nenachádza ani v odporúčaniach týkajúcich sa prevádzkovania útulkov. Rozhodnutie nasledovať už vytvorené postupy k diskriminácii zvierat, vytvoriť si vlastný metodický postup resp. zvieratá nerozlišovať vôbec teda závisí od konkrétneho zariadenia. V priebehu monitorovacieho obdobia bola po ošetroaní v útulku do pôvodnej lokality vypustená iba jedna mačka. Rozhodnutie bolo učené na základe správania mačky v útulku a okolností odchyty. Zdá sa, že zvolená stratégia útulku bola efektívna, nakoľko v ňom nedochádzalo k držaniu nepriateľsky reagujúcich mačiek, ktorých stav by sa v priebehu pobytu nezlepšoval alebo zhoršil. Z pohľadu welfare sa držanie nesocializovaných zvierat v útulku dlhšiu dobu než je nevyhnutné považuje za nevhodné, preto sa odporúča ich eutanázia alebo vypustenie späť do miesta odchyty ak je to možné (Sparkes et al., 2013). K zmene skóre počas pobytu v útulku došlo u 32 mačiek, pričom u väčšiny z týchto zvierat (n=26) došlo k trvalému zlepšeniu skóre sociability. Zvyšovanie sociability bolo zaznamenané hlavne u zvierat, ktorých správanie bolo pri prvom hodnotení označené za neutrálne (skóre 3), nepriateľské (skóre 4) alebo veľmi nepriateľské (skóre 5).

U žiadnej mačky nedošlo v priebehu pobytu v útulku k zlepšeniu skóre o viac ako 3 stupne; najväčší progres bol zaznamenaný u mačky, ktorej bolo pri prvom hodnotení udelené skóre 5, zatiaľ čo pri poslednom skóre 2. Zlepšovanie ale bolo postupné (zmena nastala v priebehu 10 hodnotení čo pri dvojtýždennom intervale hodnotenia zodpovedá 20 týždňom v útulku). Rozhodnutie ponechať toto zviera v útulku vyplynulo z pomalého zlepšovania reakcie na človeka, hoci sa prvé zlepšenie dostavilo až po druhom hodnotení a teda 4 týždňoch strávených v útulku. U väčšiny mačiek (20 z 26) bolo však zlepšenie skóre zaznamenané skôr, a to už pri druhom hodnotení. Nakoľko zvieratá neboli počas karantény hodnotené, nemožno vylúčiť že prechod z karanténneho boxu do skupiny medzi ostatné mačky nemohol ovplyvniť správanie mačiek k človeku, preto by vplyv ustajnenia na reakcie mačiek voči človeku mal byť predmetom ďalšieho štúdia. Prechod z karantény do skupiny mohol mačkám, ktoré sa k človeku správali priateľsky kým boli v karanténe, potenciálne spôsobiť stres manifestujúci sa nepriateľským správaním voči človeku pri prvom hodnotení. Rovnako potenciálne mohlo byť nepriateľské správanie mačiek k človeku spôsobené špecifickými podmienkami karantény (nie iba stresom z prijatia do útulku vo všeobecnosti), kde sa zvieratá môžu cítiť ohrozené, keďže sú umiestnené v obmedzenom a relatívne malom priestore, nemajú tak možnosť úniku a dostatočnú kontrolu nad prostredím; vypustenie z karantény mohlo mať vplyv na zníženie stresu a zvýšenie úrovne sociability. Domnievame sa, že prvý načrtnutý scenár je menej pravdepodobný (hoci ho nemožno úplne vylúčiť) vzhľadom na to, že v útulku, v ktorom zber dát prebiehal nebola miestnosť, kde boli mačky umiestnené v karanténnych boxoch, úplne izolovaná od zvyšných priestorov útulku. V praxi to znamenalo, že mačky mimo karantény mali prístup do miestnosti, kde boli zvieratá umiestnené v karanténnych boxoch; tie teda boli počas trvania karantény s voľne ustajnenými mačkami vo vizuálnom, olfaktorickom i akustickom kontakte.

Dlhšia doba strávená v útulku môže dávať zvieratú priestor k postupnému vybudovaniu návyku na človeka za predpokladu, že bolo predtým aspoň do istej miery socializované na človeka. Na socializáciu je nutné nazerať ako na kontinuum stupňov; správanie voči človeku odráža stupeň socializácie (Sparkes et al., 2013). Dosiahnutie maximálnej adaptačnej kapacity vzhľadom ku stupňu socializácie bol pravdepodobne prípad jedného zo zvierat, ktoré bolo predmetom sledovania. U tejto

mačky došlo v priebehu prvých dvoch týždňov v útulku k zlepšeniu skóre zo 4 na 3, no toto skóre zostalo nemenné ďalších 13 hodnotení (teda 26 týždňov). Tento vývoj však mohol odrážať i schopnosť adaptácie mačky na pobyt v útulku vo všeobecnosti, ktorý sa manifestoval v reakcii na človeka, nemusel teda nutne súvisieť so stupňom socializácie. Ako sme už zmienili, reakcie mačiek na nové prostredie sa môžu líšiť a adaptácia môže u rôznych zvierat trvať rôzne dlhú dobu. Práve tento fakt je problematický pri určení hranice doby, ktorá by mala byť zvieratú poskytnutá predtým ako padne o jeho ďalšom osude definitívne rozhodnutie. Domnievame sa, že každý jedinec by mal byť posudzovaný individuálne na základe jeho správania a predošlej histórie, ak je známa.

K trvalému zhoršeniu skóre sociability došlo počas pobytu v útulku len u 3 zvierat (u dvoch zvierat došlo k zmene zo skóre 1 na skóre 2, u 1 mačky sa skóre zmenilo zo skóre 2 na skóre 3). Prechodné zlepšenie resp. zhoršenie známky bolo v priebehu pobytu zaznamenané u 3 mačiek, pričom zmeny známok u týchto mačiek neboli výrazné ale vždy kolísali medzi dvoma stupňami.

Skóre mačiek, ktoré pri prvom hodnotení vykazovali neutrálne, nepriateľské alebo veľmi nepriateľské správanie boli pri prvom hodnotení významne vyššie ako známky pri poslednom hodnotení. Naopak, vzhľadom k tomu, že v priebehu pobytu v útulku došlo k zhoršeniu skóre iba u troch mačiek, je zrejmé, že známky mačiek, ktoré boli pri prvom hodnotení označené za priateľské alebo veľmi priateľské zostali prakticky nemenné počas celého pobytu v útulku, čo spôsobilo, že rozdiel medzi známkami prvého a posledného hodnotenia týchto mačiek bol nevýznamný. Nakoľko predmetom štúdie bolo sledovanie populácie mačiek v útulku, u ktorej nie je možné regulovať dĺžku pobytu tak, aby bola rovnaká u všetkých zvierat keďže každé zviera ukončí svoj pobyt v útulku v inom čase, bolo pochopiteľne nutné nazerať na vývoj sociability mačiek i v kontexte rôznych dĺžok pobytu jednotlivých zvierat. Hoci korelačná analýza ukázala, že dĺžka pobytu v útulku súvisí so stupňom sociability, podľa výsledkov regresnej analýzy však nie je prediktorom pre výsledný stupeň sociability. Vo vzťahu k úrovni sociability počas posledného hodnotenia sa ako jediný zo sledovaných prediktorov (pohlavie, vek, dĺžka pobytu a stupeň sociability počas prvého hodnotenia) ukázal ako významný stupeň sociability počas prvého hodnotenia. Prvé hodnotenie predikovalo výsledný stupeň sociability, čím vyššie teda bolo skóre pri prvom hodnotení, tým vyššie skóre bolo zaznamenané počas posledného hodnotenia a opačne. Tento výsledok je zřejmý, nakoľko veľký počet mačiek sa počas prvého hodnotenia správalo priateľsky alebo veľmi priateľsky a tento stav zostal u takmer všetkých zvierat nemenný; u mačiek, ktoré sa počas prvého hodnotenia správali neutrálne, nepriateľsky alebo veľmi nepriateľsky bola síce zmena známok zaznamenaná, no zvyčajne sa jednalo o pokles iba o jeden stupeň.

Hoci sme zistili, že dĺžka pobytu nepredikuje výsledný stupeň sociability, nájdenie súvislosti medzi týmito dvoma premennými potvrdzuje zistenia predošlej štúdie, ktorá zaznamenala predĺženie doby pobytu v útulku u mačiek správajúcich sa k ľuďom nepriateľsky; mačky iniciujúce kontakt s ľuďmi, pobudli v útulku až tri krát kratšiu dobu ako mačky, s ktorými nebol kontakt možný (Brown and Stephan, 2020). Podobne ďalšie štúdie zmieňujú zvýšenú mieru adopcie mačiek reagujúcich pozitívne pri kontakte s človekom (Gourkow and Fraser, 2006; Weiss et al., 2012; Dybdall and Strasser, 2014; Southland et al., 2019). Správanie mačky a jej vzhľad sú významnými faktormi ovplyvňujúcimi preferencie potenciálneho osvojiteľa (Fantuzzi et al., 2010). Naša štúdia naznačuje, že z pohľadu negatívneho dopadu na sociabilitu mačiek, sa dlhšia doba pobytu v útulku nejaví ako problematická. V priebehu pobytu v útulku nedochádzalo k znižovaniu sociability mačiek, ktorá by mohla negatívne ovplyvniť ich adopčný potenciál, čo je v kontraste so zisteniami dokumentovanými napr. u útulkových psov. Predĺžená doba pobytu v útulku bola u psov spojená so znížením sociability (Raudies et al., 2021) resp. dávala priestor pre rozvoj atribútov správania, ktoré môžu byť potenciálnymi ovojiteľmi považované za neatraktívne (Wells et al., 2002).

Medzi limitácie tejto štúdie možno zaradiť niekoľko skutočností. Prvou z nich je fakt, že zvolenie dvojtýždňového intervalu zberu dát síce umožňovalo monitorovanie vývoja sociability z dlhodobého hľadiska, na druhej strane ale neumožňovalo zachytenie zmien, ktoré sa mohli udiať medzi jednotlivými hodnoteniami. Druhou podstatnou skutočnosťou je, že zvieratá boli hodnotené iba jedným pozorovateľom, nakoľko voči tejto osobe boli reakcie mačiek sledované. Hoci prešiel daný

pozorovateľ pred zberom dát tréningom, ktorý bol zameraný na spôsob hodnotenia zvierat s prihliadnutím na to, aby boli jednotlivé hodnotenia realizované správne a postupovalo sa pri nich rovnako, hodnotenie zvierat pozorovaním je vždy do určitej miery subjektívne a odvíja sa od individuálnych atribútov hodnotiteľa. Je tiež otáznou do akej miery možno výsledky tejto štúdie interpretovať v súvislosti s úrovňou sociability mačiek voči neznámym osobám. Mačky sú schopné rozlišovať známe od neznámych osôb a často vykazujú preferencie k známej osobe (Galvan and Vonk, 2016), štúdia od Vitale and Udell (2019) ale zmieta, že skutočnosť, či bola osoba mačke známa alebo neznáma nemala vplyv na jej správanie súvisiace so sociabilitou. Štúdia však rovnako zmieta, že medzi mačkami existuje významná miera individuálnej variability v preferenci k známej alebo neznámej osobe. Limitácia tejto štúdie môže súvisieť aj s počtom hodnotených zvierat; hoci bolo do útulku počas monitorovacieho obdobia prijatých celkom 220 zvierat, až 62 z nich muselo byť zo sledovania vyradených z dôvodu nízkeho veku (menej ako 3 mesiace) keďže štúdie naznačujú, že vývoj osobnosti mačky nie je plne ukončený do konca tretieho mesiaca veku (Lowe and Bradshaw, 2001). Zaradenie týchto zvierat do hodnotenia by mohlo ovplyvniť výsledky vo významnej miere. Problematickým sa tiež javí získanie dostatočného množstva dát vo všeobecnosti, nakoľko veľký počet zvierat ukončí svoj pobyt v útulku počas karantény alebo tesne po nej, preto nie je opakovanie zberu dát v prípade týchto jedincov možné. Bez ohľadu na túto skutočnosť by však v záujme zachovávanía dobrých životných podmienok zvierat mala byť doba strávená v útulku skrátená na minimum a podpora aktivít smerujúcich k tomuto cieľu je potrebná.

Záver

Výsledky tejto štúdie naznačujú, že v priebehu pobytu v útulku dochádza u mačiek k zvyšovaniu sociability, čo môže prispieť k zvýšeniu ich adopčného potenciálu. Dĺžka pobytu nebola v našej štúdii prediktorom výslednej sociability; predĺžená doba pobytu v útulku bola pravdepodobne dôsledkom počiatočnej nízkej úrovne sociability mačiek, čo je v súlade so zisteniami iných autorov. Aplikácii postupov vedúcich k socializácii mačiek a k znižovaniu stresu v útulkoch by mala byť venovaná pozornosť, nakoľko môžu prispieť k skráteniu pobytu zvierat a v zariadení a tým zlepšiť jeho životné podmienky.

Táto štúdia bola finančne podporená projektom ITA VETUNI (Projekt č. 2021ITA22).

Literatúra

- Amat, M., Camps, T., Manteca, X., 2016. Stress in owned cats: Behavioural changes and welfare implications. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 18: 577-586.
- Arhant, C., Binder, R., Kadlik, S., Wogritsch, R., Konicek, C., Troxler, J., 2011. Beurteilung von Tierheimen in Österreich. Report to project BMG-70420/0320-I/15/2009.
- Arhant, C., Troxler, J., 2017. Is there a relationship between attitudes of shelter staff to cats and the cats' approach behaviour? *Applied Animal Behaviour Science* 187: 60-68.
- Arhant, C., Wogritsch, R., Troxler, J., 2015. Assessment of behavior and physical condition of shelter cats as animal-based indicators of welfare *Journal of Veterinary Behavior* 10: 399-406.
- Brown, W.P., Stephan, V.L., 2020. The influence of degree of socialization and age on length of stay of shelter cats. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 24: 238-245.
- Casey, R.A., Bradshaw, J.W.S., 2005. The assessment of welfare. In: Rochlitz, I. (Eds): *The Welfare of Cats*, Springer, Dordrecht, pp. 23-46.
- Dybdall, K., Strasser, R., 2014. Is there a bias against stray cats in shelters? People's perception of shelter cats and how it influences adoption time. *Anthrozoös* 27: 603-614.
- Fantuzzi, J.M., Miller, K.A., Weiss, E., 2010. Factors relevant to adoption of cats in an animal shelter. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 13: 174-179.
- Galvan, M., Vonk, J., 2016. Man's other best friend: domestic cats (*F. silvestris catus*) and their discrimination of human emotion cues. *Animal Cognition* 19: 193-205.

- Gourkow, N., Fraser, D., 2006. The effect of housing and handling practices on the welfare, behaviour and selection of domestic cats (*Felis silvestris catus*) by adopters in an animal shelter. *Animal Welfare* 15: 371-377.
- Hudson, R., Rangassamy, M., Saldana, A., Banszegi, O., Rodel, H.G., 2015. Stable individual differences in separation calls during early development in cats and mice. *Frontiers in Zoology* 12: 12.
- Kessler, M.R., Turner, D.C., 1997. Stress and adaptation of cats (*Felis silvestris catus*) housed singly, in pairs and in groups in boarding catteries. *Animal Welfare* 6: 243-254.
- Kessler, M.R., Turner, D.C., 1999. Socialization and stress in cats (*Felis silvestris catus*) housed singly and in groups in animal shelters. *Animal Welfare* 8: 15-16.
- Kry, K., Casey, R., 2007. The effect of hiding enrichment on stress levels and behaviour of domestic cats (*Felis silvestris catus*) in a shelter setting and the implications for adoption potential. *Animal Welfare* 16: 375-383.
- Kubesova, K., Voslarova, E., Vecerek, V., Vucinic, M., 2017. Investigating some of the factors that affect the selection of shelter cats by adopters in the Czech Republic. *Anthrozoös* 30: 623-633.
- Lowe, S.E., Bradshaw, J. W., 2001. Ontogeny of individuality in the domestic cat in the home environment. *Animal Behaviour* 61: 231-237.
- Mariti, C., Bowen, J.E., Campa, S., Grebe, G., Sighieri, C., Gazzano, A., 2016. Guardians' perceptions of cats' welfare and behavior regarding visiting veterinary clinics. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 19: 375-384.
- Marston, L.C., Bennett, P.C., 2009. Admissions of cats to animal welfare shelters in Melbourne, Australia. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 12: 189-213.
- Marzluff, J.M., Walls, J., Cornell, H.N., Withey, J.C., Craig, D.P., 2010. Lasting recognition of threatening people by wild American crows. *Animal Behaviour* 79: 699-707.
- McCune, S., 1995. The impact of paternity and early socialization on the development of cats behavior to people and novel objects. *Applied Animal Behavior Science* 45: 109-124.
- Mills, D.S., Demontigny-Bédard, I., Gruen, M., Klinck, M.P., McPeake, K.J., Barcelos, A.M., Hewison, L., Van Haevermaet, H., Denenberg, S., Hauser, H., Koch, C., 2020. Pain and problem behavior in cats and dogs. *Animals* 10: 318.
- Raudies, C., Waiblinger, S., Arhant, C., 2021. Characteristics and Welfare of Long-Term Shelter Dogs. *Animals* 11: 194.
- Réale, D., Dingemanse, N.J., 2012. *Animal Personality*. Els, John Wiley & Sons. Chichester, UK.
- Rochlitz, I., Podberscek, A.L., Broom, D.M., 1998. Welfare of cats in a quarantine cattery. *Veterinary Record* 143. 35-39.
- Slater, M.R., Miller, K.A., Weiss, E., Makolinski, K.V., Weisbrot, L.A., 2010. A survey of the methods used in shelter and rescue programs to identify feral and frightened pet cats *Journal of Feline Medicine and Surgery* 12: 592-600.
- Slater, M.R., Garrison, L., Miller, K.A., Weiss, E., Drain, N., Makolinski, K., 2013. Physical and behavioral measures that predict cats' socialization in an animal shelter environment during a three day period. *Animals* 3: 1215-1228.
- Southland, A., Dowling-Guyer, S., McCobb, E., 2019. Effect of visitor perspective on adoption decisions at one animal shelter. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 22: 1-12.
- Sparkes, A.H., Bessant, C., Cope, K., Ellis, S.L., Finka, L., Halls, V., Hiestand, K., Horsford, K., Laurence, C., MacFarlane, I., Neville, P.F., 2013. ISFM guidelines on population management and welfare of unowned domestic cats (*Felis catus*). *Journal of Feline Medicine and Surgery* 15: 811-817.
- Stamps, J., Groothuis, T. G. G., 2010. The development of animal personality: Relevance, concepts and perspectives. *Biological Reviews* 85: 301-325.
- Stella, J., Croney, C., 2019. Coping styles in the domestic cat (*Felis silvestris catus*) and implications for cat welfare. *Animals* 9: 370.
- Stella, J.L., Lord, L.K., Buffington, C.T., 2011. Sickness behaviors in response to unusual external events in healthy cats and cats with feline interstitial cystitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 238: 67-73.

- Stella, J.L., Croney, C., Buffington, T., 2013. Effects of stressors on the behavior and physiology of domestic cats. *Applied Animal Behavior Science* 143: 157-163.
- Stella, J., Croney, C., Buffington, T., 2014. Environmental factors that affect the behavior and welfare of domestic cats (*Felis silvestris catus*) housed in cages. *Applied Animal Behavior Science* 160: 94-105.
- Tanaka, A., Wagner, D.C., Kass, P.H., Hurley, K.F., 2012. Associations among weight loss, stress, and upper respiratory tract infection in shelter cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 240: 570-576.
- Travnik, I.D.C., Machado, D.D.S., Gonçalves, L.D.S., Ceballos, M.C., Sant'Anna, A.C., 2020. Temperament in domestic cats: a review of proximate mechanisms, methods of assessment, its effects on human—cat relationships, and one welfare. *Animals* 10: 1516.
- Vinke, C.M., Godijn, L.M., van der Leij, W.J.R., 2014. Will a hiding box provide stress reduction for shelter cats? *Applied Animal Behavior Science* 160: 86-93.
- Vitale, K.R., Udell, M.A., 2019. The quality of being sociable: The influence of human attentional state, population, and human familiarity on domestic cat sociability. *Behavioural Processes* 158: 11-17.
- Vojtkovská, V., Voslářová, E., Večerek, V., 2019. Comparison of Outcome Data for Shelter Dogs and Cats in the Czech Republic. *Animals* 9: 595.
- Weiss, E., Miller, K., Mohan-Gibbons, H., Vela, C., 2012. Why did you choose this pet?: Adopters and pet selection preferences in five animal shelters in the United States. *Animals* 2: 144-159.
- Wells, D.L., Graham, L., Hepper, P.G., 2002. The influence of length of time in a rescue shelter on the behaviour of kennelled dogs. *Animal Welfare* 11: 317-325.

Analýza obchodu s CITES exempláři za období let 1975 až 2018

Martina Volfová, Gabriela Lukešová, Eva Voslášková, Vladimír Večerek

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

Abstrakt

Obchod s ohroženými druhy je jedním z nejvýnosnějších byznysů na celosvětové úrovni. Dle dostupných informací z databáze CITES se obchoduje se všemi živočišnými komoditami z tříd savců, ptáků, plazů, obojživelníků a dalších. Cílem této studie bylo zhodnotit obchod s ohroženými druhy zvířat na celosvětové úrovni z dat dostupných z CITES Trade Database za 43 let, od roku 1975 do roku 2018. Z výsledků vyplývá, že nejvíce bylo obchodováno s exempláři z třídy plazů, poté savci, ptáci a nejméně s obojživelníky. U všech sledovaných tříd bylo ve větší míře obchodováno s neživými exempláři či s produkty z nich, nežli se živými zvířaty. Například u plazů, jako nejvíce obchodované skupiny, se jednalo o přepravu 496 979 631 exemplářů neživých vs. 51 129 325 exemplářů živých. Dále bylo zjištěno, že u plazů byl trend v počtu obchodovaných jedinců vzrůstající. U savců byl pozorován za sledované období stabilní vývoj v počtu přepravovaných exemplářů, jednalo se v průměru o přepravu 5 603 880 jedinců ročně. Trend v obchodování s jedinci z třídy ptáci a obojživelníci byl za sledované období vzrůstající. Zjištěné výsledky informují o rozsahu obchodu s ohroženými druhy živočichů, který je všemi smluvními zeměmi úmluvy CITES zaznamenáván do zmíněné databáze.

Úvod

Velikost populace volně žijících zvířat ovlivňuje ve světě mnoho faktorů, přičemž nejčastěji je uváděn jako hlavní faktor ohrožení člověkem a jeho činností. Dle Červeného listu IUCN je nyní ohroženo vyhynutím více jak 35 500 druhů z celého světa (IUCN, 2021). Uvádí se, že vinou člověka došlo k drastickému poklesu biodiverzity, což vyústilo v šesté masové vymírání (Ceballos et al., 2015). Pro zpomalení a zvrácení tohoto ubývání je nutné důsledně zmonitorovat příčiny ohrožení a dále pak účinnost dosavadně nastavených záchranných programů (Leu et al., 2019).

Jednou z příčin úbytku řady živočišných druhů ve volné přírodě je jejich odlov za účelem obchodu. Nelegální obchod s volně žijícími zvířaty je dokonce uváděn společně s obchodováním se zbraněmi a pašováním drog v top 3 největších byznysech na světě (WWF, 2021). Dle Sas-Rolfes et al. (2019) je ilegální obchod s volně žijícími živočichy celosvětovým politickým problémem. Nezákonný obchod se netýká pouze třídy savců, ale všech taxonomických skupin, například ptáků, plazů a obojživelníků (Sas-Rolfes, 2019). Jak doplňují Bush et al. (2014) a Zhou et al. (2014a), celosvětový ilegální obchod s volně žijícími živočichy a produkty z nich představuje jednu z nejzávažnějších hrozeb pro celosvětové populace živočichů. Za oblasti s nejvyšší mírou nelegálního obchodu s ohroženými živočichy a produkty z nich jsou považovány USA, Japonsko a Evropská unie (Knapp and Affre, 2007). V Evropské unii zřejmě sehrála roli eliminace kontrol na jejích vnitřních hranicích. Počáteční problém je však potřeba hledat spíše v rozvojových zemích, kde se vyskytuje mnoho diverzních živočichů, kteří jsou v rámci obchodu vysoce žádaní (Robinson et al., 2018).

V současné době regulaci obchodu zajišťuje velkou měrou úmluva CITES, jejíž signatáři jsou zavázáni ji dodržovat, a dále pak právní předpisy jednotlivých zemí, které více či méně přísně postihují nelegální odchyt živočichů. Významnou formou kontroly obchodu s ohroženými druhy je systém vývozních a dovozních povolení, tzv. permity CITES (Cruze and Macdonald, 2016). Jinými slovy to znamená, že u některých vybraných druhů živočichů je nutné vyplňovat tyto permity, které opravňují chovatele tyto živočichy převážet a obchodovat s nimi. Retrospektivní analýzou obchodu s CITES exempláři za 43 let (tedy od roku 1975, kdy nabyla úmluva CITES platnosti, do roku 2018) je možno zhodnotit pohyb konkrétních taxonů po světě a určit dosavadně nejčastěji obchodované exempláře.

Cílem této práce tedy bylo zhodnotit dle databáze CITES počty obchodovaných ohrožených druhů zvířat ve třídách savci, ptáci, plazi a obojživelníci, a zhodnotit vývojový trend za pozorované období, tedy zda narůstá nebo naopak klesá obchodovatelnost s určitým taxonem během sledovaného období.

Materiál a metodika

Údaje o exportovaných exemplářích byly získány z oficiální databáze CITES, která je volně dostupná na internetových stránkách (CITES Trade Database, 2021). Evidence zahrnuje data od roku 1975 do roku 2018 a obsahuje informace týkající se počtu exportovaných živých i neživých exemplářů, jejich příslušnost k třídě živočichů a jejich počty exportované i importované do příslušných zemí každý rok.

Do hodnocení byly zahrnuty všechny živé a neživé exempláře, které byly v rozmezí let 1975 až 2018 exportovány. Jednotky (ks, g, kg atd.) byly jednotně zahrnuty jako počty exemplářů. Pro statistické zhodnocení byla data rozdělena dle počtu exportovaných savců, ptáků, plazů a obojživelníků a dále byly v každé skupině vyhodnoceny počty živých a neživých exemplářů. Jako živé byly myšleny veškeré exempláře označené jako „live“, ostatní byly zahrnuty mezi neživé exempláře. Neživé exempláře zahrnovaly například kosti, kůže, rohy apod.

K vyhodnocení dat byl použit statistický program UNISTAT 6.5 for Excel (Unistat Ltd., London, UK). Vývoj počtů exportovaných exemplářů v letech 1975 až 2018 v rámci jednotlivých tříd byl posouzen pomocí Spearmanova koeficientu se stanovením koeficientu pořadové korelace. Pro statistické zhodnocení rozdílů v počtech exemplářů v rámci jednotlivých skupin s počty jedinců > 5 byl použit chí-kvadrát test s Yatesovou korekcí v rámci metodiky 2x2 kontingenčních tabulek. V případě obou použitých testů byla hodnota $p < 0,05$ stanovena jako statisticky významná.

Výsledky

Za období let 1975 až 2018 bylo celkově v rámci CITES exportováno 875 572 163 exemplářů. Tabulka č. 1. uvádí počty exemplářů ve třídách savci, ptáci, plazi a obojživelníci. Mezi všemi porovnávanými skupinami byl statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) v počtu exportovaných exemplářů.

Tabulka č. 1. Počet savců, ptáků, plazů a obojživelníků exportovaných v období let 1975 až 2018.

Třída	Počet
Savci	246 570 719 ^a
Ptáci	64 068 335 ^b
Plazi	548 108 956 ^c
Obojživelníci	16 824 153 ^d
Celkem	875 572 163

^{a-d} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

Dále byly vyhodnocovány trendy v počtech přepravovaných exemplářů z jednotlivých sledovaných tříd, tj. zda za sledované období docházelo k nárůstu či poklesu v počtech obchodovaných exemplářů nebo byl pozorován stabilní obchod s určitým taxonem.

Vývoj v počtu exportovaných exemplářů spadajících do třídy plazi, která byla nejvíce obchodovanou skupinou, za období let 1975 až 2018 znázorňuje graf č. 1.

Graf č. 1. Vývoj počtu exportovaných exemplářů ze třídy plazí za období let 1975 až 2018.



V případě exportu s exempláři plazů byl zjištěn statisticky významný nárůst v období let 1975 až 2018 ($r_{Sp} = 0,4237$, $p < 0,05$). Nejvíce exemplářů bylo exportováno v roce 1990 (23 774 549 exemplářů) a i přes mírný pokles v následujících letech je každoročně exportováno okolo 10-16 milionů exemplářů plazů ročně.

Počet živých a neživých exemplářů plazů exportovaných v letech 1975 až 2018 zobrazuje tabulka č. 2.

Tabulka č. 2. Počet živých a neživých exemplářů plazů exportovaných za období let 1975 až 2018.

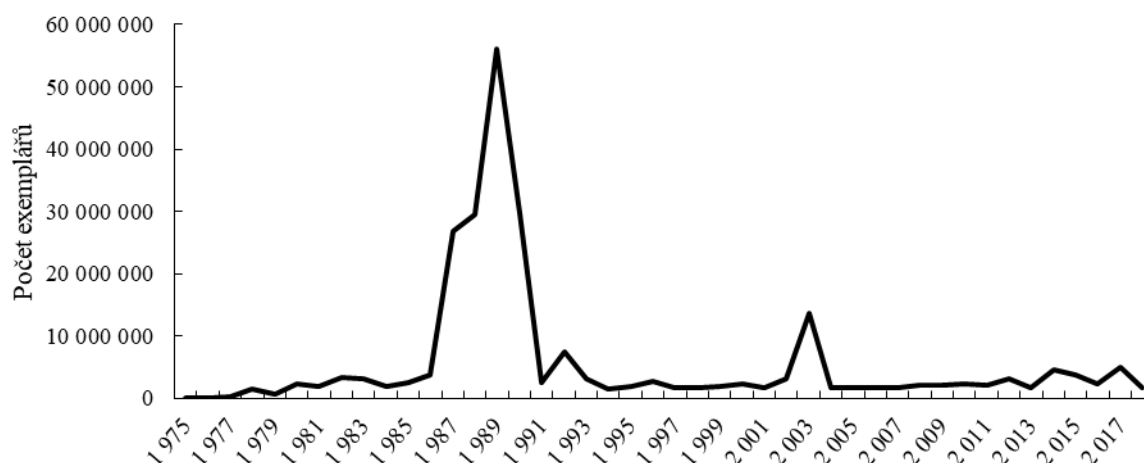
Plazi	
živý	neživý
51 129 325 ^e	496 979 631 ^f

^{e,f} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

V případě exemplářů plazů dochází k výraznému zvýšení jejich exportu za sledované období. U živých exemplářů byl potvrzen vzrůstající trend ($r_{Sp} = 0,8382$ $p < 0,05$) stejně jako u neživých ($r_{Sp} = 0,3559$ $p < 0,05$). Zatímco u neživých exemplářů je pozorován především od roku 1997 poměrně konstantní počet exportovaných exemplářů, u živých se postupně zvyšuje každým rokem ve sledovaném období s maximem v roce 2018, kdy se jednalo o 2 370 743 exportovaných živých exemplářů plazů.

Dále byl vyhodnocen trend v počtech přepravovaných exemplářů savců, a to za sledované období let 1975 až 2018. Vývoj v počtu exportovaných exemplářů spadajících do třídy savci za období let 1975 až 2018 znázorňuje Graf č. 2.

Graf č. 2. Vývoj počtu exportovaných exemplářů ze třídy savců za období let 1975 až 2018.



Za období let 1975 až 2018 došlo ke dvěma navýšením v počtu exportovaných exemplářů savců a to v období let 1987-1991 a v období let 2003-2005, jak lze vidět na grafu č. 1, celkově však nebyl prokázán vzestupný trend v počtu exportovaných exemplářů během sledovaného období ($r_{Sp} = 0,1440$, $p > 0,05$). Nejvyšší počet exportovaných exemplářů savců byl zaznamenán v roce 1989, konkrétně se jednalo o 56 152 667 exemplářů.

Počet živých a neživých exemplářů savců exportovaných v letech 1975 až 2018 uvádí tabulka č. 3.

Tabulka č. 3. Počet živých a neživých exemplářů savců exportovaných za období let 1975 až 2018.

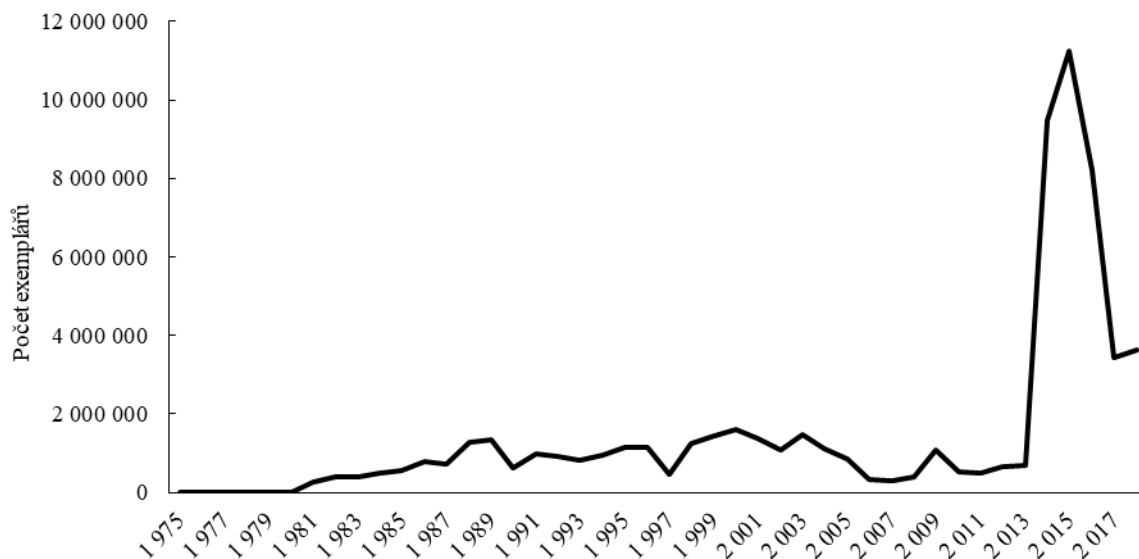
Savci	
živý	neživý
3 394 914 ^a	243 175 805 ^b

^{a,b} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

Za sledované období bylo významně více exportovaných neživých exemplářů savců. Export živých exemplářů savců obvykle nepřesahoval 50 000 exemplářů ročně s výjimkou roku 2003 (1 647 966), 2016 (57 196), 2017 (61 565) a 2018 (64 444). Za sledované období byl v případě živých exemplářů savců sledován vzestupný trend v jejich exportech ($r_{Sp} = 0,7872$, $p < 0,05$), naopak v případě neživých exemplářů nebyl vzestupný trend prokázán ($r_{Sp} = 0,1388$, $p > 0,05$).

Vývoj v počtu exportovaných exemplářů spadajících do třídy ptáci za období let 1975 až 2018 znázorňuje graf č. 3.

Graf č. 3. Vývoj počtu exportovaných exemplářů ze třídy ptáci za období let 1975 až 2018.



Výrazný nárůst počtu exportovaných exemplářů ptáků byl sledován především od roku 2013. Do roku 2013 nepřesáhl roční počet exportovaných exemplářů 2 miliony jedinců, ale například v roce 2014 se jednalo už o 9 486 292 exemplářů a v roce 2015 o 11 250 959 exemplářů, což byl také nejvyšší zaznamenaný počet exportovaných ptáků za sledované období. Během období let 1975 až 2018 byl zjištěn vzrůstající trend v počtu exportovaných exemplářů ptáků ($r_{Sp} = 0,6027$, $p < 0,05$).

Počet živých a neživých exemplářů ptáků exportovaných v letech 1975 až 2018 zobrazuje tabulka č. 4.

Tabulka č. 4. Počet živých a neživých exemplářů ptáků exportovaných za období let 1975 až 2018.

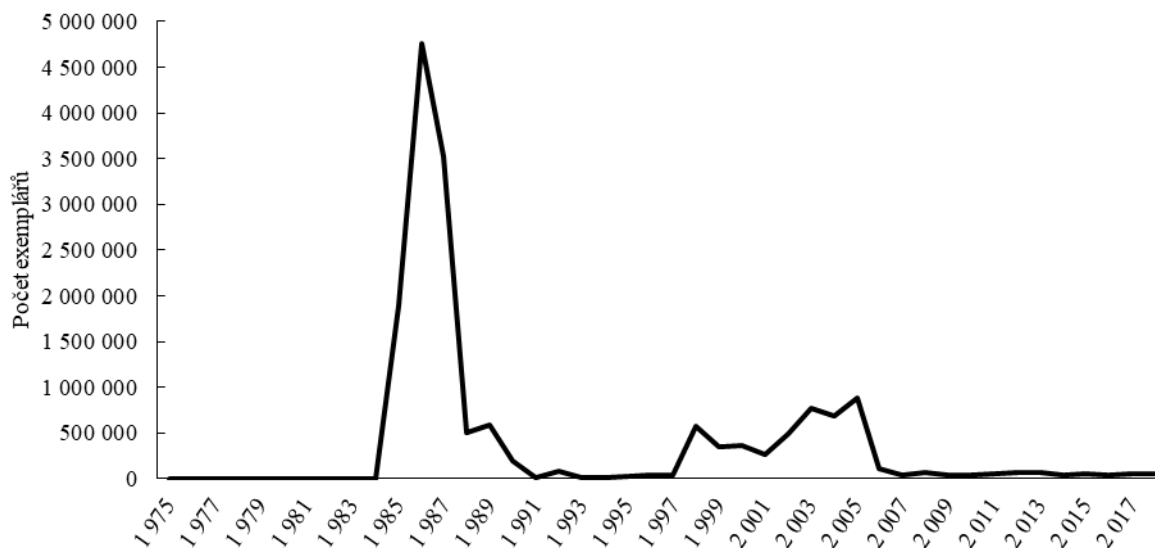
Ptáci	
živý	neživý
27 896 754 ^c	36 171 581 ^d

^{c,d} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

V případě neživých ptačích exemplářů exportovaných od roku 1975 do roku 2018 byl sledován vzrůstající trend v počtu exportovaných exemplářů ($r_{Sp} = 0,8251$, $p < 0,05$), kdy především od roku 2014 došlo k výraznému navýšení v počtech exportů. U živých exemplářů nebyl potvrzen vzrůstající trend ($r_{Sp} = 0,2764$, $p > 0,05$) za sledované období.

Vývoj počtu exportovaných exemplářů spadajících do třídy obojživelníci za období let 1975 až 2018 znázorňuje graf č. 4.

Graf č. 4. Vývoj počtu exportovaných exemplářů ze třídy obojživelníků za období let 1975 až 2018.



Exempláře obojživelníků byly nejvíce exportovány v letech 1983-1987 (s maximem v roce 1986 s počtem 4 753 512 exemplářů) a poté byl sledován mírný nárůst v období 1997-2006. Od roku 2007 nepřesahuje počet exportovaných exemplářů obojživelníků 100 000 exemplářů ročně, i přes to byl zjištěn statisticky vzrůstající trend v počtu exportovaných exemplářů obojživelníků ($r_{Sp} = 0,3774$, $p < 0,05$).

Počet živých a neživých exemplářů obojživelníků exportovaných v letech 1975 až 2018 zobrazuje tabulka č. 5.

Tabulka č. 5. Počet živých a neživých exemplářů obojživelníků exportovaných za období let 1975 až 2018.

Obojživelníci	
živý	neživý
1 272 190 ^g	15 551 963 ^h

^{g,h} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

Neživé exempláře obojživelníků jsou v rámci exportu evidovány až od roku 1980, zatímco živé exempláře byly přepravovány již od roku 1975. Nejvyšší počty exportovaných neživých exemplářů byly sledovány v období let 1983 až 1988 s maximálním počtem 4 744 842 exemplářů v roce 1986. V posledních letech jejich počet spíše klesal a v roce 2018 se jednalo o 47 680 exportovaných neživých exemplářů obojživelníků. V případě živých exemplářů byl pozorován vzrůstající trend v počtu exportovaných exemplářů během sledovaného období ($r_{Sp} = 0,8710$, $p < 0,05$), zatímco u neživých exemplářů nebyl vzrůstající trend potvrzen ($r_{Sp} = 0,2513$ $p > 0,05$).

Diskuze

Od roku 1975 do roku 2018 bylo nejčastěji obchodováno s živočichy z třídy plazi, kterých bylo přepraveno za sledované období 43 let celkem 548 108 956, jak vyplývá z databáze CITES. Dle Bush et al. (2014) bylo za období od roku 2006 do roku 2012 nejčastěji celosvětově obchodováno s ptáky, poté s plazy, nejméně často se savci. Dle našich výsledků se však za takto dlouhé období na druhém místě nejčastěji obchodovalo právě se savci. Cruze and Macdonald (2016) zase zjišťovali mezinárodní obchod s CITES druhy za období let 2010 až 2014 a zjistili, že nejčastěji bylo obchodováno s třídou plazi, přičemž se mezi nejčastěji zadržované taxonomické skupiny řadili ještěři, želvy, hadi a krokodýli. Druhou nejčastěji obchodovanou skupinou byli ptáci, zde nejčastěji papoušci, sokoli a sovy. U savců bylo nejčastěji obchodováno s primáty a šelmami a celkově se mezinárodní obchod

s nimi v průběhu čtyř sledovaných let pohyboval na třetím místě. Nejméně bylo obchodováno s obojživelníky, především s žábami (Cruze and Macdonald, 2016), což vyplývá i z naší studie, kde bylo za 43 let přepraveno 16 824 153 jedinců. Maron (2019) uvádí, že na celosvětovém trhu s volně žijícími živočichy a planě rostoucími rostlinami se zřejmě obchoduje s více než 8 000 volně žijících druhů. Jednalo by se tedy o téměř 30 % všech druhů savců, ptáků, obojživelníků a plazů.

Obchod s ohroženými druhy a jeho míra se řídí především poptávkou ze strany spotřebitelů. Dle Baker et al. (2013) je častá poptávka po exotických zvířatech pro účely zájmového chovu, pro veřejná vystoupení, pro pracovní účely nebo pouze pro vyjádření určité společenské úrovně chovatele. Neobchoduje se však pouze s živými exempláři, ale i s neživými, tedy s různými částmi těl či produkty získanými z ohrožených druhů. Tyto jsou velmi často využívány pro tradiční medicínu, pro náboženské účely, jsou využívány jako trofeje, ozdobné předměty či suvenýry.

Dle naší studie bylo u všech sledovaných tříd významně častěji obchodováno s neživými exempláři než s živými zvířaty. U plazů se jedná často o obchod pro účely módního průmyslu. Například aligátor, kajman, krajta, krokodýl a varan pokrývají 84 % obchodovaných položek za účelem zisku kůží, jak vyplývá ze studie Marshall et al. (2020) z let 2004-2019. Méně často byli obchodováni plazi živí (8-9 %), nebo pro účely potravinářského průmyslu (6 %), jako dekorace (1 %) a pro léčebné účely (1 %). Více než 35 % druhů plazů je obchodováno online a přibližně 90 % obchodovaných druhů plazů je odchycena z volné přírody (Marshall et al., 2020). Dle Rosen a Smith (2010) se v letech 1996 až 2008 nejčastěji obchodovalo s následujícími produkty ze savců: celá těla, žluč, žlučník, rohy, deriváty z rohů a další exempláře (32 %), kůže a kožesiny (27 %), sloní produkty (25 %), maso, části těl, orgány, kosti a zuby (16 %). Významnou položkou světového obchodu s CITES exempláři je slonovina. Ze studie Rosen and Smith (2010) vyplývá, že záchyty slonoviny tvořily 25 % všech výrobků ze savců. Pro zajímavost za posledních 12 let (od roku 1998 – 2010) bylo zabaveno více než 42 401,38 kg slonoviny. Za předpokladu průměrné hmotnosti klu 3,95 kg (Milliken et al., 2004) to představuje více než 5367 slonů (Rosen and Smith, 2010). Animal Welfare Institute (2021) informuje, že jsou miliony volně žijících ptáků stále nelegálně pašovány a obchodovány na černém trhu pro uspokojení poptávky obchodu se zvířaty, sběratelů a ptačích zápasů. Papoušci a další ptáci chovaní pro účely zájmového chovu představují největší skupinu volně žijících zvířat chovaných v zajetí ve Spojených státech a jsou čtvrtým nejoblíbenějším zvířetem chovaným jako domácí mazlíček - hned po psech, kočkách a rybách.

Nárůst v obchodování určitého taxonu může být podnícen i nechtěnou popularizací určitého druhu. Například byla zaznamenána zvýšená poptávka po sovách a následně vzrostl i obchod s nimi, zřejmě z důvodu popularizace v knihách o kouzelníkovi Potterovi (Hansen et al., 2012).

Dohled nad obchodem s volně žijícími živočichy je velmi důležitý i z hlediska možného monitoringu šíření nákaz se zoonotickým potenciálem. Je totiž prokázáno, že obchod s některými druhy živočichů významně usnadňuje přenos některých onemocnění (Travis et al., 2011). Jones et al. (2008) zjistili, že většina nově se objevujících infekčních onemocnění je způsobena zoonotickými patogeny a že více než 70 % z nich pochází z volně žijících zvířat. Příkladem takovýchto nákaz plynoucích z obchodu s volně žijícími zvířaty mohly být opičí neštovice, které byly v roce 2003 zavlečeny do USA, kdy byly infikované krysy obrovské (*Cricetomys gambianus*) přepravovány s domácími psouny prériovými (*Cynomys ludovicianus*), kteří poté přenesli nemoc na lidi (Guarner et al., 2004). Vyskytly se ale i další případy zoonóz, mezi něž patří vzteklina od savců, těžký akutní respirační syndrom (SARS) od malých masožravců, vysoce patogenní ptačí chřipka od ptačích druhů a chytridiomykóza od obojživelníků (Bell et al., 2004; Weldon et al., 2004; Karesh et al., 2005).

Závěr

Databáze CITES nabízí jedinečnou příležitost zhodnotit celkový obchod se savci, plazy, ptáky a obojživelníky zařazenými na seznam úmluvy CITES a určit trendy v objemu obchodu za sledované období. Ze zjištěných výsledků vyplývá, že rozsah obchodu s ohroženými druhy, který je legální a schválený dotčenými orgány, a posléze zaznamenaný v CITES Trade Database, je opravdu ohromný. Od roku 1975 do roku 2018 bylo celkem přepraveno 875 572 163 exemplářů, z toho nejvíce savců,

poté plazů, ptáků a nejméně obojživelníků. Z celkového počtu exemplářů jich bylo nejvíce neživých, ty zahrnovaly exempláře jako kosti, kůže, kožesiny, vzorky apod. Trend v obchodu s ohroženými druhy se v průběhu 43 let u savců výrazně neměnil. U plazů byl zjištěn vzrůstající trend v počtu obchodovaných jedinců, také trend v obchodování s jedinci z třídy ptáci a obojživelníci byl během sledovaného období vzrůstající. Cílem další práce bude zhodnotit důvody obchodu s jednotlivými taxony za stejné období, jejich původ a oblasti, kde jsou obchodovány. Vzhledem k rozsahu celého legálního obchodu s ohroženými druhy je v první řadě významné zpřísnit, popřípadě zcela zakázat obchod s konkrétním významně ohroženým taxonem a především zasadit se o dodržování a účinné vymáhání práva souvisejícím s regulací obchodu s ohroženými druhy ve smluvních zemích CITES.

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

Literatura

- Baker, S.E., Cain, R., van Kesteren, F., Zommers, Z.A., D'Cruze, N., Macdonald, D.W. 2013. Rough Trade: Animal Welfare in the Global Wildlife Trade. *BioScience* 63: 928-938.
- Bell, D., Robertson, S., Hunter, P.R. 2004. Animal origins of SARS coronavirus: possible links with the international trade in small carnivores. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 359: 1107-1114.
- Bush, E.R., Baker, S.E., Macdonald, D.W. 2014. Global Trade in Exotic Pets 2006–2012. *Conservation Biology* 28: 663-676.
- Ceballos, G., Ehrlich, P.R., Barnosky, A.D., García, A., Pringle, R.M., Palmer, T.M. 2015. Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Science Advances* 1: e1400253.
- CITES Trade Database. 2021. [online]. [cit. 2021-10-25]. Dostupné z: <https://trade.cites.org/>
- Cruze, N.D., Macdonald, D.W. 2016. A Review of Global Trends in CITES Live Wildlife Confiscations. *Nature Conservation* 15: 47-63.
- Dinerstein, E., Louks, C., Wikramanayake, E., Ginsberg, J., Sanderson, E., Seidensticker, J. et al. The fate of wild tigers. *BioScience* 57: 508-514.
- Guarner, J., Johnson, B.J., Paddock, C.D., Shieh, W.J., Goldsmith, C.S., et al. 2004. Monkeypox transmission and pathogenesis in prairie dogs. *Emerging Infectious Diseases* 10: 426-431.
- Hansen, A.L.S., Li, A., Joly, D., Mekaru, S., Brownstein, J.S. 2012. Digital Surveillance: A Novel Approach to Monitoring the Illegal Wildlife Trade. *Plos One* 7: e51156.
- IUCN. 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. [online]. [cit. 2021-01-11]. Dostupné z: <https://www.iucnredlist.org/>
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., et al. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451: 990-993.
- Karesh, W.B., Cook, R.A., Bennett, E.L., Newcomb, J. 2005. Wildlife trade and global disease emergence. *Emerging Infectious Diseases* 11: 1000-1002.
- Kasterine, A., Arbeid, R., Caillabet, O., Natusch, D. 2012. The trade in South-East Asian python skins. *International Trade Centre*: 1-55.
- Knapp, A., Affre, A. 2007. A Briefing Paper on Marking Techniques Used in the Control of Wildlife in the Europe Union. Brusel: Evropská Komise. ISBN 978-2-930490-01-4.
- Lawson, K., Vines, A. 2014. *Global Impacts of the Illegal Wildlife Trade: The Costs of Crime, Insecurity and Institutional Erosion*. London: The Royal Institute of International Affairs. ISBN 978-1-78413-004-6.
- Leu, M., Haines, A.M., Check, C.E., Costante, D.M., Evans, J.C., Hollingsworth, M.A., et al. 2019. Temporal analysis of threats causing species endangerment in the United States. *Conservation Science and Practice* 1: 1-11.
- Lyons, J.A., Natusch, D.J.D. 2011. Wildlife laundering through breeding farms: illegal harvest, population declines and a means of regulating the trade of green pythons (*Morelia viridis*) from Indonesia. *Biological Conservation* 144: 3073-3081.

- Maron, D.F. 2019. More species than you think are part of wildlife trade. These may be next. [online]. [cit. 2021-01-11]. Dostupné z: <https://www.nationalgeographic.com/animals/article/wildlife-trade-species>
- Animal Welfare Institute. 2021. Bird Trade. [online]. [cit. 2021-01-11]. Dostupné z: <https://awionline.org/content/bird-trade>
- Marshall, B.M., Strine, C., Hughes, A.C. 2020. Thousands of reptile species threatened by under-regulated global trade. *Nature Communications* 11: 1-12.
- McCusker, R. Transnational crime in the Pacific Islands: real or apparent danger. *Trends & Issues in Crime and Criminal Justice* 308:1-6.
- Milliken, T., Burn, R.W., Underwood, F., Sangalakula, L. 2004. The Elephant Trade Information System (ETIS) and the illicit trade in ivory: a report to the 13th meeting of the Conference of the Parties. CoP13 Doc. 29.2, Annex. CITES Secretariat, Geneva, Switzerland
- Robinson, J.E., Griffiths, R.A., Fraser, I.M., Raharimalala, J. 2018. Supplying the Wildlife Trade as a Livelihood Strategy in Biodiversity Hotspot. *Ecology and Society* 23: 1-21.
- Rosen, G.E., Smith, K.F. 2010. Summarizing the Evidence on International Trade in Illegal Wildlife. *EcoHealth* 7: 24-32.
- Sas-Rolfes, M., Challender, D.W.S., Hinsley, A., Verissimo, D., Zhou, X.H., Wan, X.T., Jin, Y.H., Zhang, W. 2016. Concept of Scientific Wildlife Conservation and Its Dissemination. *Zoological Research* 37: 270-274.
- Travis, D.A., Watson, R.P., Tauer, A. 2011. The spread of pathogens through trade in wildlife. *Revue scientifique et technique* 30: 219-239.
- Williams, V.L., Newton, D.J., Loveridge, A.J, Macdonald, D.W. 2015. Bones of contention: an assessment of the South African trade in African lion *Panthera leo* bones and other body parts. TRAFFIC, Cambridge, UK and WildCRU, Oxford, UK.
- Weldon, C., du Preez, L.H., Hyatt, A.D., Muller, R., Spears, R. 2004. Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases* 10: 2100-2105.
- WWF. 2021. Illegal wildlife trade. [online]. [cit. 2021-01-11]. Dostupné z: <https://www.worldwildlife.org/threats/illegal-wildlife-trade>
- Zhou, Z.M., Zhou, Y., Newman, C., Macdonald, D.W. 2014a, Scaling up pangolin protection in China. *Frontiers in Ecology and the Environment* 12: 97-98.
- Zhou, Z.M., Zhou, Y., Newman, C., Macdonald, D.W. 2014b. Synthetic ivory fails to stop illegal trade. *Nature* 507: 40.

Analýza obchodu s CITES exempláři v České republice za období let 1992 až 2018

Martina Volfová, Gabriela Lukešová, Eva Voslášková, Vladimír Večerek

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

Abstrakt

CITES Trade Database umožňuje posuzovat obchod s ohroženými druhy chráněnými úmluvou CITES o regulaci obchodu s nimi. Cílem této studie bylo analyzovat obchod s exempláři CITES na území ČR za 27 let, tedy od roku 1992 do roku 2018. Konkrétně byly určeny počty obchodovaných exemplářů (živých i neživých), byly vyhodnoceny vývojové trendy v počtech přepravovaných exemplářů za sledované období, a zhodnocena místa exportu a importu. Bylo zjištěno, že nejvíce obchodovanou třídou živočichů na území ČR jsou plazi, poté ptáci, obojživelníci a nejméně často je obchodováno se savci. U plazů byl prokázán vzestupný trend v počtech obchodovaných exemplářů jak u importu, tak i exportu. U ptáků, jako druhé nejčastěji obchodované třídy v ČR, byl prokázán vzestupný trend pouze u exportů. U obojživelníků došlo za pozorované období naopak k nárůstu počtu importů, především v posledních letech. Poslední, nejméně obchodovanou skupinou, byli savci, u kterých byl během 27 let pozorován stabilní trend v počtech přepravovaných jedinců. Celkem se častěji jednalo o vývoz exemplářů z ČR (636 059 exemplářů) než o jejich dovoz do ČR (497 820). Exempláře byly nejčastěji vyváženy do Asie, importovány do ČR byly v největší míře ze Severní Ameriky.

Úvod

V roce 1992 se stala Česká republika, tehdy ještě jako Československo, signatářem úmluvy CITES, která zavazuje všechny smluvní země regulovat obchod s ohroženými druhy zvířat a mimo jiné evidovat legální obchod s ohroženými druhy do celosvětové databáze CITES. Hlavním kontrolním úřadem ve věci regulace obchodu s ohroženými druhy je v České republice Česká inspekce životního prostředí, která společně s celními úřady dozoruje dodržování úmluvy CITES implementované do evropské (především Nařízení Rady (ES) č. 338/97 ze dne 9. prosince 1996 o ochraně druhů volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin regulováním obchodu s nimi) a národní legislativy (zákon č. 100/2004 Sb.).

Česká republika je považována za světovou velmoc v obchodování s ohroženými druhy zvířat. Důvodem není pouze velká obliba Čechů v chovu zájmových zvířat obecně, ať už těch běžných domácích druhů nebo exotických často ohrožených druhů, ale velkou roli bude hrát i poloha České republiky, která je jako střed Evropy velmi výhodnou tranzitní zemí (ČIŽP, 2008). Bohužel je známo, že Česká republika se často podílí na ilegálním obchodu s ohroženými druhy zvířat (ČIŽP, 2008). Například největší počet pašovaných zvířat registrovaných Interpolem byl nalezen právě u českých občanů (ČIŽP, 2008). Velikost legálního obchodu je na základě dostupných dat tedy poměrně lehce zjištěitelná, míra nelegálního obchodu se však dá pouze odhadovat (Hansen et al., 2012).

Cílem této studie bylo určit počty obchodovaných exemplářů (živých i neživých) za 27 let (od roku 1992 do roku 2018) na území ČR, vyhodnotit vývojové trendy v počtech přepravovaných exemplářů za sledované období, a zhodnotit místa exportu (tedy oblasti, do kterých byly exempláře z ČR vyvezeny) a importu (oblasti, odkud byly exempláře do ČR dovezeny).

Materiál a metodika

Údaje o pohybu exemplářů na území ČR byly získány z oficiální databáze CITES, která je volně přístupná na internetových stránkách (CITES Trade Database, 2021). Evidence zahrnuje data od roku 1992 (kdy se stala Česká republika signatářem Úmluvy CITES) do roku 2018 a informuje o počtech exportovaných a importovaných živých i neživých exemplářích ze tříd savců, ptáků, plazů a obojživelníků obchodovaných na našem území.

Získaná data byla rozdělena dle počtu exportovaných savců, ptáků, plazů a obojživelníků a dále byly v každé skupině vyhodnoceny počty živých a neživých exemplářů. Jako živé byly myšleny veškeré exempláře označené jako „live“, ostatní byly zahrnuty mezi neživé exempláře. Neživé exempláře zahrnovaly například kosti, kůže, rohy apod. Jednotky (ks, g, kg atd.) byly jednotně zahrnuty jako počty exemplářů.

Pro vyhodnocení míst exportu (tedy zemí, do kterých byly exempláře z ČR vyvezeny) a importu (zemí, odkud byly exempláře do ČR dovezeny), byly sledované země rozděleny do skupin: Afrika, Severní Amerika, Jižní Amerika, Evropa, Asie, Rusko, Austrálie a neznámé (v databázi nebyla uvedena konkrétní země).

Ke statistickému vyhodnocení dat byl použit program UNISTAT 6.5 for Excel (Unistat Ltd., London, UK). Pro statistické zhodnocení rozdílů v počtech exemplářů v rámci jednotlivých skupin s počty jedinců > 5 byl použit chí-kvadrát test s Yatesovou korekcí v rámci metodiky 2x2 kontingenčních tabulek. Vývoj v počtech exportovaných nebo importovaných exemplářů v letech 1992 až 2018 v rámci jednotlivých tříd na území ČR byl posouzen pomocí Spearmanova koeficientu se stanovením koeficientu pořadové korelace. V případě obou použitých testů byla hodnota $p < 0,05$ stanovena jako statisticky významná.

Výsledky

Za období let 1992 až 2018 bylo z České republiky exportováno celkem 636 059 exemplářů. Tabulka č. 1. uvádí počty exemplářů náležících k jednotlivým třídám, mezi kterými byl statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) v počtu exportovaných exemplářů. Tabulka č. 2. uvádí počty exemplářů z České republiky importovaných, kde byl rovněž mezi jednotlivými třídami pozorován statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) v počtu importovaných exemplářů dle jednotlivých tříd. Celkově bylo za 27 let z ČR importováno 497 820 exemplářů.

Tabulka č. 1. Počet savců, ptáků, plazů a obojživelníků exportovaných z České republiky v období let 1992 až 2018.

Třída	Počet
Savci	10 598 ^a
Ptáci	410 323 ^b
Plazi	192 921 ^c
Obojživelníci	22 217 ^d
Celkem	636 059

^{a-d} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

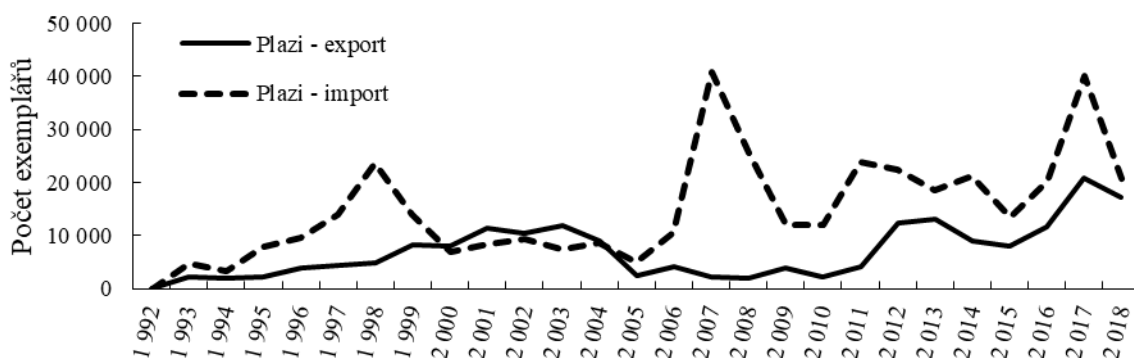
Tabulka č. 2. Počet savců, ptáků, plazů a obojživelníků importovaných do České republiky v období let 1992 až 2018.

Třída	Počet
Savci	8 772 ^a
Ptáci	79 817 ^b
Plazi	404 660 ^c
Obojživelníci	4 571 ^d
Celkem	497 820

^{a-d} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

Nejvíce obchodovanou třídou v období let 1992 až 2018 byli na území ČR plazi. Významně více ($p < 0,01$) bylo zaznamenáno importů (68 %) než exportů, jak lze vidět v průběhu sledovaného období i na grafu č. 1.

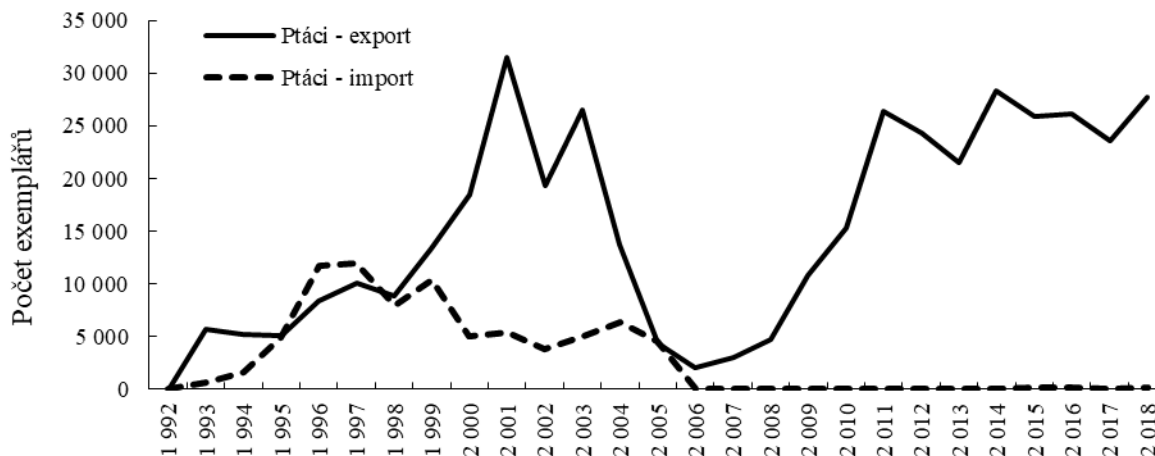
Graf č. 1. Vývoj v počtech exportovaných a importovaných exemplářů ze třídy plazi v rámci České republiky za období let 1992 až 2018



Při importu byl prokázán vzestupný trend ($r_{Sp} = 0,6624$, $p < 0,05$) v počtech plazů přivezených do ČR, nejvyšší počty importovaných exemplářů plazů byly zaznamenány v roce 2007 (40 841 exemplářů) a v roce 2017 (40 208 exemplářů). U exportů bylo maximum zaznamenáno v roce 2017 (20 890 exemplářů). I zde byl prokázán vzestupný trend v počtu exportovaných exemplářů plazů během sledovaného období ($r_{Sp} = 0,5812$, $p < 0,05$).

Druhou hojně obchodovanou skupinou v ČR byli ptáci. Těch bylo za sledované období importováno nebo exportováno celkem 490 140. U ptáků bylo mnohem více jedinců exportováno z ČR (84 %). Během sledovaného období byl pozorován významný nárůst ($r_{Sp} = 0,5757$, $p < 0,05$) v počtu exemplářů ptáků exportovaných z České republiky do jiných zemí, jak zobrazuje graf č. 2.

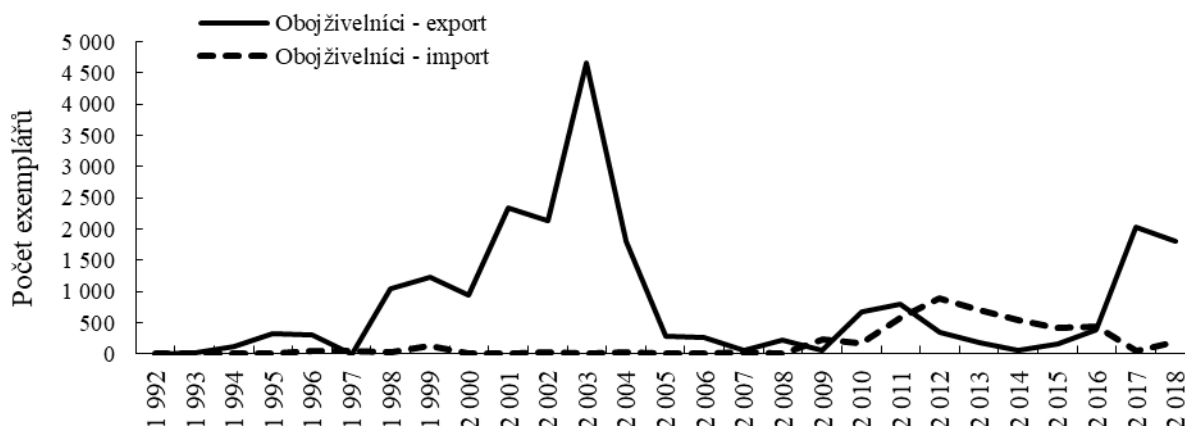
Graf č. 2. Vývoj počtu exportovaných a importovaných exemplářů ptáků v rámci České republiky za období let 1992 až 2018.



K vývozu těchto exemplářů došlo výrazněji více v letech 1999 až 2004, s maximem v roce 2001 (31 498 exemplářů) a po následném poklesu v počtu vyvážených exemplářů ptáků došlo opět k nárůstu od roku 2009 s maximálním počtem exportů v roce 2014 (28 381 exportovaných ptačích exemplářů). V případě importovaných ptáků do České republiky byly zaznamenány vyšší počty v období let 1993 až 2005, s maximem v roce 1996 (11 712 exemplářů) a v roce 1997 (11 983 exemplářů), poté došlo k výraznému poklesu v počtu importovaných ptáků, který byl také statisticky prokázán ($r_{Sp} = -0,5049$, $p < 0,05$). Nejméně evidovaných importovaných exemplářů ptáků bylo v roce 2006 (4 exempláře) a v roce 2014 (5 exemplářů).

Za sledované období bylo celkem obchodováno s 26 788 obojživelníky. Ve velké většině případů (83 %) byly exempláře obojživelníků exportovány z ČR. Počty exportů a importů obojživelníků a jejich vývoj během sledovaného období zobrazuje graf č. 3.

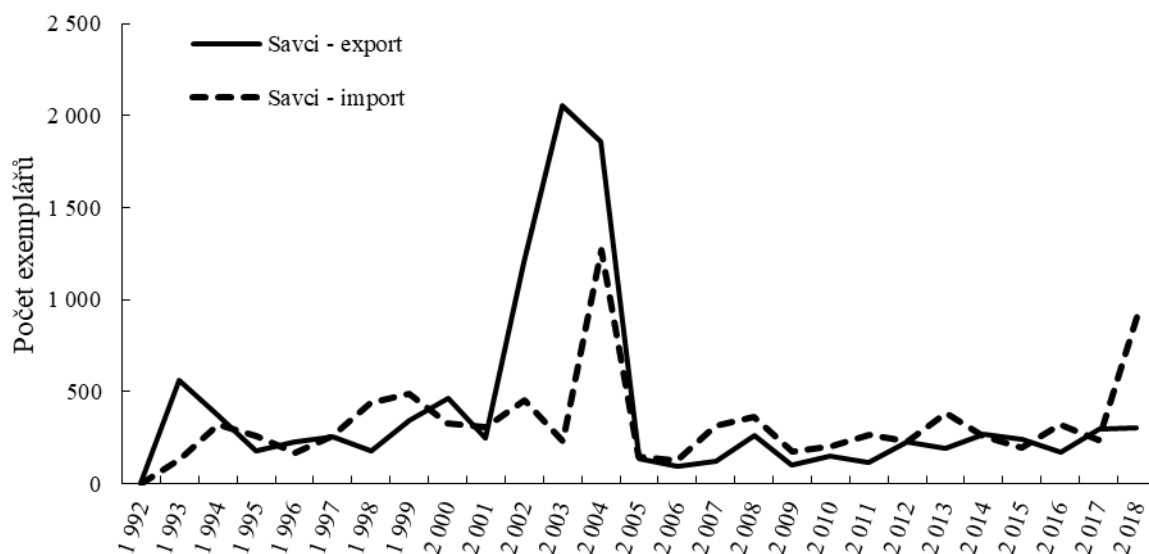
Graf č. 3. Vývoj počtu exportovaných a importovaných exemplářů ze třídy obojživelníků v rámci České republiky za období let 1992 až 2018.



Exempláře obojživelníků byly ve výrazně vyšším počtu z České republiky exportovány než importovány, avšak za celé sledované období nebyl prokázán vzrůstající trend v počtu exportovaných obojživelníků ($r_{Sp} = 0,1801$, $p > 0,05$). Naopak u importovaných exemplářů byl prokázán nárůst především ke konci sledovaného období ($r_{Sp} = 0,7001$, $p < 0,05$). Nejvyšší počet exportovaných exemplářů byl sledován v roce 2003 (4 650 exemplářů), naopak importovaných bylo nejvíce v roce 2012, kdy se jednalo o 894 exemplářů obojživelníků.

V případě exemplářů savců byl jak v případě importu, tak i exportu, pozorován stabilní trend v počtech přepravovaných exemplářů za sledované období (import: $r_{Sp} = 0,1420$, $p > 0,05$; export: $r_{Sp} = -0,1343$, $p > 0,05$). Nejvíce savců bylo do ČR importováno v roce 2004 (1 269 exemplářů), v roce 2003 pak bylo zaznamenáno nejvíce exemplářů savců exportovaných z České republiky do jiných zemí (2 055). Počty exportovaných a importovaných exemplářů savců v průběhu hodnoceného období jsou zobrazeny na grafu č. 4.

Graf č. 4. Vývoj počtu exportovaných a importovaných exemplářů ze třídy savců v rámci České republiky za období let 1992 až 2018.



Exempláře všech čtyř hodnocených tříd byly exportovány nebo importovány do oblastí Asie, Evropa, Rusko, Severní a Jižní Amerika, Afrika a Austrálie. V databázi se objevovaly i záznamy přeprav a oblast byla označena jako neznámá, proto je tato kategorie pro úplnost také ve výsledcích

uvedena, byť se jedná o minimální počty exemplářů z celkového počtu. Konkrétní počty přepravovaných exemplářů do jednotlivých oblastí uvádí tabulka č. 3 (pro exporty) a tabulka č. 4 (pro importy).

Tabulka č. 3. Počet exemplářů exportovaných z České republiky do jednotlivých oblastí za období let 1992 až 2018.

Oblast	Počet
Asie	426 618 ^a
Evropa	181 179 ^b
Rusko	10 531 ^d
Severní Amerika	67 745 ^c
Jižní Amerika	629 ^f
Afrika	1 027 ^e
Austrálie	12 ^h
Neznámé	71 ^g

^{a-h} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

Tabulka č. 4. Počet exemplářů importovaných do České republiky z jednotlivých oblastí za období let 1992 až 2018

Oblast	Počet
Asie	63 780 ^c
Evropa	45 628 ^d
Rusko	11 694 ^f
Severní Amerika	254 792 ^a
Jižní Amerika	20 134 ^e
Afrika	123 492 ^b
Austrálie	1 264 ^g
Neznámé	366 ^h

^{a-h} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

Jak dokládají výsledky, nejvíce exemplářů bylo z České republiky exportováno do Asie, naopak nejméně do Austrálie. Nejčastěji se exempláře do České republiky dovážely ze Severní Ameriky, v nejmenším počtu byly dováženy z Austrálie.

Diskuze

Dle zjištěných výsledků bylo za 27 sledovaných let obchodováno na území České republiky s velkým množstvím exemplářů, konkrétně se jednalo o 1 133 879 exemplářů. Především se jednalo o exempláře z třídy plazi a ptáci. Tento výsledek dokládají také některé zahraniční studie, např. Bush et al. (2014) uvádějí, že bylo během let 2006 – 2012 nejčastěji celosvětově obchodováno s ptáky, poté s plazy. Ke stejným výsledkům došli i Cruze and Macdonald (2016), kteří zjišťovali mezinárodní obchod s CITES exempláři za období let 2010 až 2014.

Česká republika je považována za světovou velmoc v chovu zájmových zvířat a také v jejich pašování. Stala se totiž velmi významnou tranzitní i cílovou zemí pro obchod s ohroženými druhy živočichů (ČIŽP, 2008). Situace se výrazně změnila po roce 1997, kdy došlo zpřísněním legislativy k výraznému poklesu počtu nelegálně držených zvířat, a to díky přísnějším kontrolám na hranicích, povinným registracím exemplářů a pravidelné kontrole na místních trzích a při prodeji. Jak potvrzuje Česká inspekce životního prostředí (2008), největší počet pašovaných zvířat registrovaných

Interpolem byl nalezen na českém území. Pro představu, Polsko s rozlohou 312 685 km² zaznamenalo v roce 2000 celkem 1097 živých a 491 neživých exemplářů obchodovaných na jejich území ilegálně, Slovensko s rozlohou 48 845 km² celkem 131 živých exemplářů a žádný neživý a Česká republika za stejný rok evidovala 31 653 živých a 1588 neživých ilegálně pašovaných exemplářů, přitom má rozlohu 78 866 km². Například Litva, podobně velký stát jako ČR (rozloha 65 200 km²) zaznamenala v roce 2004 pouze 4 živé ilegálně obchodované jedince a do 30 kg kaviáru. Data z roku 2000 bohužel nejsou známa (Kecse-Nagy et al., 2006).

Jak uvádějí Kecse-Nagy et al. (2006), Česká republika a Malta byly zdaleka nejdůležitějšími importéry živých ptáků zařazených na seznam CITES ze zemí EU, konkrétně se jednalo o 60 000 a 78 000 živých ptáků zařazených na seznam CITES dovezených během osmi let. Česká republika byla také největším vývozcem živých ptáků zařazených na seznam CITES. Kromě toho byla Česká republika také největším vývozcem živých plazů zařazených na seznam CITES. Konkrétně bylo z ČR vyvezeno více než 10 000 exemplářů plazů a dovezeno více než 85 000 živých plazů zařazených na seznam CITES a vyvezla (včetně reexportů) více než 61 000 živých plazů. Dalšími významnými vývozci živých plazů zařazených na seznam CITES byly Slovensko a Slovinsko s přibližně 24 000 a 17 700 živými plazy v letech 1996-2003.

Dle dat z let 1992 až 2018 bylo zjištěno, že exempláře jsou nejčastěji exportovány z ČR do Asie a poté v rámci Evropy, na třetím místě je uvedena Severní Amerika. Naopak nejčastěji byly exempláře importovány do ČR ze Severní Ameriky, Afriky a Asie. Ve vědeckých studiích se významná role připisuje také Blízkému východu a Jižní Americe (Cruze and Macdonald, 2016).

Sinclair et al. (2021) uvádějí ve své studii 5 největších dovozců a vývozců exemplářů savců, ptáků, plazů, obojživelníků a ryb během let 1999 až 2013. Česká republika je zde zmíněna jako třetí největší importující nebo exportující země přepravující savce, po Guyaně a Kanadě.

Závěr

Analýza obchodu s CITES exempláři na území ČR za 27 let nabízí jedinečnou příležitost posoudit obchod s jednotlivými třídami živočichů zařazenými na seznam CITES. Bylo zjištěno, že nejvíce obchodovanou třídou živočichů na území ČR jsou plazi, poté ptáci, obojživelníci a nejméně bylo zaznamenáno přeprav savců. Častěji se jednalo o export zvířat, než o jejich import. Exempláře byly nejčastěji vyváženy do Asie, importovány do ČR byly v největší míře ze Severní Ameriky. Jak bylo řečeno, Česká republika se řadí v obchodu s ohroženými druhy na přední příčky, zpříšňování legislativy souvisejícím s držením ohrožených druhů a především co nejjednodušší aplikace práva do praxe v oblasti kontroly a monitoringu ilegálních aktivit povede jednoznačně ke zlepšení dané situace.

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

Literatura

- Bush, E.R., Baker, S.E., Macdonald, D.W. 2014. Global Trade in Exotic Pets 2006–2012. *Conservation Biology* 28: 663-676.
- CITES Trade database. 2021. [online]. [cit. 2021-10-25]. Dostupné z: <https://trade.cites.org/>
- Cruze, N.D., Macdonald, D.W. 2016. A Review of Global Trends in CITES Live Wildlife Confiscations. *Nature Conservation* 15: 47-63.
- ČIŽP. 2008. Smuggled pleasure: The Czech Republic: a smuggling world power? [online]. [cit. 2021-11-11]. Dostupné z: <https://www.cizp.cz/file/PR2/011346.pdf>
- Hansen, A.L.S., Li, A., Joly, D., Mekaru, S., Brownstein, J.S. 2012. Digital Surveillance: A Novel Approach to Monitoring the Illegal Wildlife Trade. *Plos One* 7: e51156.
- Kecse-Nagy, K., Papp, D., Knapp, A., von Meibom, S. 2006. Wildlife trade in Central and Eastern Europe. A review of CITES implementation in 15 countries. TRAFFIC Europe report, Budapest, Hungary.
- Nařízení Rady (ES) č. 338/97 ze dne 9. prosince 1996 o ochraně druhů volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin regulováním obchodu s nimi.

Sinclair, J.S., Stringham, O.C., Udell, B., Mandrak, N.E., Leung, B., Romagosa, CH.M., Lockwood, J. 2021. The International Vertebrate Pet Trade Network and Insights from US Imports of Exotic Pets, *BioScience* 71: 977-990.

WWF. 2021. Illegal wildlife trade. [online]. [cit. 2021-01-11]. Dostupné z: <https://www.worldwildlife.org/threats/illegal-wildlife-trade>

Zákon č. 100/2004 Sb., o ochraně druhů volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin regulováním obchodu s nimi a dalších opatřeních k ochraně těchto druhů a o změně některých zákonů (zákon o obchodování s ohroženými druhy). [online]. [cit. 2021-11-11]. Dostupné z: <https://obchod.wolterskluwer.cz/cz/zakon-o-obchodovani-s-ohrozenymi-druhy-100-2004-sb-komentar.p5609.html>

Posouzení dopadu kontaminace vodního prostředí rtutí na zdraví živočichů vázaných na vodu na základě hodnocení obsahu rtuti u kormorána velkého

Kamila Novotná¹, Zuzana Široká¹, Tomáš Král¹, Piotr Gomulka², Anna Spodniewska³ Zdeňka Svobodová¹

¹Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI Brno, ČR,

²Ústav Ichtyologie a akvakultury, Fakulta bioinženýringu zvířat, Univerzita Warmia a Mazury v Olsztyně, Polsko, ³Ústav farmakologie a toxikologie, Fakulta veterinární medicíny, Univerzita Warmia a Mazury v Olsztyně, Polsko

Abstrakt

Práce se zabývá hodnocením rtuti v orgánech kormoránů pocházejících ze dvou lokalit v Polsku. Ve třech orgánech (játra, ledviny a svalovina) u celkem 45 dospělých jedinců byl stanoven obsah celkové rtuti metodou AAS. Na lokalitě Krogulna (rybářská farma) průměrný obsah rtuti klesal následovně: ledviny>játra>svalovina ($1,39\pm 1,55$ mk.kg⁻¹; $1,33\pm 1,06$ mk.kg⁻¹; $0,58\pm 0,38$ mk.kg⁻¹) a na lokalitě Nysa Kłodzka ve stejném pořadí byly průměrné hodnoty následovně: $3,12\pm 1,51$ mk.kg⁻¹; $2,28\pm 0,87$ mk.kg⁻¹; $1,09\pm 0,4$ mk.kg⁻¹). Průměrný obsah rtuti u kormoránů z lokality Krogulna je vysoce významně nižší ve všech orgánech oproti lokalitě Nysa Kłodzka a to i přesto, že obě lokality jsou považovány za rtutí nezátížené. Rozdílné hodnoty obsahu rtuti jsou tak dány odlišnou stravou, kdy na lokalitě Krogulna je převážně rybí obsádka tvořena kaprem obecným, kdežto na lokalitě Nysa Kłodzka je obsádka různých druhů ryb, a to jak dravých, nedravých i všežravých.

Úvod

Podle Agentury pro toxické látky a onemocnění (ATSDR) a taktéž podle Světové zdravotnické organizace (WHO) patří rtuť mezi deset nejvýznamnějších toxických látek, které se vyskytují v životním prostředí a které jsou nebezpečné pro zdraví (Wang, 2012). Jde o přirozeně se vyskytující prvek, který je uvolňován ze zemské kůry do prostředí v důsledku mnoha činností, např. těžba zlata, spalování fosilních paliv, produkce chemických látek, vulkanická činnost aj. (EEA report, 2018).

Přestože jsou všechny formy rtuti toxické, přesný účinek na organismus člověka a zvířat záleží na konkrétní chemické formě a sloučenině, dávce a místu vstupu do organismu. Absorpce je možná inhalací či požitím a hlavními zdroji rtuti jsou pro člověka a zvířata voda a potrava. Vstřebávání kůží je z hlediska toxicity nepodstatné. Vdechování rtuti také není pro obyvatele a zvířata v Evropě podstatnou cestou vstupu, ovšem kontaminace půdy, vodního prostředí a následně i potravního řetězce je úzce spojena se znečištěním ovzduší rtutí, přičemž více než 50 % této rtuti, která se ročně uloží v Evropě, pochází ze zemí mimo Evropu a přichází dálkovým transportem, tzv. globálním cyklem rtuti (EEA report, 2018). Na druhé straně, zvířata jako např. ptáci, kteří migrují na velké vzdálenosti, tráví dlouhé dny a týdny v těchto vzdušných masách a tak jsou exponováni rtuti i v této podobě, což má pravděpodobně vliv na jejich zdraví.

Rtuť nacházená jako důsledek přirozené a antropogenní kontaminace v řekách, jezerech a oceánech představuje velké riziko pro mnoho organismů včetně dravých a rybožravých ptáků. Elementární rtuť a její anorganické sloučeniny se stále používají v průmyslu a v podobě odpadních vod kontaminují vodní prostředí. Zde jsou přeměněny mikroorganismy sedimentů na vysoce toxickou sloučeninu organického charakteru, na tzv. metylrtuť. Její produkce je ovlivněna mnoha faktory, jako je např. teplota vody, která ovlivňuje metabolickou aktivitu mikroorganismů, a tak se liší mezi jednotlivými lokalitami (Kaler et al. 2014). Methylrtuť je výrazně lipofilní a je velmi snadno absorbována do planktonu i vyšších organismů a takto rychle inkorporována do potravního řetězce, kde dochází k její kumulaci v průběhu věku konzumenta, a u predátorů dokonce i k její biomagnifikaci (Klapstein and O'Driscoll, 2018).

Jak akutní, tak chronická expozice rtuti a jejím sloučeninám vyústí v poškození zdraví. Mezi nejtypičtější postižení patří změny v nervovém systému, poškození ledvin, kardiomyopatie a arytmie.

Velmi citlivá jsou mláďata a embrya a jejich expozice je spojována s teratogenitou a vznikem vývojových vad (Harari et al., 2012; Karagas et al., 2012). U ptáků jsou popisovány efekty jako snížená reprodukční schopnost (Burger and Gochfeld, 1997; Evers et al., 2008), změny v teritoriálním chování a migraci či poruchy inkubace (Furness et al., 1986; Evers et al., 2008) a u orlů bělohavých i poškození CNS a nervové příznaky (Rutkiewicz et al., 2011).

Jak již bylo uvedeno, hlavním rezervoárem rtuti jsou ryby a další vodní živočichové. Rybožraví ptáci, kteří mají ryby a vodní organismy jako hlavní zdroj potravy jsou tak vysoce ohroženi akumulací až biomagnifikací rtuti a jejím zdravotním následkům (Dong-Ha et al., 2005). Obsah rtuti v rybách je variabilní a reflektuje kontaminaci daného vodního zdroje. Tím pádem i rybožraví ptáci mohou být kontaminováni podle lokality, kde nejčastěji získávají svou potravu. Navíc mnoho z nich patří i mezi migrující druhy, a tak se mohou obsahy rtuti v jejich tkáních měnit podle ročního období a místa pobytu. Jako predátoři a vrcholové články potravního řetězce pak mohou sloužit jako vhodné bioindikátorové organismy pro posouzení kontaminace rtutí v čase a prostoru pro jednotlivé ekosystémy a lokality, a koncentrace rtuti v jejich tkáních také odkazuje na zdravotní stav a welfare těchto ptáků (Furtado et al., 2019).

Cílem této studie bylo stanovit obsah celkové rtuti ve svalovině, játrech a ledvinách kormoránů odlovených na dvou lokalitách v Polsku a zjistit, zda je rozdíl v obsahu rtuti u kormoránů mezi sledovanými lokalitami. Dílčím cílem bylo i zhodnotit obsah rtuti mezi jednotlivými orgány v rámci jedné lokality a tedy distribuci rtuti v organismu.

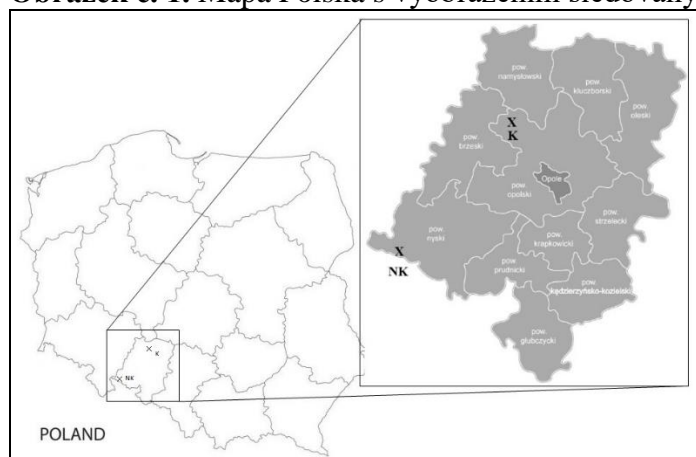
Materiál a metodika

Sledované lokality

V této studii byly sledovány dvě lokality, a to Krogulna a Nysa Kłodzka v Polsku, jejichž poloha je vyznačena na obr. 1. První lokalitou je Krogulna (K), jedná se o soubor rybníků pro chov kaprů a je situován ve stejnojmenné vesnici Krogulna, která leží 40 km od Opole a 17 km od města Namysłów. Farma patří pod organizaci *Regionalna Dyrekcja Lasów Państwowych in Katowice*. Hlavní aktivitou farmy je chov sladkovodních ryb, zejména kaprů. Rybníky jsou součástí lesního ekosystému v oblasti Krogulna (www.krogulna.pl). Druhou lokalitou je řeka Nysa Kłodzka (NK), která je situována na severozápadě Polska, jedná se o levý přítok řeky Odry. Odběrové místo bylo lokalizováno pod nádrží Nysa. Přehrada je spravována organizací *Polish Angling Association*.

Obě lokality jsou považovány za rtutí nezatížené lokality, žádný zdroj rtuti zde není znám ani z továren ani z jiné lidské činnosti. Obě lokality jsou od sebe vzdálené cca 65 km vzdušnou čarou.

Obrázek č. 1. Mapa Polska s vyobrazením sledovaných lokalit



K= Krogulna; NK= Nysa Kłodzka

Kormoráni (*Phalacrocorax carbo*)

Celkem 45 dospělých (2-3 roky) kormoránů (20 z Krogulny a 25 z řeky Nysa Kłodzka) bylo odstřeleno rybáři z *Regionalna Dyrekcja Ochrony Środowiska* s příslušným povolením polské policie.

Z každého kormorána byly během pitvy odebrány tři tkáně: játra, ledviny a svalovina. Celkem 135 vzorků bylo označeno a vloženo do polyethylenových sáčků a zmrazeno a uchováváno při -22 °C až do analýzy celkové rtuti.

Analýza celkové rtuti (THg)

Celková rtuť byla stanovena metodou atomové absorpční spektrometrie na přístroji AMA 254 (Altec Ltd. Dvůr Králové nad Labem, Česká republika). Při samotné analýze byly jednotlivé vzorky bez předchozí přípravy po rozmrznutí naváženy a vloženy do spalovací lodičky přístroje AMA 254 k analýze. Limit detekce přístroje je $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Přesnost měření byla validována za pomoci referenčního materiálu NIST- 2976 (Mussle Tissues). Obsah celkové rtuti je vyjádřen v mg.kg^{-1} čerstvé tkáně.

Data a statistická analýza

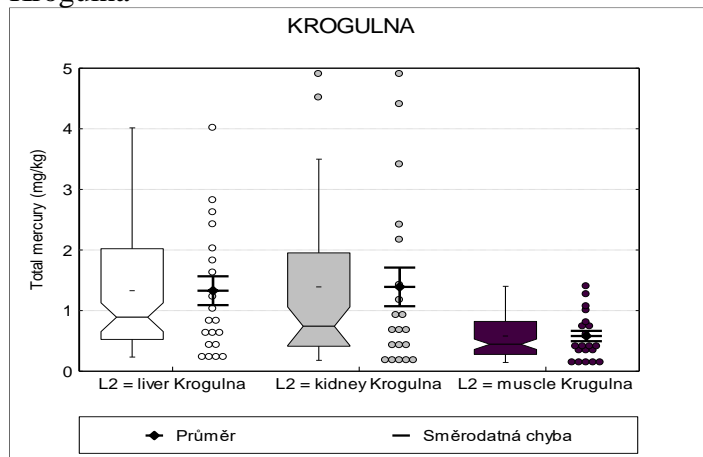
Zjištěná data byla zpracována do tabulek za pomoci programu Microsoft Word a Microsoft Excel (MS Office 365) a statistická analýza byla provedena v programu Unistat for Excel 6.5. Nejdříve byla data jednotlivých skupin podrobena testu normality (Shapiro-Wilkův test). Jednalo se o data s nenormálním rozdělením, tudíž byly použity neparametrické testy. Pro hodnocení obsahu rtuti mezi lokalitami byl použit Mann-Whitneův test a pro hodnocení obsahu rtuti v jednotlivých orgánech mezi sebou v rámci jedné lokality byla použita Kruskal Wallis jednofaktorová ANOVA-Tukey HSD test.

Výsledky

Krogulna

Obsah celkové rtuti u jednotlivých vzorků tkání kormoránů je zobrazen v grafu č. 1. Průměrný obsah pro jednotlivé tkáně kormoránů odchycených na lokalitě Krogulna je zobrazen v tabulce č. 1. Průměrný obsah je nejnižší ve svalovině ($0,58 \pm 0,38 \text{ mg.kg}^{-1}$), dále v játrech ($1,33 \pm 1,063 \text{ mg.kg}^{-1}$) a nejvyšší v ledvinách ($1,39 \pm 1,42 \text{ mg.kg}^{-1}$). Nejvyšší nalezená hodnota rtuti byla v ledvinách a to $4,9 \text{ mg.kg}^{-1}$, naopak nejnižší pak ve svalovině $0,145 \text{ mg.kg}^{-1}$.

Graf č. 1. Obsah celkové rtuti v jednotlivých vzorcích ve třech tkáních kormorána velkého v lokalitě Krogulna



Liver=játra; kidney= ledviny; muscle= svalovina

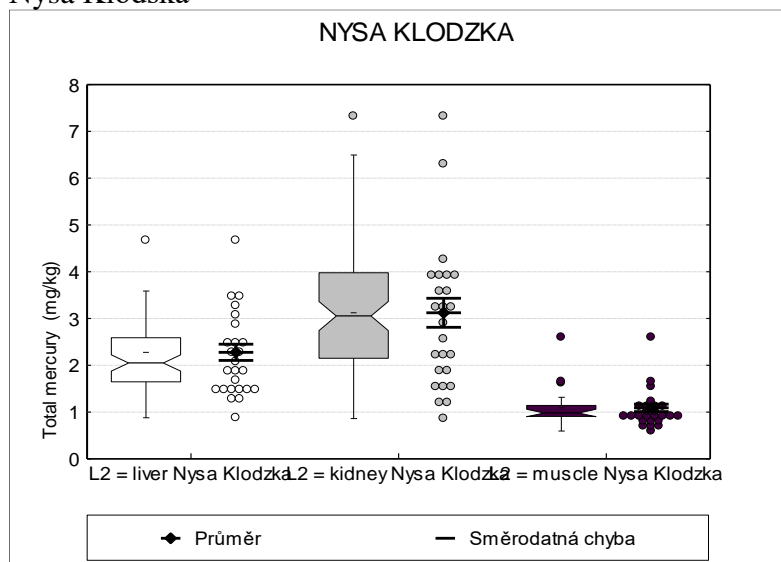
Podle zjištěných výsledků se rtuť akumuluje v orgánech kormorána nejvíce v játrech a ledvinách, což jsou hlavní detoxikační orgány. Obsah rtuti mezi ledvinami a játry se významně neliší ($p=0,8932$). Při porovnání obsahu rtuti v játrech a svalovině je významně vyšší obsah rtuti v játrech ($p=0,0376$). V případě porovnání obsahu rtuti ve svalovině a ledvinách nenajdeme významný rozdíl ($p=0,112$).

Nysa Kłodzka

V lokalitě Nysa Kłodzka bylo analyzováno celkem 25 kormoránů a jednotlivé výsledky analýz obsahu rtuti jsou uvedeny v grafu č. 2. Nejnižší průměrné hodnoty byly zjištěny ve svalovině

kormoránů $1,09 \pm 0,4 \text{ mg.kg}^{-1}$, dále v játrech $2,28 \pm 0,867 \text{ mg.kg}^{-1}$ a nejvyšší v ledvinách $3,12 \pm 1,55 \text{ mg.kg}^{-1}$. Zatímco obsah rtuti v játrech a ledvinách není mezi sebou statisticky významně rozdílný ($p=0,330$), tak obsah rtuti ve svalovině je významně nižší než v ledvinách ($p=0,000$) i v játrech ($p=0,000$). Nejvyšší nalezená hodnota rtuti byla v ledvinách a to $7,32 \text{ mg.kg}^{-1}$, naopak nejnižší ve svalovině $0,59 \text{ mg.kg}^{-1}$.

Graf č. 2. Obsah celkové rtuti v jednotlivých vzorcích ve třech tkáních kormorána velkého z lokality Nysa Kłodzka



Liver=játra; kidney= ledviny; muscle= svalovina

Porovnání lokalit

Souhrnné výsledky pro obsah rtuti v jednotlivých sledovaných orgánech pro obě lokality jsou uvedeny v tabulce č. 1. Zcela nejvyšší hodnota rtuti byla zjištěna v ledvinách kormorána z lokality Nysa Kłodzka ($7,32 \text{ mg.kg}^{-1}$). Při porovnání obsahu rtuti v jednotlivých orgánech z obou lokalit mezi sebou bylo zjištěno, že se obsah rtuti v obou lokalitách vysoce významně liší (tab. č. 2). Rozdíly mezi sledovanými lokalitami jsou vyobrazeny v grafu č. 3.

Tab. č. 1. Souhrnné charakteristiky obsahu THg ve tkáních kormorána velkého ze sledovaných lokalit

	játra K	játra NK	ledviny K	ledviny NK	svalovina K	svalovina NK
Průměr	1,33	2,28	1,39	3,12	0,58	1,09
Medián	0,89	2,05	0,74	3,05	0,44	0,98
Rozptyl	1,13	0,75	2,03	2,41	0,15	0,16
Směrodatná odchylka	1,063	0,867	1,426	1,551	0,382	0,400
Směrodatná chyba	0,238	0,173	0,319	0,310	0,085	0,080
Variační koeficient	0,801	0,381	1,025	0,497	0,658	0,366
Minimum	0,233	0,879	0,180	0,861	0,145	0,594
Maximum	4,015	4,670	4,903	7,322	1,401	2,598

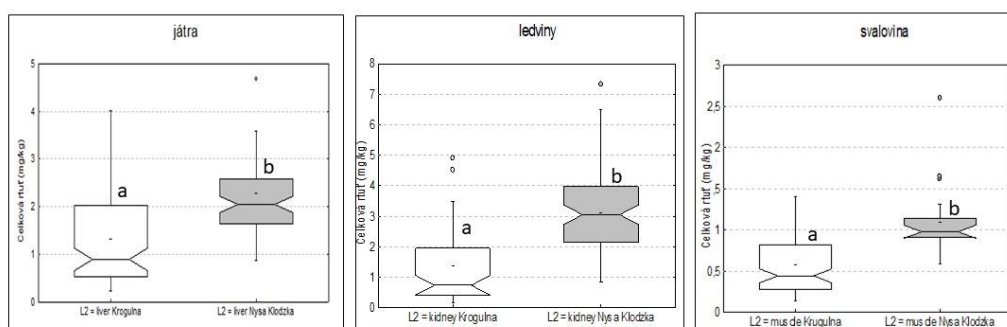
K: Krogulna; NK: Nysa Kłodzka

Tab. č. 2. Výsledek Mann-Whitney testu pro porovnání obsahu rtuti ve tkáních mezi sledovanými lokalitami

orgán	p (Mann-Whitney test)
játra	0,0018
svalovina	0,0002
ledviny	0,0002

p=hladina pravděpodobnosti

Graf č. 3. Porovnání průměrného obsahu celkové rtuti v jednotlivých orgánech mezi dvěma sledovanými lokalitami.



Diskuze

Vysoké hodnoty celkové rtuti v játrech a ledvinách jsou publikovány u rybožravých ptáků jako jsou kormoráni (Houserová, et al., 2007; Misztal-Skudlińska et al., 2011). Na lokalitě Krogulna byly zjištěny podobné hodnoty rtuti v játrech jako v práci Krále et al. (2017) u kormoránů pocházejících z třeboňských rybníků v České republice ($2,12 \pm 0,22 \text{ mg.kg}^{-1}$), které jsou také považovány za nezatížené rtutí. U kormoránů z třeboňských rybníků zjistili také signifikantní rozdíl mezi obsahem THg v játrech a svalovinou. Král et al. (2017) dále uvádí, že kormorán má potenciál akumulovat rtuť v orgánech, přičemž ve svalovině se jedná až o 35krát vyšší obsah v porovnání obsahu rtuti ve svalovině kapra obecného. Obsah rtuti ve svalovině kormorána velkého z lokality Nysa Kłodzka je shodný s výsledky obsahu rtuti ve svalovině kormoránů odlovených v Maďarsku (Lehel et al., 2021). Obsah rtuti v kormoránech ze dvou sledovaných lokalit v Polsku se snižuje následovně: ledviny > játra > svalovina. Ke stejným závěrům došli i Misztal-Skudlińska et al. (2011), kteří ve své práci doplňují, že není rozdíl v obsahu rtuti mezi pohlavími. Vysoké obsahy rtuti jsou dále nalézány v peří kormoránů (Misztal-Skudlińska et al., 2000). Průměrný obsah rtuti v peří byl $7,14 \pm 3,99 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ d.w.}$ u kormoránů pocházejících z jezera Vistula v Polsku.

V lokalitě Krogulna je obsah rtuti v játrech, ledvinách i svalovině kormoránů vysoce významně nižší, než je tomu v lokalitě Nysa Kłodzka (graf č. 3). Z práce Martyniaka et al. (2013) vyplývá, že kormoráni v této lokalitě mají poměrně jednotvárnou a stálou potravu. Jedná se převážně o kapry obecné z rybářské farmy. Na této lokalitě dochází k tomu, že kormoráni lovíci zde jsou vystavováni pravidelně velmi nízkému obsahu rtuti, neboť v kaprech nedochází k její přílišné akumulaci. To je způsobeno postavením kapra v potravinovém řetězci a jeho potravinovými zvyky, kdy kapr se živí zejména planktonem a nedochází k akumulaci rtuti v jeho těle. Naproti tomu na lokalitě Nysa Kłodzka mají kormoráni možnost pestré stravy. Martyniak et al. (2013) uvádí, že v trávicím traktu kormoránů z této lokality byla zjištěna pestrá škála ulovených druhů ryb. Mezi obsádku řeky Nysa patří běžně dravci jako štika a okoun, ale i plotice či ježdík. Kormoráni tak mohou lovit jak dravé, tak nedravé ryby. Kormoráni na této lokalitě jsou tak vystavováni různým hladinám rtuti v rybách, kterými se živí. Není zde proto možné jednoznačné říci, jaké je složení jejich potravy z pohledu rtuti. Ackerman et al. (2016) uvádí, že koncentrace rtuti v krvi ptáků se liší mezi druhy s rozličnou potravou, a ptáci, kteří se

živí rybami na vyšších trofických úrovních mají vyšší koncentrace rtuti v důsledku biomagnifikace rtuti v potravních řetězcích, což je v souladu s našimi výsledky. Klapstein and O'Driscoll (2018) potvrzuje také biomagnifikaci v závislosti na věku ptáků. Ačkoliv jsou obě sledované lokality považovány za rtutí nezatíženou, byl zjištěn vysoce významný rozdíl v obsahu rtuti mezi jednotlivými sledovanými orgány. To je v souladu se závěry Misztal-Szkudlińska et al., 2011, že dochází k biomagnifikaci rtuti v kormoránech ve vztahu k jejich kořisti. Rybožraví ptáci se jeví jako vhodným bioindikátorem zatížení vodního prostředí rtutí.

Závěr

Obsah celkové rtuti v kormoránech klesá následovně: ledviny > játra > svalovina a to na obou sledovaných lokalitách. Množství rtuti v jednotlivých orgánech mezi lokalitami se významně liší a to i přesto, že obě lokality jsou považovány za rtutí nezatížené. Akumulace rtuti je tedy závislá na rozdílné obsídce ryb na lokalitách, a tedy i odlišné potravě, čímž dochází k odlišné akumulaci rtuti v organismech kormoránů.

Tato práce byla financovaná grantem 2021/ITA/22 VETUNI.

Literatura

- Ackerman, J.T., Eagles-Smith, C.A., Perzog, M., Hartman, C.A., Peterson, S.H., Evers, D.C., Jackson, A.K., Elliott J.E., Vander pol, S.S., Bryan C.E. 2016. Avian mercury exposure and toxicological risk across western North America: A synthesis. *Science of The Total Environment* 568: 749–769.
- Lehel, J., Grúz, A., Bartha, A., Pintér, I., Major, L., Menyhárt, L., Szabó R., Budai P. 2021. Comparison of meta burden in different muscle tissue of Great cormorant (*Phalacrocorax carbo*). *Environmental Science and Pollution Research*. Published online, 09 August 2021.
- Misztal-Szkudlińska, M., Szefer, P., Konieczka, P., Mamieśnik, J. 2012. Mercury in different feather types from great cormorants (*Phalacrocorax carbo*) inhabiting the Vistula Lagoon ecosystem in Poland. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 89: 841-844.
- Burger, J., Gochfeld, M. 1997. Risk, mercury levels, and birds: Relating adverse laboratory effects to field biomonitoring. *Environmental Research* 75: 160–172.
- EEA report 11/2018(2018) ISBN: 978-92-9213-984-1, ISSN: 1977-8449, doi: 10.2800/558803
- Evers, D.C., Savoy, L.J., DeSorbo, C.R., Yates, D.E., Hanson, W., Taylor, K.M., Siegel, L.S., Cooley Jr., J.H., Bank, M.S., Major, A., Munney, K., Mower, B.F., Vogel, H.S., Schoch, N., Pokras, M., Goodale, M.W., Fair, J. 2008. Adverse effects from environmental mercury loads on breeding common loons. *Ecotoxicology* 17: 69-81.
- Houserová, P., Hedvábny, J., Matejcek, D., Kracmar, S., Sitko S., Kuban V. 2005. Determination of total mercury in muscle, intestines, liver and kidney tissues of cormorant (*Phalacrocorax carbo*), great crested grebe (*Podiceps cristatus*) and Eurasian buzzard (*Buteo bueto*). *Veterinary Medicine-Czech* 50: 61-68.
- Furness, R.W., Muirhead, S.J., Woodburn, M. 1986. Using bird feathers to measure mercury in the environment: Relationships between mercury content and moult. *Marine Pollution Bulletin* 17: 27-30.
- Furtado, R., Pereira, M.E., Granadeiro, J.P., Catry, P. 2019. Body feather mercury and arsenic concentrations in five species of seabirds from the Falkland Islands. *Marine Pollution Bulletin* 149: 110574.
- Harari, R., Harrari, F., Gerhardsson, L., Lundh, T., Skerfving, S., Broberg, K. 2012. Exposure and toxic effects of elemental mercury in gold-mining activities in Ecuador. *Toxicology Letters* 213: 75–82.
- Kaler, R.S.A., Kenney, L.A., Bond, A.L., Eagles-Smith, C.A. 2014. Mercury concentrations in breast feathers of three upper trophic level marine predators from the western Aleutian Islands, Alaska. *Marine Pollution Bulletin* 82: 189–193.

- Karagas, M.R., Choi, A.L., Oken, E., Horvat, M., Schoeny, R., Kamai, E., Cowell, W., Grandjean, P., Korrick, S. 2012. Evidence on the human health effects of low-level methylmercury exposure. *Environmental Health Perspectives* 120: 799–806.
- Klapstein, S.J., O'Driscoll, N.J. 2018. Methylmercury biogeochemistry in freshwater ecosystems: a review focusing on DOM and photodemethylation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 100: 14–25.
- Martyniak, P.H., Szymańska, U., Stańczak, K., Gomulka, P., Król, J. 2013. Próba oszacowania presji kormorana czarnego *Phalacrocorax carbo* (L. 1758) na ichofaunę wód na terenie Stowarzyszenia Lokalna Grupa Rybacka „Opolszczyzna” oraz Stowarzyszenia Lokalna Grupa Rybacka „Żabi Kraj”. ISBN 978-83-939958-0-6
- Rutkiewicz, J., Nam, D.H., Cooley, T., Neumann, K., Bueno Padilla, I., Route, W., Strom, S., Basu, N. 2011. Mercury exposure and neurochemical impacts in bald eagles across several Great Lakes states. *Ecotoxicology* 20: 1669–1676.
- Wang, W.X. 2012. Biodynamic understanding of mercury accumulation in marine and freshwater fish. *Advances in Environmental Research* 1: 15–35.

Posouzení dopadu kontaminace vodního prostředí rtuťí na zdraví živočichů vázaných na vodu na základě hodnocení obsahu rtuťí u kapra obecného

Kamila Novotná, Zuzana Šíroká, Zdeňka Svobodová

Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI Brno

Abstrakt

Rtuť je přirozeně se vyskytující prvek pocházející ze zemské kůry, který se uvolňuje do životního prostředí, hlavně vodních zdrojů. Expozicí z vnějšího prostředí a přes potravní řetězec se dostává rtuť do živých organismů. Cílem této studie bylo zhodnotit celkový obsah rtuťí ve tkáních (svalovina, slezina, ledvina, játra, šupiny, gonády) kapra obecného (*Cyprinus carpio*) ulovených ve třech rybnících (Jaroslavický, Strachotínský, Vrkoč) nacházejících se v povodí řeky Moravy v České republice. Celková rtuť byla stanovena metodou atomové absorpční spektrometrie na přístroji AMA 254. Nejvyšší průměrný obsah rtuťí v rybníku Jaroslavický byl zjištěn ve svalovině, naopak nejnižší v mozku. Obsah rtuťí mezi jednotlivými orgány ryb ze stejné lokality vykazoval statisticky významný rozdíl. Nejvyšší průměrné hodnoty rtuťí v případě rybníka Vrkoč byly zjištěny ve svalovině, naopak nejnižší v gonádách. Na lokalitě Strachotín se rtuť v kaprech také nejvíce kumulovala ve svalovině, naopak nejméně rtuťí bylo nalezeno opět v šupinách, gonádách a mozku. V obou lokalitách byly také zjištěny statisticky významné rozdíly v obsahu rtuťí mezi sledovanými orgány. Pro porovnání jednotlivých lokalit byl použit obsah rtuťí ve svalovině ryb, neboť na všech lokalitách zde byl nejvyšší obsah rtuťí. Statistickým porovnáním bylo zjištěno, že jednotlivé lokality mezi sebou vykazují významný rozdíl, nejvyšší hodnoty byly naměřeny ve Strachotínském rybníce. Nicméně hodnoty obsahu rtuťí ve svalovině ve všech případech vyhověly hygienickému limitu do 0,5 mg/kg, což znamená, že rtuť nepředstavuje riziko pro konzumenty těchto komerčně chovaných ryb, ani nedochází k poškození životního prostředí těchto ryb nadměrnou kontaminací rtuťí. Zdraví ryb tedy obsahem rtuťí ve sledovaných rybnících není nijak negativně ovlivněno.

Úvod

Rtuť je přirozeně se vyskytující prvek pocházející ze zemské kůry, který se uvolňuje do životního prostředí jak v důsledku lidské činnosti i přírodních procesů (Pacyna a Pacyna, 2005). Jeho hladiny jsou pečlivě sledovány jak v biotické, tak v abiotické části životního prostředí, aby se vyhodnotila možná rizika vyplývající z rostoucích koncentrací. Expozicí z vnějšího prostředí a přes potravní řetězec se dostává rtuť do živých organismů (Abdel-Rasu et al, 2013). Obsah rtuťí v rybách je velmi proměnlivý a závisí na mnoha okolnostech. Bez ohledu na obsah rtuťí a její biologickou dostupnost v životním prostředí ryb, které jsou nejdůležitějšími faktory, hrají důležitou roli i druhy ryb a jejich postavení v potravinovém řetězci. Obsah rtuťí v rybách však vždy odráží kontaminaci místa odběru vzorků z důvodu schopnosti rtuťí, zejména jejích organických forem, hromadit se v živých organismech (Wang a Wang, 2012). Studie uvádějí, že řada onemocnění centrálního nervového systému, jakož i arytmie, kardiomyopatie či poškození ledvin jsou spojeny s expozicí rtuťí (Harari et al., 2012). Rtuť jako kontaminující látka je sledována v potravinách a v nařízení č. 1881/2016 je obsah rtuťí v potravinách povolen v maximálním limitu (0,5 mg.kg⁻¹) ve svalovině nedravných druhů ryb (Nařízení EP a R 1881/2016).

Cílem této studie bylo zhodnotit celkový obsah rtuťí ve tkáních (svalovina, slezina, ledvina, játra, šupiny, gonády) kapra obecného (*Cyprinus carpio*) ulovených ve třech rybnících nacházejících se v povodí řeky Moravy v České republice (Jaroslavický, Strachotín a Vrkoč).

Dílčím cílem bylo zhodnotit, zda existuje rozdíl v akumulaci rtuťí v jednotlivých orgánech kapra a porovnat obsah rtuťí v kaprech na sledovaných lokalitách mezi sebou.

Materiál a metodika

Sledované lokality

Jaroslavický rybník (též nazývaný Zámecký rybník) je druhý největší na Moravě. Nachází se asi 17 km jihovýchodně od města Znojma, u malé pohraniční obce Jaroslavice. Je provozován komerčním rybníkářstvím a slouží k chovu kaprů a jiných ryb. Napájení a odtok vody zajišťuje Dyjsko-mlýnský náhon, postranní kanál řeky Dyje. Má rozlohu 245 ha.

Strachotínský rybník je rybník lokalizovaný vedle obce Strachotín v těsném sousedství vodní nádrže Nové Mlýny. Rybník má rozlohu 54,5ha a je využíván komerčním rybníkářstvím k chovu kapra a dalších ryb. Zdrojem vody je bezejmenný levostranný přítok řeky Dyje.

Vrkoč je druhý největší rybník v soustavě Pohořelických rybníků. Patří mezi největší i v rámci České republiky. Nachází se mezi obcí Ivaň a vesnicí Nová Ves. Vodní plocha má rozlohu 156 ha. Rybník je napájen z Mlýnského náhonu Cvrčovice, který odebírá vodu z řeky Jihlavy. Rybník je opět ve vlastnictví komerčního rybníkářství a je určen k chovu kapra.

Tabulka č. 1. Popisné charakteristiky kaprů obecných pocházejících z rybníku Jaroslavický, Strachotín a Vrkoč v roce 2020.

rybník	pohlaví	hmotnost (kg)	délka těla (cm)	délka celkem (mm)
Jaroslavický	M	2,66	43,3	50
	F	2,66	42,7	49,5
	M	2,34	43	50
	M	2,56	42,3	49,6
	M	2,08	39,5	46,2
	M	2,5	44	52
	M	2,5	41,5	50
	F	2,86	46	54
	F	2,84	46,5	55
	M	2,38	40	48,5
Strachotín	M	2,84	42	49
	M	2,24	42	49
	F	2,54	44	50
	M	2,52	43	50
	F	2,52	43,7	51
	M	1,8	39	47
	M	2,34	43	49,9
	F	2,4	44	52
	M	2,44	41	49
	M	2,4	42,5	50
Vrkoč	M	2,7	45,5	53
	F	2,74	46,5	55
	M	2,76	45,5	53
	F	3,36	47	54
	F	2,5	45,8	54
	F	2,66	46	55
	M	2,7	44,7	52
	F	2,74	48	58
	M	3,04	46,3	56
	M	2,92	47,1	56

Odběr vzorků

V rámci výlovů jednotlivých rybníků, které provádělo Rybníkářství Pohořelice a. s., byly zakoupeny vzorky usmrčených kaprů obecných (*Cyprinus carpio*). Z každého rybníku bylo získáno 10 ks ryb. Ryby byly na ledu odvezeny do laboratoře, kde byly zváženy, změřeny a bylo určeno pohlaví. Dále byly z ryb odebrány jednotlivé vzorky tkání tkáních (svalovina, slezina, ledvina, játra, šupiny, gonády). Tyto byly následně označeny a vloženy do polyethylenových sáčků a skladovány až do analýzy při -18 °C. Základní charakteristiky odebraných ryb jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Analýza celkové rtuti (THg)

Celková rtuť byla stanovena metodou atomové absorpční spektrometrie na přístroji AMA 254 (Altec Ltd. Dvůr Králové nad Labem, Česká republika). Při samotné analýze byly jednotlivé vzorky bez předchozí přípravy po rozmrazení naváženy a vloženy do spalovací lodičky přístroje AMA 254 k analýze. Každý vzorek byl měřen minimálně dvakrát. Limit detekce přístroje je 1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Přesnost měření byla validována za pomoci referenčního materiálu NIST- 2976 (Mussle Tissues). Obsah celkové rtuti je vyjádřen v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ čerstvé tkáně.

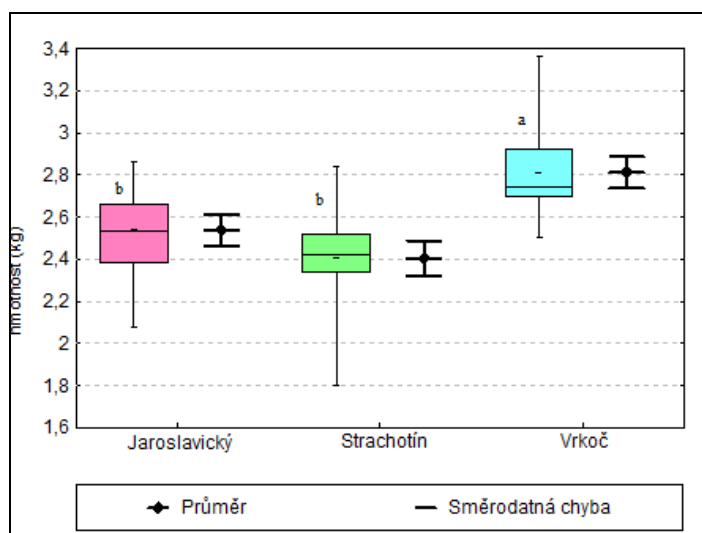
Data a statistická analýza

Zjištěná data byla zpracována do tabulek za pomoci programu Microsoft Word a Microsoft Excel (MS Office 365) a statistická analýza byla provedena v programu Unistat for Excel 6.5. Nejdříve byla data z jednotlivých rybníků a tkání podrobena testu normality (Shapiro-Wilkův test). Jednalo se o data s normálním i nenormálním rozdělením, tudíž byly použity dále neparametrické testy. Pro hodnocení rozdílů obsahu rtuti v jednotlivých orgánech mezi sebou v rámci jedné lokality byla použita Kruskal Wallis jednofaktorová ANOVA-Tukey HSD test. Pro hodnocení obsahu rtuti mezi lokalitami byl použit Mann-Whitneův test.

Výsledky

Zjištěná data obsahu rtuti byla od celkem 30 ryb byla statisticky analyzována. Hmotnost ryb z rybníka Vrkoče byla významně větší, než u ryb rybníka Jaroslavický ($p=0,0187$) a Strachotín ($p=0,0025$) (graf č. 1). Základní statistické charakteristiky obsahu rtuti jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Graf č. 1. Porovnání hmotnosti ryb ze sledovaných rybníků.

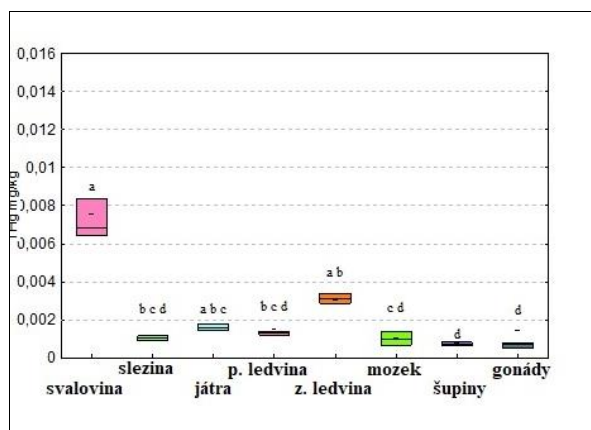


Tabulka č. 2. Základní statistické charakteristiky obsah celkové rtuti (mg.kg^{-1}) pro jednotlivé sledované orgány z rybníků jaroslavický, Strachotín a Vrkoč.

THg mg.kg^{-1}										
Jaroslavický	svalovina	slezina	p.		z.		játra	šupiny	gonády	mozek
			ledvina	ledvina	ledvina	ledvina				
průměr	0,0075	0,0011	0,0015	0,0031	0,0016	0,0008	0,0015	0,0010		
medián	0,0068	0,0010	0,0013	0,0031	0,0016	0,0007	0,0007	0,0010		
směrodatná odchylka	0,0028	0,0002	0,0007	0,006	0,0003	0,0003	0,0026	0,0004		
minimum	0,0046	0,0008	0,0012	0,0018	0,0012	0,0005	0,0004	0,0006		
maximum	0,0145	0,0014	0,0034	0,0040	0,0021	0,0014	0,0089	0,0016		
Strachotín	svalovina	slezina	ledvina		játra	šupiny	gonády	mozek		
průměr	0,0129	0,0020	0,0046	-	0,0024	0,0039	0,0008	-		
medián	0,0127	0,0020	0,0042	-	0,0023	0,0007	0,0008	-		
směrodatná odchylka	0,0043	0,0005	0,0010	-	0,0004	0,0103	0,0003	-		
minimum	0,0060	0,0011	0,0031	-	0,0020	0,0004	0,0006	-		
maximum	0,0192	0,0027	0,0060	-	0,0032	0,0333	0,0016	-		
Vrkoč	svalovina	slezina	p.		z.		játra	šupiny	gonády	mozek
průměr	0,0068	0,0023	0,0014	0,0028	0,0018	0,0007				
medián	0,0065	0,0015	0,0013	0,0025	0,0017	0,0006	0,0005	-		
směrodatná odchylka	0,0023	0,0022	0,0006	0,0014	0,0005	0,0002	0,0005	-		
minimum	0,0040	0,0011	0,0009	0,0017	0,0010	0,0004	0,0004	-		
maximum	0,0112	0,0086	0,0029	0,0068	0,0027	0,0010	0,0020	-		

Nejvyšší průměrný obsah rtuti v rybníku Jaroslavický byl zjištěn ve svalovině, naopak nejnižší v mozku. Obsah rtuti mezi jednotlivými orgány ryb ze stejné lokality vykazoval významný rozdíl. Jednotlivé rozdíly mezi sledovanými tkáněmi jsou vyznačeny v grafu č.21. Vysoce významně vyšší obsah rtuti byl zjištěn ve svalovině ($p=0,0000$) a zadní ledvině ($p=0,0002$) ve srovnání se šupinami kaprů z Jaroslavického rybníka.

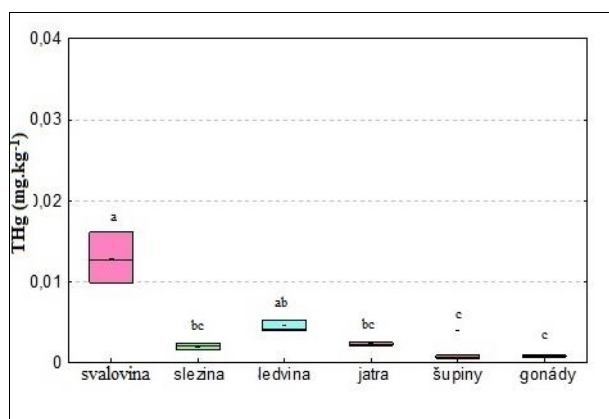
Graf č. 2. Průměrný obsah celkové rtuti ve tkáních kapra obecného (*Cyprinus carpio*) z rybníku Jaroslavický



a, b, c, d= skupiny s odlišnými indexy se statisticky významně liší

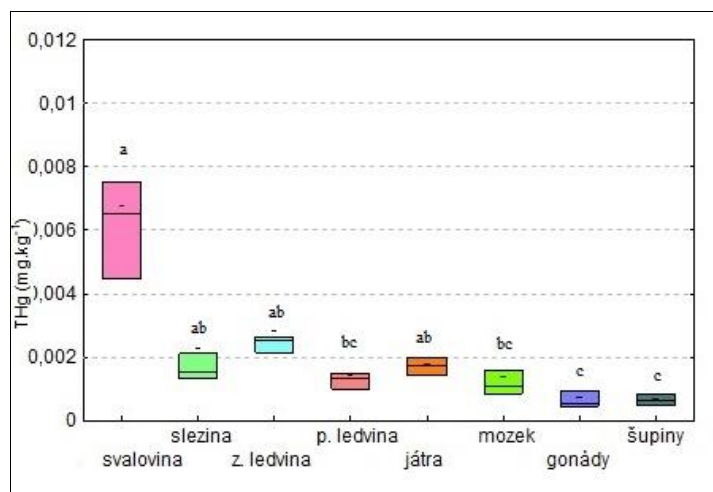
Na lokalitě Strachotín se rtuť v kaprech také nejvíce ukládá do svaloviny, naopak nejméně rtuti nacházíme opět v šupinách, gonádách a mozku. Statisticky významné rozdíly v obsahu rtuti mezi sledovanými orgány jsou uvedeny v grafu č. 3. Vysoce významně vyšší obsah rtuti byl zjištěn ve svalovině oproti gonádám a šupinám ($p=0,0000$) a také v obsahu rtuti v ledvinách ve srovnání se gonádami ($p=0,0005$) a šupinami ($p=0,0009$) kaprů z rybníka Strachotín.

Graf č. 3. Průměrný obsah celkové rtuti ve tkáních kapra obecného (*Cyprinus carpio*) z rybníku Strachotín



a, b, c= skupiny s odlišnými indexy se statisticky významně liší

Graf č. 4. Průměrný obsah celkové rtuti ve tkáních kapra obecného (*Cyprinus carpio*) z rybníku Vrkoč



a, b, c= skupiny s odlišnými indexy se statisticky významně liší

Nejvyšší průměrné hodnoty rtuti v případě rybníka Vrkoč byly zjištěny ve svalovině, naopak nejnižší opět v gonádách. Rozdíly mezi sledovanými orgány jsou zobrazeny v grafu č. 4. Vysoce významně vyšší obsah rtuti byl zjištěn ve svalovině ($p=0,0000$) a zadní ledvině ($p=0,0001$) ve srovnání se šupinami kaprů z rybníka Vrkoč.

Diskuze

Nejvyšší obsah rtuti byl zjištěn ve svalovině kapra z rybníka jaroslavický, naopak nejnižší pak v mozku. Mezi sledovanými orgány byl zjišťován významný rozdíl, v některých případech i vysoce významný. Na námi sledovaných lokalitách rybníků Jaroslavický, Strachotín a Vrkoč byly nacházeny hodnoty rtuti mnohonásobně nižší, než je stanovený limit pro obsah rtuti daný nařízením EP a R č. 1881/2006. Maximální limit je stanoven pro nedravné ryby $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$. Hodnoty rtuti ve svalovině odpovídají nezátíženým lokalitám a také postavení kapra v potravinovém řetězci.

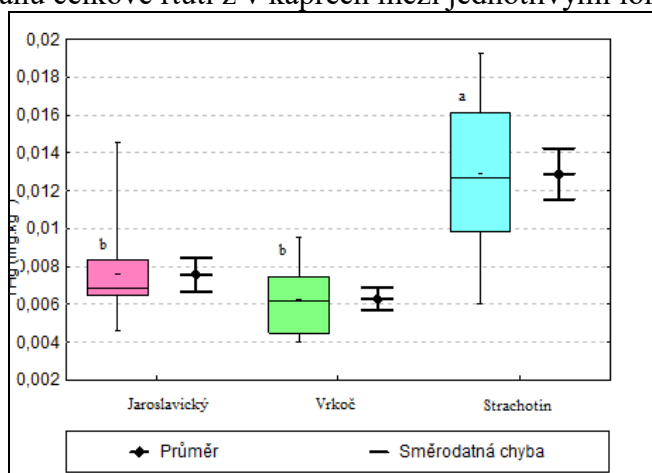
Na sledovaných lokalitách jsou zjištěné výsledky shodné se studii prováděnými na volných vodách ČR na kaprech (Vicarova et al., 2014). Výsledky obsahu rtuti z naší studie jsou shodné také se zjištěním Maršálka et al. (2007), kteří sledovali obsah celkové rtuti v játrech, gonádách a svalovině kaprů obecných odlovených z rybníků ČR nebo s výsledky studie provedené Kimákovou et al. (2018) u kaprů z volných vod Slovenska. Výsledky jsou shodné i s obsahem rtuti ve studiích s jelcem tloušťem (*Leuciscus cephalus*) tedy také nedravnou rybou (Kružíková et al. 2008a; Kružíková et al. 2008b). Data studie jsou shodná se zjištěním Havelkové et al. (2008), kde je hodnocen index mezi

obsahem rtuti v játrech a svalovině, kde v nezatížených lokalitách je více rtuti ve svalovině než v játrech. Naopak u lokalit zatížených se jedná o poměr opačný, kdy se při vyšším obsahu rtuti ve vodním prostředí akumuluje rtuť spíše do jater.

Obsah rtuti v orgánech kapra klesá následovně: svalovina > játra > zadní ledvina/ přední ledvina > slezina > mozek > gonády/šupiny. Mezi sledovanými orgány byl zjišťován významný rozdíl, což svědčí o rozdílném ukládání rtuti v jednotlivých orgánech organismu ryb. Pro porovnání jednotlivých lokalit byl použit obsah rtuti ve svalovině ryb, neboť na všech lokalitách zde byl nejvyšší obsah rtuti. Porovnáním bylo zjištěno, že jednotlivé lokality mezi sebou vykazují významný rozdíl v obsahu rtuti ve svalovině, liší se rybník Strachotín od rybníků Jaroslavický ($p=0,0065$) a Vrkoče ($p=0,0025$). (graf. č. 5). Zároveň pak v případě rybníka Strachotín však byla prokázána negativní korelace (Spearmanův koeficient $-0,604$; $p=0,0332$) mezi hmotností ryb a obsahem rtuti ve svalovině. V případě porovnání vztahu obsahu rtuti s hmotností ryb bez ohledu na lokalitu byla potvrzena negativní korelace (Spearmanův korelační koeficient $-0,5768$; $p=0,0011$).

Podle zjištěných výsledků obsahu rtuti lze usuzovat, že rtuť nepředstavuje riziko pro konzumenty těchto komerčně chovaných ryb a ani zdraví ryb ve sledovaných rybnících není nijak negativně ovlivněno.

Graf č. 5. Porovnání obsahu celkové rtuti z v kaprech mezi jednotlivými lokalitami.



a, b = skupiny s odlišnými indexy se statisticky významně liší

Závěr

Z výsledků provedených analýz tržních kaprů vyplývá, že rybníky v povodí řeky Moravy (Jaroslavický, Strachotín, Vrkoč) nejsou zatížené rtutí. Svědčí o tom nízké hodnoty obsahu celkové rtuti ve svalovině (hluboko pod platným hygienickým limitem $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$), dále poměr mezi obsahem celkové rtuti ve svalovině a játrech (několika násobně vyšší obsah ve svalovině ve srovnání s obsahem v játrech) a negativní korelace mezi hmotností kaprů a obsahem celkové rtuti ve svalovině. Ryby jsou významným indikátorem zatížení prostředí rtutí.

Tato práce byla financovaná grantem 2021ITA22 VETUNI.

Literatura

- Abdel-Rasul, G.M., Abu-Salem, Manal M.A., Al-Batanony, A., Al-Dalatony M.A., Allam, H.K. 2013. Neurobehavioral, respiratory, and auditory disorders among mercury-exposed fluorescent lamp workers. *Menoufia Medical Journal* 26: 58-62.
- Havelková, M., Dušek, L., Némethová, D., Poleszczuk, Svobodová, Z. 2008. Comparison of mercury distribution between liver and muscle – a biomonitoring of fish from lightly and heavily contaminated localities. *Sensors* 8: 4095-4109.

- Harari, R., Harrari, F., Gerhardsson, L., Lundh, T., Skerfving, S., Broberg, K. 2012. Exposure and toxic effects of elemental mercury in gold-mining activities in Ecuador. *Toxicology Letters* 213: 75-82.
- Kimáková, T., Kuzmová, L., Nevolná, Z., Bencko, V. 2018. Fish and fish products as risk factors of mercury exposure. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 25: 488-493.
- Kružiková K., Svobodová, Z., Valentová, O., Randák, T., Velíšek, P. 2008a. Mercury and methylmercury in muscle tissue of chub from the Elbe river main tributaries. *Czech Journal of Food Sciences* 26: 65-70.
- Kružiková, K., Randák, t., Kenšová, R., Kroupová, H., Leontovyčová, D., Svobodová, Z. 2008b. Mercury and methylmercury concentration in muscle tissue of fish caught in major rivers of the Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno* 77: 637-643.
- Maršálek P., Svobodová, Z., Randák, T. 2007. The content of total mercury and methylmercury in common carp from selected Czech ponds. *Aquaculture International* 15: 299-304.
- Nariadení komise (ES) č. 1881/2016 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách.
- Pacyna, E.G., Pacyna, J.M., Sundseth K., Munthe, J., Kindbom, K., Wilson, S. Steenhuisen, F., Maxson, P. 2010. Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020. *Atmospheric Environment* 44: 2487-2499.
- Vicarova, P., Kleckerova, A., Docekalova, H., Pelcova, P. Heavy metals in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) from two reservoirs in the Czech Republic. In: *Mendel Net* 2014, 522-525.
- Wang, W.X. 2012. Biodynamic understanding of mercury accumulation in marine and freshwater fish. *Advances in Environmental Research* 1: 15-35.

Vliv estrogenů na změny vybraných biochemických markerů se zaměřením na hodnocení endokrinní disrupce u triploidních jedinců dánia pruhovaného (*Danio rerio*)

Zuzana Weiserová¹, Jana Blahová¹, Veronika Doubková¹, Petr Maršálek¹, Roman Franěk²,
Martin Pšenička², Zdeňka Svobodová¹

¹Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, ²Laboratoř zárodečných buněk, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Abstrakt

V rámci naší studie bylo provedeno sledování vlivu ethinylestradiolu (EE2), semisyntetického estrogenu běžně užívaného v orální antikoncepci, na celosamčí triploidní populaci dánia pruhovaného (*Danio rerio*). Byly realizovány dva dílčí experimenty, ve kterých byl sledován účinek EE2 aplikovaného ve vodě (10 ng/l) a v krmivu (10 a 1 000 ng/kg). Po chronické expozici, která trvala 14 týdnů v případě aplikace do vody a 6 týdnů v případě aplikace testované látky do krmiva, byla sledována míra indukce vitellogeninu. V případě testování účinků EE2 podávaného v krmivu byly dále posuzovány změny aktivit vybraných antioxidantních a detoxikačních enzymů v celotělních homogenátech. V obou experimentech byl prokázán signifikantní nárůst koncentrace vitellogeninu po expozici EE2. Při aplikaci EE2 v krmivu došlo ke statisticky významnému zvýšení vitellogeninu pouze v případě nejvyšší testované koncentrace (1 000 ng/kg). Zároveň u této skupiny bylo zaznamenáno statisticky významné zvýšení mortality a naopak došlo signifikantnímu snížení celkové hmotnosti a délky těla v porovnání s kontrolní skupinou. Dále expozice 1 000 ng/kg EE2 v krmivu vedla ke statisticky významným změnám v aktivitách glutathion-S-transferázy, glutathionperoxidázy i glutathionreduktázy v porovnání s kontrolní skupinou. Skupina exponovaná environmentální koncentrací EE2 (10 ng/kg) v krmivu vykazovala signifikantní změny v porovnání s kontrolou pouze v případě aktivity glutathionreduktázy a celkové hmotnosti.

Úvod

Kontaminanty životního prostředí, které mohou narušit funkci neuroendokrinního systému obratlovců, nazýváme endokrinní disruptory (Hiramatsu et al., 2006). V posledních letech se jedná o intenzivně studovanou problematiku, a to nejen v oblasti vodního ekosystému. V humánní medicíně se dnes využívá odhadem asi 20 různých progestinů (jiným názvem gestagenů, progesteronů, progestagenů), které řadíme mezi endokrinní disruptory. Jedná se o látky, které mají široké spektrum použití. V kauzální medicíně se využívají například k léčbě děložních nádorů nebo při děložním krvácení (Kumar et al., 2015), v preventivní medicíně pak mají nezastupitelnou úlohu v orální antikoncepci. Uvedená léčiva se z organismu běžně vylučují močí a následně dochází k jejich vstupu do odpadních vod. Čistírny odpadních vod často nemají dostatečně efektivní technologie pro jejich kompletní odstranění. Nekompletně přečištěné odpadní vody, které tedy obsahují koktejl těchto látek, následně vstupují do vodního ekosystému a představují potenciální hrozbu pro necílové vodní organismy (Sumpter, 1995). Látky estrogenního charakteru byly zaznamenány celosvětově v různých biotických i abiotických matricích vodního prostředí. Existuje řada vědeckých studií, které potvrzují jejich pozitivní nálezy v povrchových vodách, sedimentech dna, ale také ve tkáních krevet, měkkýšů či ryb (Liu et al., 2015).

Jak již bylo zmíněno výše, hlavním zdrojem estrogenů ve vodním ekosystému je hormonální antikoncepce. Nejčastěji využívanou účinnou látkou je ethinylestradiol (EE2), což je syntetický derivát estradiolu. Mechanismus účinku EE2 spočívá v inhibici ovulace (Dhont, 2010). Poprvé byla tato sloučenina syntetizována v roce 1938 a v roce 1961 schválil jeho užití v přípravku Anoval® Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food Drug Administration – FDA). Tento schválený přípravek obsahoval 4 mg norethisteronu a 50 mg EE2 (Mears and Grant, 1962). O nově dostupný přípravek byl po jeho uvedení na trh enormní zájem. Bohužel vysoká koncentrace EE2 způsobovala u mnoha

konzumentek řadu vedlejších účinků. Během uplynulých šedesáti let došlo k poměrně rozsáhlému výzkumu v oblasti účinků EE2, což se projevilo především snížením dávky EE2 v antikoncepčních přípravcích a s tím spojených možných nežádoucích efektů (Dhont, 2010).

Existuje široká škála různých diagnostických postupů, které nám umožňují hodnotit přítomnost cizorodých látek v biotických a abiotických složkách vodního prostředí. Pro hodnocení jejich účinků na necílové organismy se provádí různé testy toxicity. Mezi hojně využívané zástupce vodních organismů, které se do testů toxicity zařazují, patří ryby. Jedním z nejrozšířenějších modelových organismů je akvarijní ryba dánío pruhované (*Danio rerio*). V testech toxicity se běžně provádí monitorování řady různých ukazatelů (např. mortalita, morfologické ukazatele, biochemické markery), které nám následně umožňují komplexní zhodnocení potenciálně negativních účinků testovaných kontaminantů (Velíšek, 2018). Nejčastěji se testovaná látka aplikuje ve vodě a simuluje tedy běžné podmínky ve vodním ekosystému (Ortiz-Villanueva et al., 2018; Tyler et al., 1999; Andersen and Holbech, 2003; Žlábek et al., 2009; Maltais and Roy, 2014). Nelze ovšem opomenout fakt, že tyto kontaminanty se v živých organismech mohou také kumulovat. Z uvedeného důvodu se v posledních letech často setkáváme se studii, které sledují právě účinky těchto látek perorální cestou.

Pro hodnocení účinků endokrinních disruptorů u ryb se často jako vhodný biomarker využívá vitellogenin. Vitellogenin je hlavním prekurzorem vaječného žloutku a u samic je běžně tvořen jako odpověď organismu na estrogen produkovaný vaječníky. Proces syntézy vitellogeninu probíhá na základě aktivace hypothalamo-hypofýzo-ovariální osy. Hypothalamus zajišťuje produkci gonadotropin-uvolňujícího hormonu (GnRH). Na tento proces má vliv mnoho endogenních a exogenních faktorů. Patří sem například vrozený biorytmus, výživný stav, sezónní změny fotoperiody a teploty a další. Jako odpověď na působení GnRH začne hypofýza uvolňovat folikuly stimulující hormon, který následně indukuje tvorbu 17 β -estradiolu ze tkáně theca follicula ovariálních folikulů. 17 β -estradiol vyvolá v játrech syntézu vitellogeninu a jeho následné uvolnění do krevního řečiště. Z krevního řečiště vitellogenin difunduje přes bazální membránu a mezibuněčný prostor, mezi buňky zóny granulosa. Přes folikulární buňky se vitellogenin následně dostává do kontaktu s oolemou. Do oocyty pak vstupuje pomocí specifických receptorů, které se nachází na jeho membráně (Reading et al., 2017). Samci mají velmi malé množství estrogenu v těle, proto je u nich produkce vitellogeninu minimální, často pod mezí detekce dané analytické metody (Sumpter, 1995). Na základě mnoha toxikologických výzkumů byla přítomnost vitellogeninu ve tkáních samců a juvenilních jedinců ryb zvolena jako jedna z možností detekce přítomnosti endokrinních disruptorů ve vodním prostředí (Drastichová et al., 2004). Vitellogenin můžeme detekovat v různých matricích. U větších ryb se nejčastěji využívá krevní plazma či sérum, případně jsou popsány studie, které analyzovaly vitellogenin v jaterní tkáni či povrchovém hlenu. U menších ryb, například akvarijních zástupců, se často využívá celotělních homogenátů (Hansen et al., 1998; Maltais and Roy, 2014).

Dánío pruhované se začíná pohlavně diferenciovat kolem 21. dne života a kompletní pohlavní diferenciaci je dokončena 42. den. Brion et al. (2004) sledovali vliv 17 β -estradiolu ve vodě na dánía pruhované s přirozeným poměrem pohlaví ve třech rozdílných věkových kategoriích. U mladších jedinců bylo pro indukci vitellogeninu potřeba vyšších dávek 17 β -estradiolu (100 ng/l) ve srovnání se staršími jedinci (5 až 25 ng/l). Ačkoliv byla tato studie velmi obsáhlá, nepopsala komplexní vliv estrogenních látek po celé období pohlavního dospívání těchto jedinců. Uvedené látky působí na necílové organismy po celou dobu jejich dospívání a následného života z důvodu jejich kontinuálního přísunu do vodního ekosystému. Autoři ve svém experimentu využili přirozeného poměru pohlaví, což ovšem sebou může nést problém, který souvisí s nevyrovnaným poměrem pohlaví. Obtížně odhadnutelnému poměru pohlaví při selekci jiker lze zabránit využitím celosamčí triploidní populace pokusných ryb. Tato ojedinělá charakteristika, kdy se uměle indukovaní triploidi vyvíjí pouze v samce, byla zjištěna právě u dánía pruhovaného (Kavumpurath et al., 1990). Další neopomenutelnou výhodou použití triploidů v testech toxicity je snížení počtu experimentálních zvířat při sledování xenoestrogenních účinků polutantů, protože tímto způsobem do experimentu zahrneme pouze samčí populaci, kterou potřebujeme.

Cílem předkládané studie bylo zhodnocení potenciálně negativního vlivu estrogenu EE2 na změny vybraných biochemických parametrů u triploidních jedinců dánia pruhovaného. V rámci studie biomarkerů byla pozornost zaměřena především na ukazatele endokrinní disrupce jako je vitellogenin. Byly realizovány dvě dílčí studie, ve kterých byl sledován vliv dlouhodobého působení EE2 na juvenilní a adultní stádia dánia pruhovaného. V rámci prvního experimentu byla testovaná látka podávána ve vodě po dobu 14 týdnů. Ve druhém dílčím experimentu byl EE2 dávkován v krmivu po dobu 6 týdnů. Testovány byly environmentálně relevantní koncentrace a jejich násobky pro zhodnocení efektu dávky a koncentrace.

Materiál a metodika

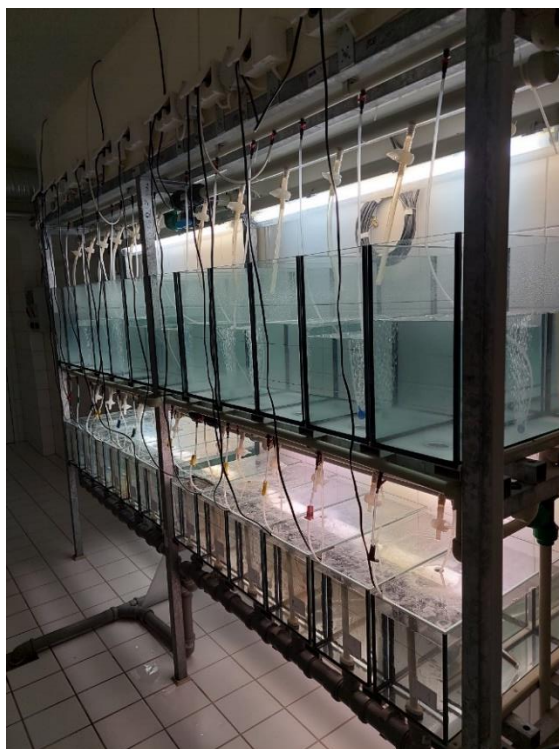
Byly provedeny dva dílčí experimenty s využitím celosamčí triploidní populace dánia pruhovaného. V rámci uvedených experimentů byl sledován chronický účinek EE2 na vybrané biomarkery se zaměřením na endokrinní disrupci. Experiment byl realizován ve spolupráci fakultou Rybářství a ochrany vod ve Vodňanech (Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích), která se problematikou triploidní populace dánia pruhovaného dlouhodobě zabývá. Triploidie byla u jiker dánia pruhovaného indukována pomocí tepelného šoku, konkrétně byla využita teplota 41°C. Teplotní šok byl aplikován 2 minuty po oplození (Franěk et al., 2019) a způsobil retenci jednoho polárního tělíska během buněčného dělení, což vedlo ke vzniku 3n (triploidního) jedince, namísto standartního 2n (diploidního) jedince (Kavumpurath and Pandian, 1990). Kontrola účinnosti triploidie byla provedena po šesti dnech od provedení tepelného šoku, kdy bylo 30 kusů ryb usmrceno (předávkováno MS 222) a byly analyzovány jejich ocasní ploutve. Ověření proběhlo pomocí průtokové cytometrie (Sysmex Partec GmbH, Německo) a zjištěné údaje byly porovnány s výsledky kontrolní (diploidní skupiny). U všech testovaných ryb byla potvrzena úspěšnost indukce triploidie.

V prvním experimentu byla testovaná látka aplikována do vodního roztoku v koncentraci 10 ng/l. Zvolená koncentrace odpovídá environmentálně relevantní hodnotě EE2 v povrchových vodách. Experiment probíhal na Jihočeské univerzitě v Českých Budějovicích (Fakulta rybářství a ochrany vod ve Vodňanech). Roztok EE2 byl připravován každý druhý den, současně s výměnou vodní lázně. Do experimentu byli zařazeni triploidí ve věku 1 týden. Vlastní expozice probíhala po dobu 14 týdnů. V průběhu experimentu byly pravidelně monitorovány základní fyzikálně-chemické parametry vody. Teplota vody byla $26 \pm 0,1^\circ\text{C}$ a světelný režim byl nastaven 14 h světla a 10 h tmy. Krmění probíhalo třikrát denně (ráno/poledne/večer) komerčním krmivem Tetra Min ve formě granulí. Po ukončení experimentu byly ryby zamrazeny (-80°C) a následně využity pro analýzu vitellogeninu v celotělním homogenátu.

V druhém experimentu byla testovaná látka aplikována v krmivu. Byly použity dvě různé testované koncentrace – 10 a 1 000 ng/kg. Nižší testovaná koncentrace odpovídá environmentálně relevantní hodnotě, druhá koncentrace byla zvolena jako násobek environmentálně relevantní koncentrace pro zhodnocení vztahu dávky a odpovědi organismu. Experiment byl proveden opět ve spolupráci Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích (Fakulta rybářství a ochrany vod ve Vodňanech), která zajistila produkci triploidní populace. Vlastní experiment ale proběhl na Ústavu ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství (VETUNI Brno). Do experimentu byli zařazeni opět jedinci ve věku 1 týdne, kterým bylo podáváno speciálně připravené krmivo. Příprava krmiva proběhla ve spolupráci s Masarykovou univerzitou (Farmaceutická fakulta). Pro přípravu experimentálního krmiva bylo využito komerčního produktu Gemma Micro 150 (GM 150). V prvním kroku bylo komerční krmivo smícháno s koloidním oxidem křemičitým (Aerosil®200), který slouží jako prevence následné tvorby hrudek. Po důkladném zamíchání bylo ke krmivu přidáno 10 ml zásobního roztoku EE2 připraveného v 96% ethanolu o příslušné koncentraci pro získání experimentálních krmiv o dvou různých koncentracích. Po důkladném promíchání bylo krmivo po 24 hodinách vysušeno. Kontrolní krmivo bylo připraveno pouze smícháním s 10 ml 96% ethanolu, další postup byl shodný s experimentálním krmivem. Vlastní experiment probíhal v průtočném systému (obrázek č. 1) s výměnou vody v 12-hodinových intervalech. Nejprve byla provedena dvoutýdenní aklimatizace a následně bylo po dobu 6 týdnů podáváno testované krmivo. Krmivo bylo podáváno *ad*

libitum dvakrát denně (ráno/večer) ve dvanáctihodinových intervalech. Při každém krmení byla zaznamenávána případná mortalita. V pravidelných intervalech byla prováděna kontrola základních fyzikálně-chemických parametrů vody (teplota, pH, obsah kyslíku, koncentrace dusitanů, dusičnanů a amoniaku). Průměrná teplota vody byla během pokusu $25,8^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Po ukončení experimentu byly ryby usmrceny předávkováním za použití anestetika MS 222 (Tricaine, Tricaine methanesulfonate). Následně byly ryby individuálně zváženy, byla určena délka těla a ryby byly ihned zamraženy a skladovány v hlubokomrazícím boxu (-80°C) do doby vlastní analýzy. Stanovena byla koncentrace vitellogeninu a aktivita vybraných detoxikačních a antioxidačních enzymů (glutathion-S-transferáza – GST, glutathionreduktáza – GR a glutathionperoxidáza – GPx). Pro analýzu vitellogeninu byl využit pouze homogenát připravený ze středu těla (bez hlavy, bez ocasní ploutve). Aktivita enzymů byly prováděny v celotělním homogenátu.

Obrázek č. 1. Průtočný systém pro provádění testů toxicity na dániu pruhovaném (foto: MVDr. Zuzana Weiserová).



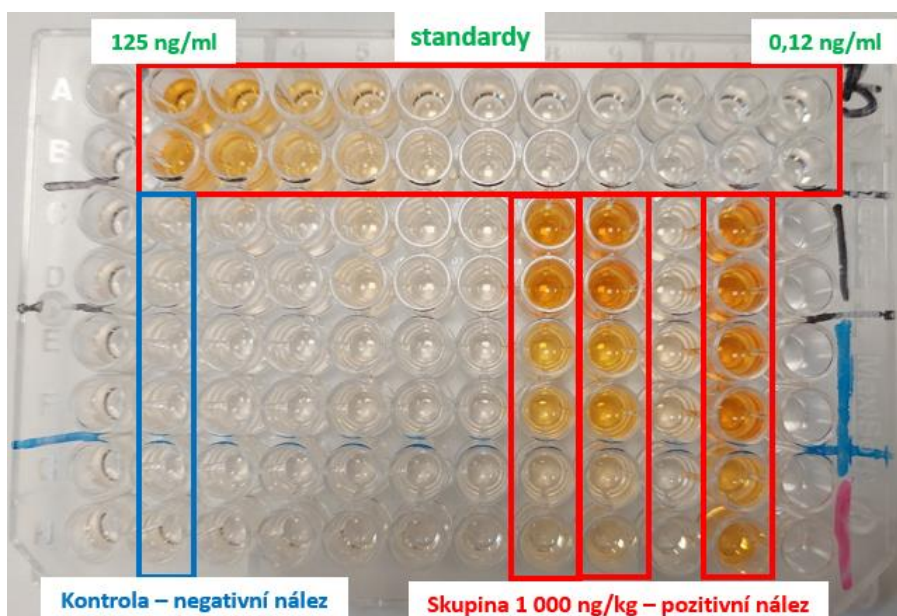
Analýza vitellogeninu v obou dílčích experimentech byla provedena ze středu těla, tzn. těla bez hlavy a ocasní ploutve, za použití komerčního ELISA kitu (Biosense Laboratories AS, Norsko). Po vyjmutí z hlubokomrazícího boxu byly vzorky homogenizovány (50 mmol/l TRIS-HCl, 1 % inhibitor proteáz, pH 7,4) s využitím přístroje TissueLyser II (Qiagen, USA). Homogenizace probíhala ve dvou cyklech, vždy o frekvenci 25 Hz po dobu 70 s. Následně byly zhomogenizované vzorky odstředěny při $18\,000 \times g$ a 4°C po dobu 30 minut (Microfuge 22R centrifuga, Beckman Coulter, USA). Následně byl odebrán supernatant pro stanovení koncentrace vitellogeninu. Stanovení vitellogeninu bylo provedeno sendvičovou ELISA metodou, vlastní detekce proběhla spektrofotometricky při vlnové délce 492 nm s využitím readru mikrotitračních destiček Varioskan Flash Reader (Thermo-Scientific, USA). Na obrázku č. 2 je ukázka mikrotitrační desky po inkubaci před vlastním spektrofotometrickým měřením. Vzhledem k tomu, že nebylo možné dopředu odhadnout koncentraci vitellogeninu v jednotlivých vzorcích, byly pro každý vzorek zvoleny tři různá ředění (250x, 2 500x, 25 000x)

Stanovení aktivity detoxikačních a antioxidačních enzymů (GST, GR, GPx) probíhalo spektrofotometricky (Habig et al., 1974; Carlberg and Mannervik, 1975; Flohe and Gunzler, 1984). Vzorky byly nejprve homogenizovány ve fosfátovém pufru (50 mmol/l KH_2PO_4 ,

1 mmol/l EDTA, pH 7,4) a supernatant byl využit pro dílčí analýzy. Aktivita enzymů byla normalizována na koncentraci proteinu, který byl stanoven také spektrofotometricky pomocí kyseliny bicinchoninové (Smith et al, 1985). Spektrofotometrické stanovení bylo provedeno v mikrotitračních destičkách s využitím readru mikrotitračních destiček Varioskan Flash Reader (Thermo-Scientific, USA).

Statistické zpracování bylo provedeno v programu Unistat for Excel 6.5. Nejprve bylo provedeno testování normality (Shapiro-Wilkův test) a homogenity rozptylu (Levenův test). Pro data, která vykazovala normální rozdělení, byla dále využita analýza rozptylu a test mnohonásobného porovnání (Tukey-HSD). V případě nesplnění podmínky normality byl využit vícevýběrový mediánový test. Testování rozdílů v mortalitě bylo provedeno s využitím kontingenčních tabulek. V případě experimentu, ve kterém byl sledován vliv EE2 ve vodní lázni, bylo testování rozdílů mezi středními hodnotami provedeno pomocí Mann-Whitneyova testu. Testování proběhlo na hladině významnosti $p < 0,05$ a $p < 0,01$.

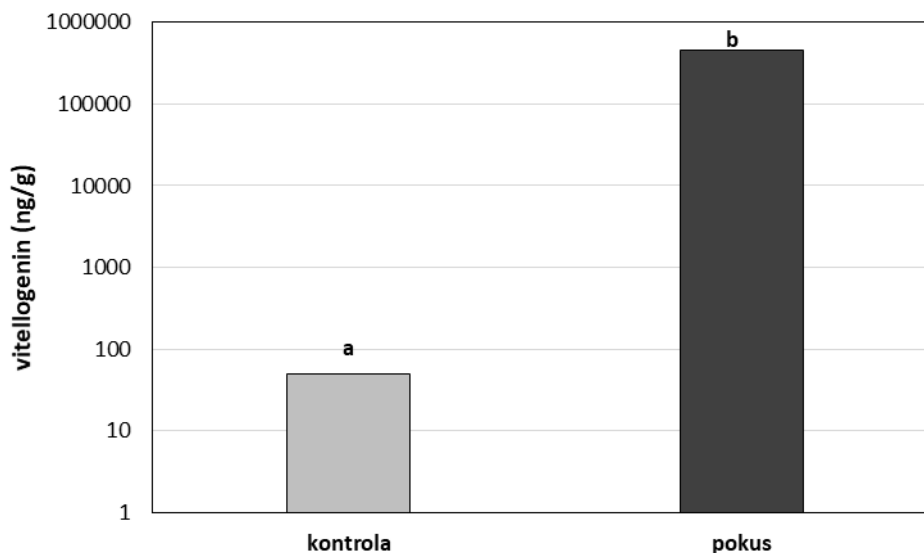
Obrázek č. 2. Analýza vitellogeninu s využitím ELISA metody – ukázka mikrotitrační desky po inkubaci (foto: MVDr. Zuzana Weiserová).



Výsledky

Výsledky analýzy vitellogeninu v celotělovém homogenátu dávia pruhovaného po 14-týdenní expozici 10 ng/l EE2 jsou uvedeny v grafu č. 1. U pokusné skupiny došlo ke statisticky vysoce významnému zvýšení produkce vitellogeninu v porovnání s kontrolní skupinou ($p < 0,01$). Detailní výsledky analýzy vitellogeninu jsou uvedeny v tabulce č. 1. V pokusné skupině byla přítomnost vitellogeninu potvrzena u všech analyzovaných vzorků. V kontrolní neexponované skupině to bylo pouze u dvou jedinců z celkového počtu deseti analyzovaných vzorků.

Graf č. 1. Koncentrace vitellogeninu v celotělovém homogenátu triploidů dánia pruhovaného po 14-týdenní expozici ethinylestradiolem ve vodě v koncentraci 10 ng/l. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě mediánové hodnoty. Rozdílná písmena (a, b) indikují statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($p < 0,01$). V případě výsledků pod mezí detekce byla pro statistické zpracování použita polovina meze detekce (tzn. 50 ng/g).



Tabulka č. 1. Výsledky analýzy vitellogeninu v celotělovém homogenátu triploidů dánia pruhovaného po 14-týdenní expozici ethinylestradiolem ve vodě v koncentraci 10 ng/l.

	kontrola	pokus
počet analyzovaných vzorků	10	10
medián (ng/g)	50*	449 461
maximum (ng/g)	26 312	1 217 755
minimum (ng/g)	< 300	53 007
počet pozitivních vzorků	2	10

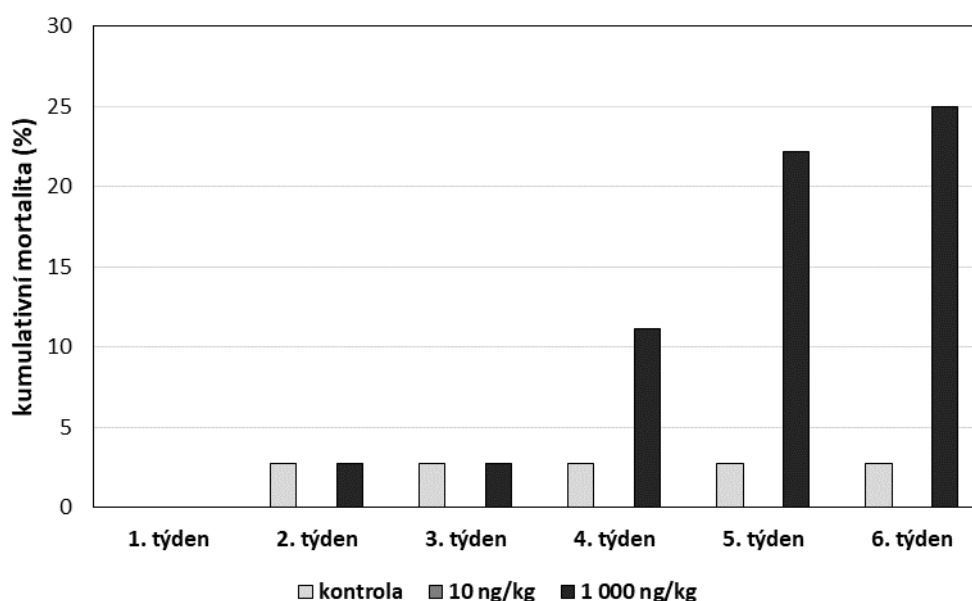
* v případě výsledků pod mezí detekce (100 ng/g) byla pro statistické zpracování použita polovina meze detekce (tzn. 50 ng/g)

V druhém dílčím experimentu byla sledována odezva organismu na perorální aplikaci EE2 po dobu 6 týdnů. Morfologické ukazatele na ukončení experimentu jsou uvedeny v tabulce č. 2. Z uvedených výsledků je zřejmé, že především vyšší testovaná koncentrace (1 000 ng/g) významně ovlivnila finální hmotnost i délku ryb, kdy u obou parametrů došlo ke snížení v porovnání s kontrolní skupinou. V případě délky těla byl statisticky významný rozdíl potvrzen také mezi experimentální skupinou vystavenou EE2 v koncentraci 10 a 1 000 ng/g. Mimo jiné byla v nejvyšší testované koncentraci také zaznamenána rozsáhlá mortalita. Tato hodnota byla testována jako statisticky vysoce významná v porovnání s kontrolou i pokusnou skupinou vystavenou 10 ng EE2/kg. V grafu č. 2 jsou uvedeny výsledky kumulativní mortality, kde je zřejmé, že ke zvýšenému úhynu docházelo až po delší expozici. Po čtyřech týdnech byla mortalita 11,1 %, po pátém týdnu 22,2 % a po ukončení expozice to bylo 25 %.

Tabulka č. 2. Morfologické ukazatele triploidů dánia pruhovaného po 6-týdenní expozici ethinylestradiolem podávaným v krmivu. Výsledky délky těla a hmotnosti jsou vyjádřeny ve formě mediánové hodnoty. Rozdílná písmena (a, b) indikují statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($p < 0,01$).

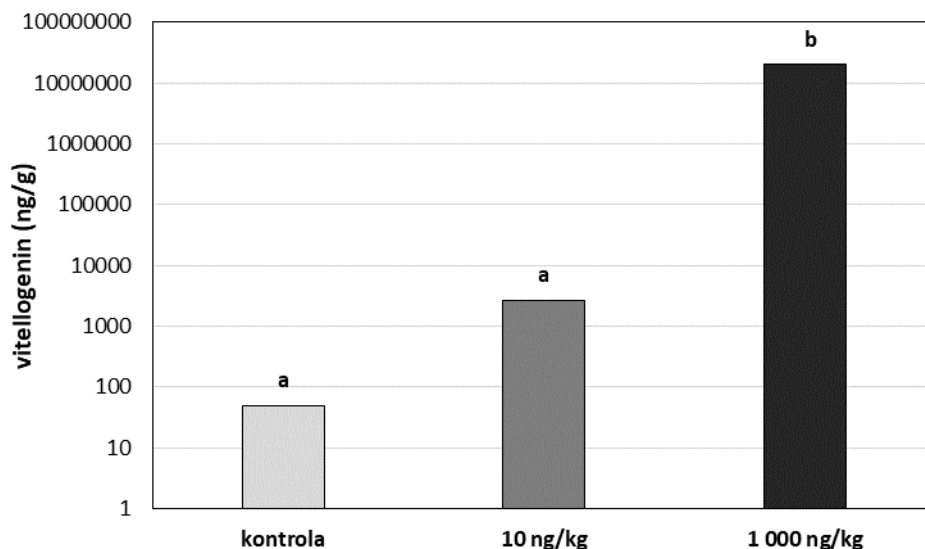
	kontrola (n=35)	10 ng/kg (n=36)	1 000 ng/kg (n=27)
mortalita (%)	2,8 ^a	0 ^a	25,0 ^b
délka těla (mm)	27,0 ^a	28,1 ^a	20,0 ^b
hmotnost těla (mg)	267,6 ^a	303,9 ^b	116,0 ^b

Graf č. 2. Kumulativní mortalita (%) triploidů dánia pruhovaného v průběhu 6-týdenní expozici ethinylestradiolem podávaným v krmivu.



Dalším ze sledovaných parametrů byl obsah vitellogeninu v tělním homogenátu. Pro analýzu byl využit pouze střed těla, tzn. bez hlavy a ocasní ploutve. Výsledky vitellogeninu jsou uvedeny v grafu č. 3 a tabulce č. 3. Z uvedených výsledků je zřejmé, že v experimentální skupině vystavené nejvyšší testované skupině (1 000 ng/kg)šlo ke statisticky vysoce významnému zvýšení koncentrace vitellogeninu. Koncentrace vitellogeninu je pohybovaly řádově v jednotkách až desítkách milionů ng/g, v kontrolní skupině byla maximální koncentrace řádově v jednotkách tisíců ng/g. Experimentální skupina vystavená environmentálně relevantní koncentraci EE2 (10 ng/kg) sice vykazovala také mírné zvýšení vitellogeninu, ale v porovnání s kontrolou nebyl tento rozdíl testován jako statisticky významný. Zajímavý je ovšem záchyt pozitivních vzorků, kdy v kontrolní skupině to bylo 40 % jedinců, ale v případě obou exponovaných skupin to bylo 100 % jedinců.

Graf č. 3. Koncentrace vitellogeninu v celotělovém homogenátu triploidů dávia pruhovaného po 6-týdenní expozici ethinylestradiolem podávaným v krmivu. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě mediánové hodnoty. Rozdílná písmena (a, b) indikují statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($p < 0,01$). V případě výsledků pod mezí detekce byla pro statistické zpracování použita polovina meze detekce (tzn. 50 ng/g).



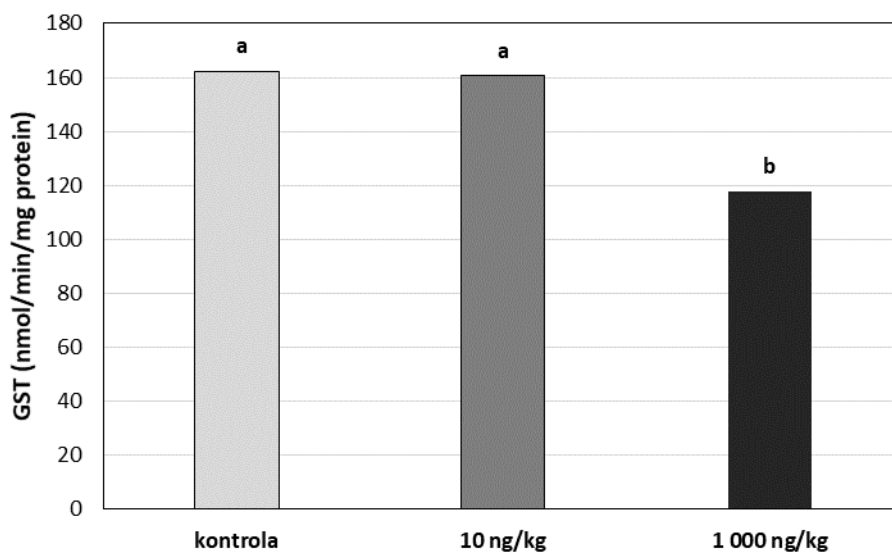
Tabulka č. 3. Výsledky analýzy vitellogeninu v celotělovém homogenátu dávia pruhovaného po 6-týdenní expozici ethinylestradiolem podávaným v krmivu.

	kontrola	10 ng/kg	1 000 ng/kg
počet analyzovaných vzorků	10	10	7
medián (ng/g)	50*	2 643	20 044 480
maximum (ng/g)	8 904	6 259	7 323 694
minimum (ng/g)	< 300	1 252	21 515 882
počet pozitivní vzorků	4	10	7

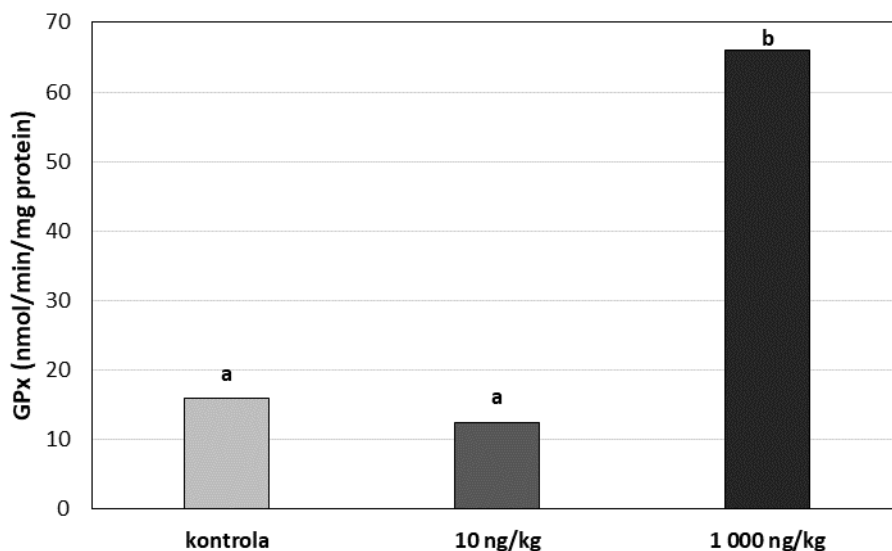
* v případě výsledků pod mezí detekce (100 ng/g) byla pro statistické zpracování použita polovina meze detekce (tzn. 50 ng/g)

Mezi další analyzované markery patřily aktivity detoxikačních a antioxidačních enzymů (GST, GPx, GR). Výsledky jsou uvedeny v grafech č. 4 až 6. U všech enzymů došlo k signifikantním změnám v případě experimentální skupiny vystavené nejvyšší testované koncentraci EE2 (1 000 ng/kg). V případě detoxikačního enzymu GST byl zaznamenán statisticky významný ($p < 0,05$) pokles aktivity. Pokusná skupina vystavená EE2 v koncentraci 10 ng/kg se oproti kontrolní skupině nelišila. Obdobný trend byl zaznamenán i v případě analýzy GR. Zde došlo ke statisticky významnému ($p < 0,05$) poklesu aktivity ale v obou pokusných skupinách. Nebyl ovšem zaznamenán rozdíl mezi exponovanými skupinami vystavenými EE2 v koncentracích 10 ng/kg a 1 000 ng/kg. Při analýze GPx bylo zjištěno, že nejvyšší testovaná koncentrace vedla ke statisticky vysoce významnému zvýšení aktivity tohoto antioxidačního enzymu, ale pouze v případě experimentální skupiny vystavené nejvyšší testované koncentraci. Toto zvýšení bylo v porovnání s kontrolní skupinou více jak čtyřnásobné.

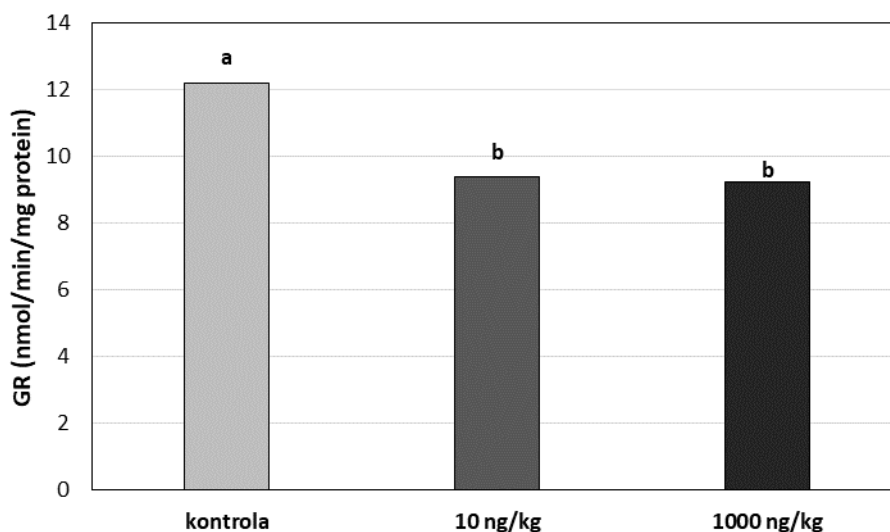
Graf č. 4. Aktivita glutathion-S-transferázy (GST) v celotělovém homogenátu triploidů dánia pruhovaného po 6-týdenní expozici ethinylestradiolem podávaným v krmivu. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě mediánové hodnoty. Rozdílná písmena (a, b) indikují statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($p < 0,05$).



Graf č. 5. Aktivita glutathionperoxidázy (GPx) v celotělovém homogenátu triploidů dánia pruhovaného po 6-týdenní expozici ethinylestradiolem podávaným v krmivu. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě mediánové hodnoty. Rozdílná písmena (a, b) indikují statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($p < 0,01$).



Graf č. 6. Aktivita glutathionreduktázy v celotělním homogenátu dánia pruhovaného po 6-týdenní expozici ethinylestradiolu podávaného v krmivu. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě mediánové hodnoty. Rozdílná písmena (a, b) indikují statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($p < 0,05$).



Diskuze

Ve vodním prostředí můžeme detekovat rozličné spektrum antropogenních kontaminantů, včetně široké škály zmiňovaných endokrinních disruptorů. Všechny tyto látky pak společně působí na vodní organismy, přestože jsou jejich jednotlivé environmentální koncentrace relativně nízké. Vzhledem ke komplexnosti vodních živočichů není možné vliv těchto látek nasimulovat in-vitro a pro posouzení jejich negativních vlivů využíváme různých testů toxicity (Velíšek, 2018).

Cílem našeho experimentu bylo zjistit toxicitu EE2, což je semisyntetický estrogen užívaný v humánní orální antikoncepci. V porovnání s přírodním estradiolem je EE2 ve vodním prostředí stabilnější a vykazuje vyšší estrogení potenciál (11 až 27x) (Frontis et al., 2015). Pro komplexní zhodnocení byly negativní účinky posuzovány v rámci dvou dílčích experimentů, kdy testovaná látka byla podávána ve vodě a v krmivu. Do experimentu byly využity triploidní formy dánia pruhovaného, protože se jedná o celosamčí populaci, která se velmi dobře hodí pro hodnocení estrogenních efektů. Sledování probíhalo dlouhodobě, a to nejen během období dospívání, ale i v období krátce po dosažení pohlavní dospělosti. V případě experimentu, kdy testovaná látka byla podávána ve vodě, byl délka pokusu 14 týdnů. Při testování účinků EE2 podávaného v krmivu byla zvolena délka experimentu 6 týdnů. Obecně lze v literatuře nalézt pouze omezené informace, které se týkají sledování účinků toxicity kontaminantů po perorální aplikaci. Jako hlavní indikátor negativního účinku EE2 byl zvolen vitellogenin, který se hojně využívá jako marker endokrinní disrupce (Sumpter, 1995; Drastichová et al., 2004; Maltais and Roy, 2014).

Testování toxicity EE2 bylo zvoleno nejen z důvodu, že se tato látka hojně vyskytuje ve vodním prostředí, ale můžeme ji také detekovat v potravním řetězci (Dussault et al., 2009; Zhang et al., 2011). V České republice proběhla v uplynulých letech řada vědeckých studií, které odhalily zvýšené koncentrace vitellogeninu u ryb. Na řece Dyji se například zkoumal vliv estrogenních látek na parmu obecnou (*Barbus barbus*) (Peňáz et al., 2005). Další studie proběhly na řekách Ticha Orlice (Kolářová et al., 2005; Havelková et al., 2008) a Labe (Žlábek et al., 2009), kde byl hodnocen účinek na pstruha potočního (*Salmo trutta fario*). Obdobný trend ovšem lze zaznamenat i na celém světě, protože se aktuálně jedná o velmi často diskutovanou problematiku (Weiwei, 2017; Kalu et al., 2018). Toxikologické studie uvádějí, že vodní organismy nejsou významným způsobem ovlivněny nízkými koncentracemi EE2, řádově desítky ng/l (Laurenson et al., 2014). Ve vodním prostředí ovšem můžeme nalézt i mnohonásobně vyšší koncentrace, řádově se může jednat o stovky ng/l, což už pro

vodní organismy představuje významné riziko, a to zvláště při chronické expozici (Ramírez-Montero et al., 2022).

Výsledky analýzy vitellogeninu ukazují na úzký vztah mezi množstvím aplikovaného EE2 a koncentrací tohoto analytu v celotělním homogenátu. V obou testech došlo u nejvyšších testovaných koncentrací k významnému nárůstu obsahu vitellogeninu. Zajímavé je také zjištění, že v exponovaných skupinách byl u všech testovaných jedinců zjištěn pozitivní nález vitellogeninu. V experimentu zaměřeném na perorální aplikaci byla u nejvyšší testované skupiny také zaznamenána významná mortalita (25 %) a významné změny morfologických parametrů, které jednoznačně indikují významnou toxicitu EE2. Došlo k významnému snížení hmotnosti a délky těla, což může být zapříčiněno nižším zájmem ryb o krmivo, případně jeho sníženou konverzí v důsledku působení EE2. Obdobné závěry byly potvrzeny i v jiných studiích (Versonnen and Janssen, 2004; Ramírez-Montero et al., 2022).

Mezi další hojně využívané biomarkery řadíme analýzy aktivit detoxikačních a antioxidačních enzymů. V rámci naší studie bylo provedeno stanovení aktivity GST, GR a GPx v celotělním homogenátu po perorální expozici EE2. GST je klíčovým enzymem v procesu detoxikace endogenních a exogenních látek. Vyskytuje se prakticky u všech živočichů a jako katalyzátor se podílí na konjugaci redukováného glutathionu a xenobiotika (Ranson et al., 2005). V našem experimentu bylo zjištěno, že u skupiny exponované EE2 v koncentraci 1 000 ng/kg došlo k významnému snížení aktivity tohoto detoxikačního enzymu, což může indikovat významné zatížení organismu. Ze získaných výsledků lze usuzovat, že vysoká koncentrace EE2 snížila schopnost organismu tuto látku detoxikovat, což mohl vést k jeho kumulaci a zvyšování jeho toxického potenciálu. GPx se významně podílí na antioxidačním systému buněk, kdy katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku na vodu za současné oxidace redukováného glutathionu na oxidovanou formu (Matoušková et al., 2014). Zvýšení aktivity GPx u pokusné skupiny vystavené EE2 v koncentraci 1 000 ng/kg indikuje na rostoucí potřebu obranných buněčných mechanismů organismu. Pozorovaný jev mohl být opět zapříčiněn schopností kumulace EE2 v organismu. Statisticky významné změny byly pozorovány i v případě antioxidačního enzymu GR, kdy došlo v případě obou pokusných skupin ke snížení. GR katalyzuje redukci oxidovaného glutathionu na jeho redukovanou formu a zabezpečují tedy jeden z důležitých kroků antioxidační ochrany. Doplňuje tak funkci GPx při detoxikaci peroxidů (Matoušková et al., 2014). Snížení tohoto enzymu poukazuje na snížení antioxidační schopnosti organismu a jeho vyšší náchylnost k buněčnému poškození.

Závěr

Výsledky naší studie potvrdili, že vystavení triploidních forem dáňia pruhovaného účinkům EE2 indukuje tvorbu vitellogeninu. Produkce vitellogeninu byla potvrzena jak ve studii, kdy byla testovaná látka podávána ve vodě, tak v experimentu zaměřeném na perorální aplikaci. Vyšší testovaná koncentrace (1 000 ng/kg) podávaná v krmivu vedla k mnohonásobně zvýšené odpovědi organismu. Obdobný trend byl také zaznamenán v případě analýzy detoxikačních a antioxidačních enzymů (GST, GPx a GR), kdy významnější změny byly potvrzeny především u experimentální skupiny vystavené nejvyšší testované koncentraci. Významné změny byly ovšem zaznamenány i v případě aktivity GR po expozici 10 ng/kg. V případě nejvyšší testované koncentrace EE2 (1 000 ng/kg) byly mimo jiné zaznamenány i významné změny v rámci morfologických parametrů, kdy jak u délky těla, tak u hmotnosti došlo k významnému snížení. Zároveň v této skupině byla pozorována vysoká mortalita, která na konci experimentu dosáhla 25 %. Chronické působení v délce několika týdnů nám dává poměrně komplexní obraz o působení polutantů na fyziologické funkce exponovaného organismu. Zvolené období pokusu v průběhu pohlavního dospívání a krátce po tomto období zasahuje do životní fáze ryb citlivé k přítomnosti xenobiotik a umožňuje nám získat poměrně komplexní informace o tom, jak mohou tyto látky v odpadních a povrchových vodách ovlivnit rybí populaci. Využití triploidní populace dáňia pruhovaného v testech toxicity má své výhody také z hlediska redukce počtu experimentálních zvířat, protože při sledování xenoestrogenních účinků se pozorování provádí především u samčí populace.

Tato práce byla finančně podpořena projektem 2021ITA22 VETUNI.

Literatura

- Andersen, L., Holbech, H., Gessbo, Å., Norrgren, L., Petersen, G.I. 2003. Effects of exposure to 17 α -ethinylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 134: 365-374.
- Ben, W., Zhu, B., Yuan, X., Zhang, Y., Yang, M., Qiang, Z. 2017. Transformation and fate of natural estrogens and their conjugates in wastewater treatment plants: Influence of operational parameters and removal pathways. *Water Research* 124: 244-250.
- Carlberg, I., Mannervik, B. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry* 250: 5475-5480.
- Dhont, M. 2010. History of oral contraception. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care* 15: 12-18.
- Drastichová, J., Šíroková, Z., Žlábek, V. 2004. Review article: Vitellogenin as a biomarker for the exposure of fish to estrogenic chemicals. *Folia Veterinaria* 48: 114-118.
- Dussault, È.B., Balakrishnan, V.K., Borgmann, U., Solomon, K.R., Sibley, P.K. 2009. Bioaccumulation of the synthetic hormone 17 α -ethinylestradiol in the benthic invertebrates *Chironomus tentans* and *Hyalella Azteca*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1635-1641.
- Ekpeghere, K., Sim, W.J., Lee, H.J., Oh, J.E. 2018. Occurrence and distribution of carbamazepine, nicotine, estrogenic compounds, and their transformation products in wastewater from various treatment plants and the aquatic environment. *Science of the Total Environment* 640: 1015-1023.
- Flohe, L., Gunzler, W.A. 1985. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* 105: 114-121.
- Franěk, R., Tichopád, T., Fučíková, M., Steinbach, C., Pšenička, M. 2019. Production and use of triploid zebrafish for surrogate reproduction. *Theriogenology* 140: 33-43.
- Frontistis, Z., Kouramanos, M.S., Chatzisyneon, E., Hapeshi, E., Fatta-Kassinos, D., Xekoukoulotakis N.P., Mantzavinos, D. 2015. UV and simulated solar photodegradation of 17 α -ethinylestradiol in secondary-treated wastewater by hydrogen peroxide or iron addition. *Catalysis Today* 252: 84-92.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jacoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferases. First enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249: 7130-7139.
- Hansen, P.D., Dizer, H., Hock, B., Marx, A., Sherry, J., McMaster, M., Blaise, C. 1998. Vitellogenin – a biomarker for endocrine disruptors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 17: 448-451.
- Havelková, M., Svobodová, Z., Kolářová, J., Krijt, J., Némethová, D., Jarkovský, J., Pospíšil, R. 2008. Organic pollutant contamination of the river Tichá Orlice as assessed by biochemical markers. *Acta Veterinaria Brno* 77: 133-141.
- Hiramatsu, N., Matsubara, T., Fujita, T., Sullivan, C.V., Hara, A. 2006. Multiple piscine vitellogenins: biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments. *Marine Biology* 149: 35-47.
- Kavumpurath, S., Pandian, T.J. 1990. Induction of triploidy in the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton). *Aquaculture Research* 21: 299-306.
- Kolarova, J., Svobodova, Z., Zlabek, V., Randak, T., Hajslova, J., Suchan, P. 2005. Organochlorine and PAHs in brown trout (*Salmo trutta fario*) population from Tichá Orlice river due to chemical plant with possible effects to vitellogenin expression. *Fresenius Environmental Bulletin* 14: 1091-1096.
- Kumar, V., Johnson, A.C., Trubiroha, A., Tumová, J., Ihara, M., Grabic, R., Kloas, W., Tanaka, H., Kocour Kroupová, H. 2015. The challenge presented by progestins in ecotoxicological research: a critical review. *Environmental Science and Technology* 49: 2625-2638.

- Laurenson, J.P., Bloom, R.A., Page, S., Sandrieh, N. 2014. Ethinyl estradiol and other human pharmaceutical estrogens in the aquatic environment: a review of recent risk assessment data. *The AAPS Journal* 16: 299-310.
- Liu, S., Chen, H., Xu, X.R., Liu, S.S., Sun, K.F., Zhao, J.L., Ying, G.G. 2015. Steroids in marine aquaculture farms surrounding Hailing Island South China: Occurrence, bioconcentration, and human dietary exposure. *Science of the Total Environment* 502: 400-407.
- Maltais, D., Roy, R.L. 2014. Effects of nonylphenol and ethinylestradiol on copper redhorse (*Moxostoma hubbsi*), an endangered species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 108: 168-178.
- Matoušková, M., Ruttkay-Nedecký, B., Kizek, R. 2014. Antioxidační enzymy – biochemické markery oxidačního stresu. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*, 3: 53-56.
- Mears, E., Grant, E.C. 1962. "Anovlar" as an oral contraceptive. *Physiology of Reproduction* 14: 75-79.
- Nilsen, B.M., Berg, K., Eidem, J.K., Kristiansen, S.I., Brion, F., Porcher, J.M., Goksyr, A. 2004. Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378: 621-633.
- Ortiz-Villanueva, E., Jaumot, J., Martínez, R., Navarro-Martín, L., Piña, B., Tauler, R. 2018. Assessment of endocrine disruptors effects on zebrafish (*Danio rerio*) embryos by untargeted LC-HRMS metabolomic analysis. *Science of the Total Environment* 635: 156-166.
- Peňáz, M., Svobodová, Z., Baruš, V., Prokeš, M., Drastichová, J. 2005. Endocrine disruption in a barbel, *Barbus barbus* population from the River Jihlava, Czech Republic. *Journal of Applied Ichthyology* 21: 420-428.
- Ramírez-Montero, M. del C., Gómez-Oliván, L.M., Gutiérrez-Noya, V.M., Orozco-Hernández, J.M., Islas-Flores, H., Elizalde-Velázquez, G.A., SanJuan-Reyes, N., Galar-Martínez, M. 2022. Acute exposure to 17- α -ethinylestradiol disrupt the embryonic development and oxidative status of *Danio rerio*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 251: 109199.
- Ranson, H., Hemingway, J. 2005. Glutathione Transferases. In: Gilbert, L.I. (Ed.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Amsterdam, 383-402.
- Reading, B.J., Sullivan, C.V., Schilling, J. 2017. Vitellogenesis in fishes. In: *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.03076-4
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hemranson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150: 76-85.
- Sumpter, J.P. 1995. Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicology Letters* 82: 737-742.
- Tyler, C.R., van Aerle, R., Hutchinson, T.H., Maddix, S., Trip, H. 1999. An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 337-347.
- Versonne, B.J., Janssen, C.R. 2004. Xenoestrogenic effects of ethinylestradiol in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology* 19: 198-206.
- Velíšek, J. (ed.). 2018. *Vodní toxikologie pro rybáře*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Vodňany, 608 s.
- Zhang, X., Gao, Y., Li, Q., Li, G., Guo, Q., Yan, Ch. 2011. Estrogenic compounds and estrogenicity in surface water, sediments, and organisms from Yundang Lagoon in Xiamen, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61: 93-100.
- Žlábek, V., Randák, T., Kolářová, J., Svobodová, Z., Kroupová, H. 2009. 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* 82: 280-284.

Srovnání úrovně zdraví zvířat porážených na jatkách

Simona Ninčáková¹, Vladimír Večerek², Lenka Válková², Eva Voslářová²,
Michal Kaluža², Veronika Zavřelová²

¹Státní veterinární správa ČR, ²Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno

Abstrakt

Práce se zabývá úrovní zdraví skotu, prasat, ovcí, koz, králíků, drůbeže a pštrosů porážených na jatkách v České republice na základě výskytu nálezů detekovaných při post mortem veterinární prohlídce na jatkách v období let 2010 až 2019. Úroveň zdraví byla vyjadřovaná jako tzv. PA index získaný podílem počtu nálezů k celkovému počtu zjišťování (15) při patoanatomické prohlídce na jatkách násobený stem. Savci (skot, prasata, ovce a kozy) obecně měli vyšší PA index než ptáci (kur, krůty, kachny, husy, pštrosi), výjimkou byla jen kůzlata a králíci. Nejvyšší PA index byl zjištěn u krav (15,13) a selat (12,18), naopak nejnižší u brojlerových kuřat (0,102) a králíků a hus (obojí 0,14). U drůbeže se hodnoty PA indexu pohybovaly pod 1, s výjimkou nosnic (PA index 2,165). Z porovnání PA indexu u skupiny dospělých zvířat, skupiny zvířat vykrmovaných nebo mladých a skupiny mláďat vyřazovaných z chovu vyplývá, že vyšší PA index byl zjišťován u skupiny dospělých zvířat (PA index se pohyboval od 2,17 do 15,13) a skupiny mláďat vyřazovaných z chovu (PA index od 10,79 do 12,18), než u vykrmovaných zvířat (PA od 0,10 do 5,32). Ucelený přehled o zdravotní kondici porážených zvířat umožňuje chovatelům, veterinárním lékařům, přepravníkům i provozovatelům jatek přijmout odpovídající a přesně zacílená preventivní opatření a tím v budoucnu zvýšit welfare a zdraví zvířat a současně snížit výskyt poškození jatečných těl.

Úvod

Veterinární prohlídka zvířat a jejich jatečných těl na jatkách je nejrozšířenějším a také nejdéle využívaným nástrojem veterinárního dozoru. Primárním účelem této prohlídky je identifikovat zvířata, jejichž maso a orgány nejsou vhodné pro lidskou spotřebu, a odstranit je tak z potravního řetězce. Veterinární prohlídka má však velký význam i z hlediska epizootologie a kontroly zdraví hospodářských zvířat. Dosud ne plně doceněným a dostatečně využívaným potenciálem veterinární prohlídky je možnost identifikovat a reflektovat aktuální problematiku welfare hospodářských zvířat (Stark et al., 2014, 2017). Patoanatomické změny, které lze vyčíst z jatečných těl porážených zvířat, lze mnohem snáze a precizněji monitorovat při postmortální prohlídce na jatkách (Huneau-Salaun et al., 2015). Důkladný rozbor četnosti trendů ve výskytu pato-anatomických nálezů tak může chovatelům a veterinárním lékařům poskytnout zpětnou vazbu, na základě které mohou aplikovat vhodná preventivní opatření a eliminovat tak riziko ohrožení zdraví zvířat a také ekonomických ztrát v chovech (Ceccarelli et al., 2018; Januskeviciene et al., 2010). Přestože protokoly z prohlídek (zejména těch postmortálních) poskytují velké množství informací o zdravotním stavu a kondici jatečných zvířat, není tento potenciál zatím ve většině zemí systematicky využíván (Stark, 2017).

Většina stávajících studií, které se zabývají příčinami vyřazení jatečných těl z lidské spotřeby či komplexně patoanatomickými nálezy zjištěnými v rámci postmortální veterinární prohlídky na jatkách, se zaměřuje na konkrétní druh hospodářského zvířete, např. skot (Tabaran et al., 2018; Kaluža et al., 2020, 2021), prasata (Hansson et al., 2000; Kongsted and Sorensen, 2017; Večerek et al., 2020a,b), králíky (Drozd et al., 2019; Válková et al., 2021), brojlerová kuřata (Jakob et al., 1998; Ferreira et al., 2012; Amini et al., 2015; Buzdugan et al., 2020), nosnice (Keutgen et al., 1999), krůty (Lupo et al., 2010) nebo pštrosy (Dzoma et al.,

2009). Vzhledem k odlišnostem v zaměření studií, metodice hodnocení nálezů, době trvání a rozsahu sledování (často údaje jen z jedné nebo několika málo jatek), je mezidruhové srovnání četnosti PA nálezů u jednotlivých druhů je obtížné. Studií, které za stejných podmínek a ve stejném období sledují, analyzují a vzájemně porovnávají patoanatomické nálezy u více druhů či kategorií hospodářských zvířat je minimum. Januskeviciene et al. (2010) srovnávali výskyt patologických nálezů u skotu, prasat, ovcí, koz, koní, králíků, zvěře a drůbeže (brojlerová kuřata, krůty, kachny) v Litvě v letech 2007–2009. Ceccarelli et al. (2018) analyzovali příčiny konfiskace jatečných těl a orgánů u skotu, prasat, ovcí a koní na vybraných jatcích v Itálii v letech 2010–2016. Lis (2005) sledoval výskyt patologických nálezů u skotu, prasat, ovcí a koní na jatcích v Polsku v roce 2003. Salines et al. (2017) se zaměřili na srovnání příčin vyrazení jatečných těl z lidské spotřeby u brojlerů, krůt, kachen a perliček poražených v Francii během jednoho roku (2012 to 2013).

Cílem této studie bylo na základě výsledku veterinární prohlídky na jatcích zhodnotit zdraví skotu, prasat, ovcí, koz, králíků, drůbeže (nosnice, brojleři, krůty, kachny, husy) a pštrosů pocházejících z chovů v České republice a poražených na jatcích v České republice v období let 2010 až 2019.

Materiál a metodika

Úroveň zdraví zvířat byla hodnocena na základě četností patoanatomických nálezů zjišťovaných v rámci veterinární prohlídky na jatcích u zvířat poražených na jatcích v České republice v období let 2010 až 2019. Úroveň zdraví byla vyjadřovaná jako tzv. PA index získaný podílem počtu nálezů k celkovému počtu zjišťování při patoanatomické prohlídce na jatcích násobený stem. PA index tak vyjadřoval hodnotu umožňující porovnávání úrovně zdraví jednotlivých druhů a kategorií poražených zvířat v určeném časovém období.

Bylo posuzováno zdraví skotu v kategoriích krávy, jalovice, býci ve výkrmu, telata, zdraví prasat v kategoriích prasnice, prasata ve výkrmu, selata, zdraví ovcí v kategorii ovce a jehňata, zdraví koz v kategorii kozy a kůzlata, zdraví králíků, zdraví drůbeže v kategoriích nosnice, brojleři, krůty, kachny, husy, a dále zdraví pštrosů.

Pro každé zvíře bylo provedeno 15 hodnocení zaměřených na orgánové nebo tkáňové celky anebo části těl, a to: játra, ledviny, plíce, gastrointestinální trakt, slezina, srdce, nervový systém, kůže, pohlavní orgány a mléčná žláza, hlava, trup, končetiny, svalovina, jiné nálezy a celý organismus (zahrnující nálezy nedostatečný vývin (zakrslost), vyhublost, ascites, abscesy, tuberkuloidní změny, cysticerkóza). U každého hodnocení byl učiněn závěr s nálezem anebo bez nálezů. Pro každý druh a kategorii poražených zvířat tak byl získán souhrnný počet nálezů a počet hodnocení za celé sledované období 10 let. Podíl počtu nálezů k počtu hodnocení násobený stem představoval hodnotu vyjadřující úroveň zdraví pomocí indexu PA nálezů nabývajících číselné hodnoty od 0 do 100.

Celková úroveň zdraví pro každý druh a kategorii poražených zvířat byla posuzována na základě hodnot PA indexu. Porovnáním PA indexů mezi jednotlivými druhy a kategoriemi poražených zvířat byly zjišťovány rozdíly mezi druhy a kategoriemi zvířat poražených na jatcích.

Dále byla porovnávána úroveň zdraví v rámci jednotlivých kategorií daného druhu a také mezidruhově v rámci skupiny dospělých zvířat, v rámci skupiny zvířat vykrmovaných nebo mladých a v rámci skupiny mláďat vyřazovaných z chovu.

K statistickému hodnocení byl použit počítačový program Unistat 6.5 for Excel (Unistat Ltd., London, England), a to Chí kvadrát test pro hodnocení statistické významnosti v kontingenční tabulce 2x2 používající při četnostech překračujících 5 Yatesovu korekci a při četnostech nižších než 5 Fisherův přesný test.

Výsledky

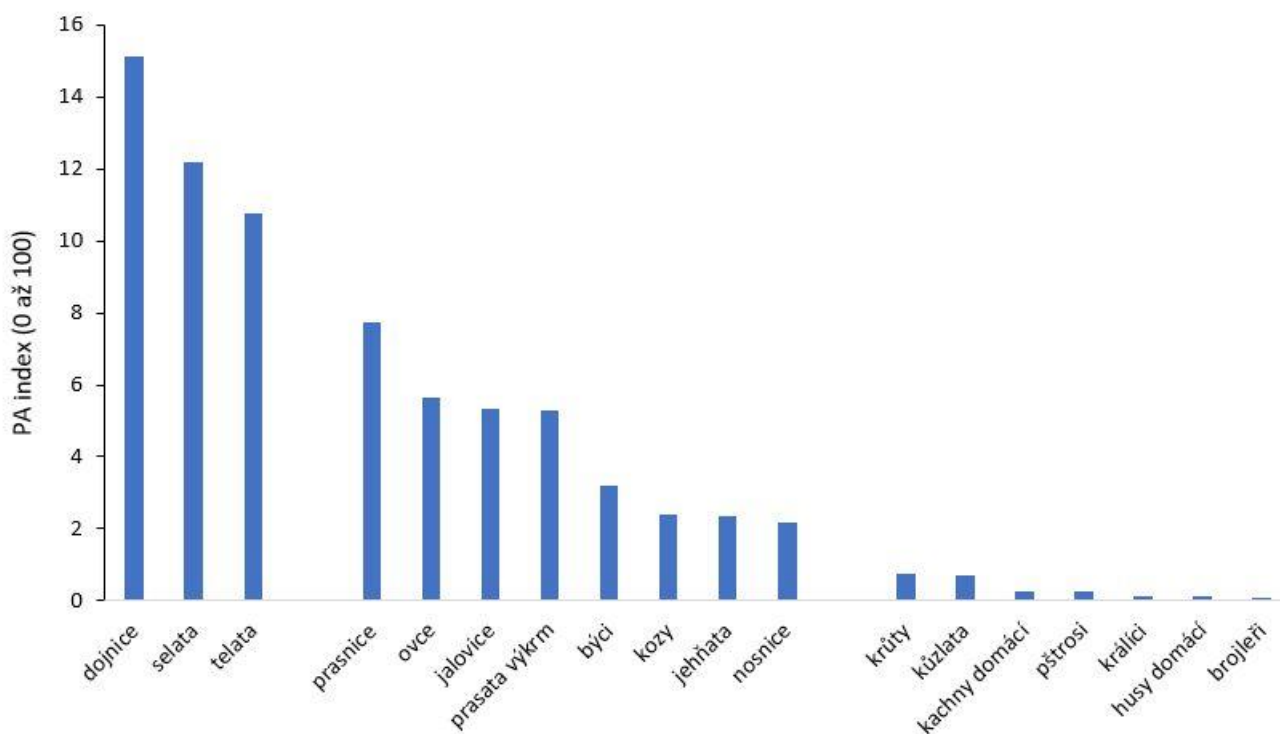
Srovnání hodnot PA indexu mezi jednotlivými druhy a kategoriemi zvířat poražených na jatkách v ČR v období let 2010 až 2019 je uvedeno v tabulce 1 a grafu 1. Hodnoty PA indexu vyjadřujícího poměr počtu nálezů k počtu hodnocení při veterinární prohlídce na jatkách u sledovaných druhů a kategorií zvířat se pohybovaly v rozmezí od 0,102 (brojlerová kuřata) do 15,129 (krávy). Toto rozpětí dokládá výrazné rozdíly v úrovni zdraví mezi jednotlivými druhy a kategoriemi poražených jatečných zvířat.

Tabulka 1. PA index (podíl počtu nálezů k celkovému počtu zjišťování při patoanatomické prohlídce na jatkách násobený stem) u druhů a kategorií zvířat poražených na jatkách v období let 2010 až 2019

Druh	Kategorie	Počet poražených zvířat	Počet nálezů	Počet zjišťování	PA index
Skot	Krávy	1136754	2579609	17051310	15,129 ^a
	Jalovici	257912	205946	3868680	5,323 ^f
	Býci výkrm	1015541	486901	15233115	3,196 ^h
	Telata	104459	168983	1566885	10,785 ^c
Prasata	Prasnice	586245	679175	8793675	7,723 ^d
	Výkrm	25027303	19817045	375409545	5,279 ^g
	Selata	123191	225002	1847865	12,176 ^b
Ovce	Bahnice	22815	19358	342225	5,657 ^e
	Jehňata	114264	39999	1713960	2,334 ^{ij}
Kozy	Kozy	1348	483	20220	2,389 ^{ij}
	Kůzlata	5778	627	86670	0,723 ^{l,m}
Králíci	Králíci	1876929	40206	28153935	0,143 ^{p,q}
Kur domácí	Brojlerová kuřata	1089406687	16678958	16341100305	0,102 ^r
	Nosnice	20030744	6503610	300461160	2,165 ^k
Krůty	Krůty	1181598	132261	17723970	0,746 ^{l,m}
Husy	Husy	37690	799	565350	0,141 ^{p,q}
Kachny	Kachny	28579765	1052604	428696475	0,246 ^{n,o}
Pštroši	Pštroši	6252	229	93780	0,244 ^{n,o}

^{a-r} odlišná písmena u PA indexů vyjadřují statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými druhy a kategoriemi zvířat ($P < 0,05$)

Graf 1. Porovnání PA indexů mezi jednotlivými druhy a skupinami zvířat



PA index vyšší než 10,00 byl zjištěn u krav, selat a telat a dokumentuje statisticky významně ($P < 0,05$) nižší úroveň zdraví těchto druhů a kategorií ve srovnání s ostatními druhy a kategoriemi porážených zvířat. PA index v rozmezí 9,99 až 1,01 byl zjištěn u prasnic, ovcí, jalovic, prasat ve výkrmu, býků, koz, jehňat a nosnic. PA index menší než 1,00 byl zjištěn u krůt, kůzlat, kachen, pštrosů, králíků, hus a brojlerových kuřat. Nejnižší PA index byl zjištěn u brojlerových kuřat, jeho hodnota byla statisticky významně nižší než u všech ostatních sledovaných druhů a kategorií zvířat.

Z mezidruhového srovnání vyplývá, že nejvyšší PA index a tedy nejhorší úroveň zdraví porážených zvířat byl zjištěn u skotu (krávy 15,129; telata 10,785; jalovice 5,323; býci 3,196) a prasat (selata 12,176; prasnice 7,723; výkrm 5,279).

Z porovnání PA indexu u skupiny dospělých zvířat, skupiny zvířat vykrmovaných nebo mladých a skupiny mláďat vyřazovaných z chovu vyplývá, že vyšší PA index byl zjišťován u skupiny dospělých zvířat (PA index od 2,165 do 15,129) a skupiny mláďat vyřazovaných z chovu (PA index od 10,785 do 12,176), než u vykrmovaných zvířat (PA index od 0,102 do 5,323).

Diskuze

Výsledky práce dokumentují výrazné rozdíly v počtu nálezů zjišťovaných při veterinární prohlídce na jatkách, a tedy v úrovni zdraví různých druhů a kategorií zvířat v době porážky. Savci (skot, prasata, ovce a kozy) obecně měli vyšší PA index než ptáci (kur, krůty, kachny, husy, pštrosi), výjimkou byla jen kůzlata a králíci. Je to pravděpodobně dáno kratší délkou produkčního života porážených ptáků, ale určitý vliv může mít i způsob chovu či genetická výbava (odolnost, temperament) jednotlivých druhů zvířat. K obdobným závěrům dospěli Januskevicene et al. (2010), kteří zjistili nejvíce patoanatomických nálezů u prasat (14,92%) a skotu (9,08%), naopak nejméně u drůbeže (0,90%) a králíků (0,13%).

Naše výsledky ukazují, že nejvíce postiženou kategorií byly krávy (PA index 15,129). Dojnice i krávy bez tržní produkce mléka zůstávají v chovech ve srovnání s other livestock

výrazně déle. Vysoká intenzita produkce dojníc společně s delší dobou využití v chovech má vliv na úroveň zdraví a také na možný výskyt produkčních onemocnění, které jsou spojeny s charakteristickými nálezy na jatkách. U krav bez tržní produkce mléka je přítomnost zdravotních problémů podmíněna zejména dlouhou životností zvířat na farmách. Vliv věku na míru konfiskací na jatkách reported také Dupuy et al. (2013). Zhoršená úroveň zdraví z pohledu četnosti patologických nálezů byla zjištěna rovněž u telat (PA index 10,785). Naopak dobrá úroveň zdraví byla u skotu zaznamenána u býků (PA index 3.196) a jalovic (PA index 5,323). Býci a jalovice jsou chovány především extenzivním způsobem a poráženy zpravidla do 24 měsíců, což snižuje riziko výskytu onemocnění a tím i nálezů detekovaných při veterinární prohlídce. Obdobně, Nicholson et al. (2013) v USA nebo Dupuy et al. (2013) ve Francii zjistili nižší míru nálezů u býků ve srovnání s krávami. Rozdíly mezi kategoriemi mohou souviset také s odlišným zacházením s býky a kravami na jatkách (Večerek et al. 2021).

Vedle skotu byla nejhorší úroveň zdraví detekována u prasat. Vysokou míru konfiskací u prasat zmiňují i Ceccarelli et al. (2018) nebo Lis (2005). Výsledky naší studie ukázaly, že na rozdíl od skotu jsou u prasat nejčastěji detekovány nálezy u nejmladší kategorie, tj. u selat (PA index 12.176). Úroveň zdraví prasnic (PA index 7,723) byla ve srovnání s poráženými selaty lepší. V obou případech se jedná o zvířata vyřazovaná z chovu z důvodu narušeného zdraví či produkce. Nižší výskyt patologických nálezů u prasat ve výkrmu dokládá dobrou úroveň zdraví dosahovanou u této kategorie i v podmínkách konvenčního výkrmu, k čemuž přispívá i eliminace selat s neodpovídající kondicí a zdravím při zahájení výkrmu (Lopez-Verge et al., 2018). Obecně lepší úroveň zdraví ve srovnání se skotem a prasaty byla zaznamenána u ovcí a koz. Torina et al. (2004) upozorňují, že až 80% patologii u ovcí a koz je spojeno s přítomností parazitů. Vyšší výskyt nálezů u ovcí než u koz zjištěný v naší studii může být zapříčiněn odlišným způsobem chovu v ČR i jejich chováním na pastvě ovlivňujícím riziko parazitární infekce. Zatímco ovce jsou chovány celoročně nebo po většinu roku na pastvinách, kozy jsou na pastviny vyháněny zpravidla pouze během sezóny a jen na určitou část dne, případně jsou chovány celoročně ve stájích. Navíc na rozdíl od ovcí, které upřednostňují pastvu při zemi, pro kozy je přirozené selektivní spásání zejména listů keřů a stromů a vyhýbají se pokáleným místům (Yiakoulaki and Papanastasis, 2009; Fox et al., 2013).

Nejnižší PA index mezi savci vykazovali jateční králíci. Na jatky se dostává kategorie vykrmovaných králíků, což znamená, že se jedná o jedince v dobré kondici (Schwartzkopf-Genswein et al., 2012). Svou roli může hrát i vysoká mortalita králíků při přepravě na jatky (Voslářová et al., 2018). Je tedy možné, že králíci, kteří nejsou v optimální zdravotní kondici, zahynou už během přepravy a na porážku se tak vůbec nedostanou. Rampin et al. (2008) při prohlídce králíků na jatkách v Itálii zjistili patologické změny u 1% jatečných těl, šlo zejména o léze v trávicím a močovém ústrojí.

U drůbeže se hodnoty PA indexu pohybovaly pod 1, s výjimkou nosnic (PA index 2,165). Doba chovu, způsob chovu a využití nosnic se výrazně liší od ostatní porážené drůbeže. Zatímco brojlerová kuřata, husy, kachny a krůty jsou poráženy po několika týdnech až měsících výkrmu a jedná se tedy obvykle o mladé ptáky v dobré kondici, nosnice jsou odeslány na porážku po cca roční intenzivní produkci vajec. Navíc v ČR stále u nosnic převládá klecový chov, na rozdíl od ostatní drůbeže, která je chována volně na podestýlce. Salines et al. (2017) zjistili podstatně méně patoanatomických nálezů u drůbeže, která měla možnost pohybu ve volném výběhu. Efekt věku, způsobu a doby chovu je zvláště patrný v rozdílu mezi mírou PA nálezů u nosnic (2,165) a brojlerových kuřat (0,102), tedy stejného živočišného druhu (kur domácí). U brojlerových kuřat byl zjištěn nejnižší PA index ze všech sledovaných druhů a kategorií zvířat, současně se jedná také o kategorii poráženou v nejnižším věku. Jen o málo vyšší PA index byl zjištěn u hus (0.141). Pravděpodobným

vysvětlením je, že se jedná se o poměrně nenáročný a přizpůsobivý druh, který je navíc i za komerčním účelem často chován extenzivním způsobem (výběh s pastvou, přístup k vodě), který zohledňuje přirozené potřeby tohoto druhu (Tremolada et al., 2020). Naopak nejvíce PA nálezů mezi vykrmovanou drůbeží bylo zjištěno u krůt. Obdobně, Januskeviciene et al. (2010) zjistili více PA nálezů u krůt než u brojlerů a kachen. Bližší analýzou nálezů u krůt zjistili, že většina lézí se nacházela na končetinách (85,79%). Také Sanotra et al. (2001) a Krautwald-Jungehanns (2003) potvrzují, že patologické procesy na končetinách jsou u intenzivně chovaných krůt (zejména u samců) frekventovaným nálezem. Jejich vysoká hmotnost je příčinou toho, že běháky krocanů jsou v intenzivním kontaktu s podestýlkou a jsou tak náchylnější ke vzniku kožních lézí (Salines et al. (2017).

Komerční chov pštrosů a jejich přeprava na jatky jsou v České republice stále poměrně vzácné. Všechny systémy chovu pštrosů vycházejí z jejich přirozených podmínek a chovají se výhradně v kombinaci s venkovním výběhem (free range). Péči a manipulaci se pštrosy se věnuje zvýšená pozornost jednak s ohledem na potenciální nebezpečnost těchto zvířat, jednak z důvodu snahy nezneškodit jejich kůži, která je také cenným artiklem (Meyer et al., 2003; Engelbrecht et al., 2009). Přesto i u pštrosů byly zaznamenány PA nálezy na ne zcela zanedbatelné úrovni (PA index 0,244). Z toho pohledu a vzhledem k absenci relevantních studií je žádoucí směřovat další výzkum na podrobnější analýzu charakteru a příčin nálezů u pštrosů.

U všech sledovaných živočišných druhů (zahrnujících kategorii vykrmovaných zvířat) byl zaznamenán nižší PA index v kategorii vykrmovaných zvířat ve srovnání s kategorií mláďat (telata, selata) či post-produkčních zvířat (krávy, prasnice, nosnice). Zvláště u starších a vyřazených zvířat je pravděpodobnost narušeného welfare při přepravě a porážení a následně kvality jatečných těl vysoká, neboť jejich ekonomická hodnota je nízká a často se jim proto nedostává odpovídající péče (Grandin, 2001). Vykrmovaná zvířata jsou zasilána na jatky, protože dosáhla optimálních porážkových parametrů (věk, hmotnost) a nikoliv proto, že by byla vyřazena z chovu v důsledku snížené kondice, jak tomu bývá u mláďat či postprodukčních zvířat. Vykrmená zvířata, vzhledem ke své dobré kondici a robustní tělesné stavbě (Schwartzkopf-Genswein et al., 2012), také lépe odolávají nepříznivým faktorům (odchyt, nakládání do přepravních kontejnerů či vozidel, neznámé prostředí, míchání navzájem neznámých jedinců, způsob zacházení, nepříznivé klimatické podmínky, délka přepravy atd.), které mohou ohrozit jejich zdravotní stav v průběhu přepravy a manipulace na jatkách (Grandin, 2001; Eicher et al., 2006; Fike and Spire, 2006).

Údaje o výskytu patoanatomických nálezů, zjišťovaných u poražených zvířat v rámci postmortální veterinární prohlídky, jsou velmi cenné jak z pohledu vědeckého výzkumu, tak především z pohledu prevence negativních dopadů na zdravotní stav hospodářských zvířat. Ucelený přehled o zdravotní kondici poražených zvířat umožňuje chovatelům, veterinárním lékařům, přepravním i provozovatelům jatek přijmout odpovídající a přesně zacílená preventivní opatření a tím v budoucnu zvýšit welfare a zdraví zvířat a současně snížit výskyt poškození jatečných těl.

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

Literatura

Amini K, Zachar T, Popowich S, Knezacek T, Goodhope B, Willson P, Gomis S 2015: Association of increased rate of condemnation of broiler carcasses due to hepatic abnormalities with immunosuppressive diseases in the broiler chicken industry in Saskatchewan. Can J Vet Res 79: 261-267

Buzdugan SN, Chang YM, Huntington B, Rushton J, Guitian J, Alarcon P, Blake DP 2020: Identification of production chain risk factors for slaughterhouse condemnation of broiler chickens. *Prev Vet Med* 181: 105036

Ceccarelli M, Leprini E, Sechi P, Iulietto MF, Grispoli L, Goretti E, Cenci-Goga, BT 2018: Analysis of the causes of the seizure and destruction of carcasses and organs in a slaughterhouse in central Italy in the 2010-2016 period. *Ital J Food Saf* 7: 6899

Drozd L, Paszkiewicz W, Pyz-Lukasik R 2019: Post-slaughter changes in rabbit carcasses in Poland between 2010 and 2018. *Med Weter* 75: 613-616

Dupuy C, Morignat E, Maugey X, Vinard JL, Hendrikx P, Ducrot C, Calavas D, Gay E 2013: Defining syndromes using cattle meat inspection data for syndromic surveillance purposes: a statistical approach with the 2005-2010 data from ten French slaughterhouses. *BMC Vet Res* 9: 1-17

Dzoma BM, Pansiri E, Segwagwe BVE 2009: A retrospective study on the prevalence of ostrich carcass and organ condemnations in Botswana. *Trop Anim Health Pro* 41: 443-448

Eicher SD, Cheng HW, Sorrels AD, Schutz MM 2006: Behavioral and physiological indicators of sensitivity or chronic pain following tail docking. *J Dairy Sci* 89: 3047-3051

Engelbrecht A, Hoffman LC, Cloete SWP, van Schalkwyk SJ 2009: Ostrich leather quality: a review. *Anim Prod Sci* 49: 549-557

Ferreira TZ, Sesterhenn R, Kindlein L 2012: Economic losses of main causes of condemnation of the broiler carcass in a slaughterhouse under Federal Inspection on Rio Grande do Sul, Brazil. *Acta Sci Vet* 40: 1021

Fike K, Spire MF 2006: Transportation of cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 22: 305-320

Fox NJ, Marion G, Davidson RS, White PCL, Hutchings MR 2013: Modelling parasite transmission in a grazing system: The importance of host behaviour and immunity. *PLoS ONE* 8: 1-11

Grandin T 2001: Perspectives on transportation issues: The importance of having physically fit cattle and pigs. *J Anim Sci* 79: E201-E207

Hansson I, Hamilton C, Ekman T, Forslund K 2000: Carcass quality in certified organic production compared with conventional livestock production. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47: 111-120

Huneau-Salaun A, Stark KDC, Mateus A, Lupo C, Lindberg A, Le Bouquin-Leneveu S 2015: Contribution of meat inspection to the surveillance of poultry health and welfare in the European Union. *Epidemiol Infect* 143: 2459-2472

Jakob HP, Morgenstern R, Albicker P, Hoop RK 1998: Condemnation reasons of slaughtered broilers from two major Swiss producing companies. *Schweiz Arch Tierh* 140: 60-64

Januskeviciene G, Paulauskas V, Dailidaviciene J, Juozaitiene V 2010: Analysis of pathologic lesions in the livestock and poultry slaughtered in the meat establishments of Lithuania. *Vet Zootec* 52: 33-42

Kaluža M, Večerek V, Voslářová E, Semerád Z, Passantino A 2020: Assessing the standard of health and welfare in individual categories of cattle from the viewpoint of intravital pathological changes. *Agriculture-Basel* 10: 619

Kaluža M, Večerek V, Voslářová E, Semerád Z, Passantino A 2021: Incidence of characteristic findings during veterinary carcass inspections 2010–2019 in the Czech Republic and the relation to the level of health and welfare of individual classes of cattle. *Animals* 11: 537

Keutgen H, Wurm S, Ueberschar S 1999: Pathologic changes in end-of-lay hens with regards to different housing systems. *Deut Tierarztl Woch* 106: 127-133

Kongsted H, Sorensen JT 2017: Lesions found at routine meat inspection on finishing pigs are associated with production system. *Vet J* 223: 21-26

Krautwald-Jungehanns ME 2003: Putenproduktion in Deutschland: Ansätze für eine tierschutzgerechte Haltung. *Deutsche Tierärzteblatt* 1: 4-8

Lis H 2005: Results of veterinary inspection of slaughter animals and meat in Poland in 2003. *Med Weter* 61: 1160-1161

Lopez-Verge S, Gasa J, Farre M, Coma J, Bonet J, Sola-Oriol D 2018: Potential risk factors related to pig body weight variability from birth to slaughter in commercial conditions. *Transl Anim Sci* 2: 383-395

Lupo C, Le Bouquin S, Allain V, Balaine L, Michel V, Petetin I, Colin P, Chauvin C 2010: Risk and indicators of condemnation of male turkey broilers in western France, February-July 2006. *Prev Vet Med* 94: 240-250

Meyer A, Cloete SWP, Brown CR, van Schalkwyk SJ 2003: The persistence to slaughter age of scars resulting from damage inflicted to ostrich skins during the grow-out phase. *S Afr J Anim Sci* 33: 32-37

Nicholson JDW, Nicholson KL, Frenzel LL, Maddock RJ, Delmore RJ, Lawrence TE, Henning WR, Pringle TD, Johnson DD, Paschal JC, Gill RJ, Cleere JJ, Carpenter BB, Machen RV, Banta JP, Hale DS, Griffin DB, Savell JW 2013: Survey of transportation procedures, management practices, and health assessment related to quality, quantity, and value for market beef and dairy cows and bulls. *J Anim Sci* 91: 5026-5036

Rampin F, Piccirillo A, Schiavon E, Poppi L, Grilli G 2008: Detection of pathological lesions in slaughtered rabbits. *Ital J Anim Sci* 7: 105-111

Salines M, Allain V, Roul H, Magras, C, Le Bouquin S 2017: Rates of and reasons for condemnation of poultry carcasses: harmonised methodology at the slaughterhouse. *Vet Rec* 180: 516-516

Sanotra GS, Lawson LG, Vestergaard KS 2001: Influence of stocking density on tonic immobility, lameness, and tibial dyschondroplasia in broilers. *J Appl Anim Welf Sci* 4: 71-87

Schwartzkopf-Genswein KS, Faucitano L, Dadgar S, Shand P, Gonzalez LA, Crowe TG 2012: Road transport of cattle, swine and poultry in North America and its impact on animal welfare, carcass and meat quality: A review. *Meat Sci* 92: 227-243

Stark KDC 2017: Abattoir condemnation data remain underused in decision making. *Vet Rec* 180: 514-515

Stark KDC, Alonso S, Dadios N, Dupuy C, Ellerbroek L, Georgiev M, Hardstaff J, Huneau-Salaun A, Laugier C, Mateus A, Nigsch A, Afonso A, Lindberg A 2014: Strengths and weaknesses of meat inspection as a contribution to animal health and welfare surveillance. *Food Control* 39: 154-162

Tabaran A, Dan SD, Reget O, Tabaran AF, Mihaiu M 2018: Slaughterhouse survey on the frequency of pathologies found in bovine post-mortem inspections. *Bull UASVM Vet Med* 75: 251-255

Tremolada C, Bielińska H, Minero M, Ferrante V, Canali E, Barbieri S 2020: Animal-based measures for the on-farm welfare assessment of geese. *Animals* 10: 890

Torina A, Dara S, Marino AMF, Sparagano OAE, Vitale F, Reale S, Caracappa, S 2004: Study of gastrointestinal nematodes in Sicilian sheep and goats. *Ann N Y Acad Sci* 1026: 187-194

Válková L, Večerek V, Voslářová E, Zavřelová V, Conte F, Semerád Z 2021: The health and welfare of rabbits as indicated by post-mortem findings at the slaughterhouse. *Animals* 11: 659

Večerek V, Večerková L, Voslářová E 2019: Comparison of the frequency of patho-anatomic findings in laying hens with findings in broiler chickens and turkeys detected during post-mortem veterinary inspection. *Poultry Sci* 98: 5385-5391

Večerek V, Voslářová E, Semerád Z 2020a: Patho-anatomic findings in finisher pigs, sows and piglets detected during veterinary slaughterhouse inspection. *Acta Vet Brno* 89: 341-347

Večerek V, Voslářová E, Semerád Z, Passantino A 2020b: The health and welfare of pigs from the perspective of post mortem findings in slaughterhouses. *Animals* 10: 825

Večerek V, Voslářová E, Kameník, J, Machovcová Z, Válková L, Volfová M, Konvalinová J 2021: The effect of slaughtering skills on the welfare of cattle during stunning with a captive bolt. *Acta Vet Brno* 90: 109-116

Večerková L, Voslářová E, Večerek V 2019: Comparison of the welfare of laying hens, broiler chickens and turkeys in terms of bird health as surveyed during inspection in slaughterhouses. *Acta Vet Brno* 88: 243-248

Voslářová E, Večerek V, Bedáňová I, Večerková L 2018: Mortality in rabbits transported for slaughter. *Anim Sci J* 89: 931-936

Yiakoulaki M, Papanastasis V 2009: Foraging behaviour of sheep and goats grazing on silvopastoral systems in Northern Greece. *Options Méditerran* 85: 79-84

Zdraví zvířat z pohledu nálezů poškození jater zjišťovaných při prohlídce post mortem na jatkách

Lenka Válková, Eva Voslářová, Vladimír Večerek, Veronika Zavřelová

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

Abstrakt

Sledovali jsme poškození jater u skotu, prasat, ovcí, koz, králíků a drůbeže v letech 2010 až 2019 u všech zvířat chovaných porážených na jatkách v České republice. Zjišťovali jsme pro jednotlivé kategorie zvířat celkové počty nálezů na játrech a dále v jejich členění na akutní, chronické, parazitární, ostatní. Zjistili jsme, že výskyt poškození jater celkem je u všech druhů vyšší u zvířat dospělých ve srovnání se zvířaty vykrmovanými a mladými, je u skotu a prasat vyšší u mláďat vyřazovaných z chovu ve srovnání se zvířaty vykrmovanými a mladými, je při porovnání druhů u dospělých zvířat nejvyšší v pořadí dojnice 46,13 %, prasnice 17,43 %, ovce 13,07 %, kozy 4,04 %, je při porovnání druhů u vykrmovaných a mladých zvířat nejvyšší v pořadí jalovice 14,79 % a býci 8,12 %, prasata ve výkrmu 11,26 %, jehňata 5,04 %, kůzlata 0,75 %, je při porovnání druhů u mláďat vyřazovaných z chovu nejvyšší v pořadí selata 29,40 %, telata 17,12 %, a dále je pro drůbež a králíky nejvyšší v pořadí krůty 3,35 %, kachny 1,89 %, husy 1,15 %, brojleři 0,08 % a králíci 0,05 %. Nálezy chronické a akutní vykazují obdobnou strukturu jako nálezy celkové, nálezy parazitární tuto strukturu (pořadí) nálezů nemají, protože se vyskytují vyšší počty parazitárních nálezů zejména u ovcí, jehňat a prasat ve výkrmu. Výsledky dokládají zjištění, že vykrmovaná a mladá zvířata mají lepší jaterní kondici než zvířata dospělá, že vyřazovaná mláďata z chovu mají horší jaterní kondici než věkem starší vykrmovaná zvířata, že nejvyšší rozdíl mezi skutečnou výživou a potřebou metabolismu způsobující porušení jater je u skotu, po té u prasat, po té u ovcí a po té u koz, a to jak u dospělých tak také u vykrmovaných a mladých zvířat. U parazitárního zatížení jater výsledky dokládají skutečnost, že způsob výživy ve vztahu k možnostem parazitární invaze se odráží na výskytu parazitárních nálezů na játrech a to nejvíce u zvířat pasených na loukách s parazitární invazí, tj. ovcí (8,09 %) a jehňat (3,84 %), po té u jalovic (1,5 %) a dále u zvířat, kde z hlediska ochrany masa před rezidui antiparazitik je antiparazitární ochrana omezena, tj. u prasat ve výkrmu (3,76 %). Zvířata chovaná ve stáji, tj. dojnice, býci, prasnice, ovce, kůzlata jsou zatížena parazitární invazí výrazně méně. U králíků a drůbeže je parazitární poškození jater zjišťováno ojediněle. Zjištěné výsledky vytváří znalostní podklad pro opatření k zlepšení zdraví a kondice jater u potravinových zvířat.

Úvod

Játra představují hlavní orgán metabolismu u zvířat. Jejich dobrá kondice významně přispívá k celkovému zdraví zvířat, jejich narušení naopak zhoršuje zdraví zvířat a tím také pohodu zvířat. Vzhledem k tomu, že jsou játra ústředím mnoha trávicích, metabolických i produkčních procesů, je důležité dobře porozumět všem faktorům, které mají vliv na jejich funkci. Je třeba důkladně zkoumat vliv jednotlivých aspektů výživy (nutriční složení krmné dávky, restriktce krmiva, anti-nutriční faktory, strukturní složení krmiva, doplňky výživy atd.) na velikost, vývoj a funkci jater. Pozornost je nutné zaměřit i na technologii zpracování krmiv (jako je tepelné ošetření, peletování, velikost částic či úprava celozrnných produktů), pokud jde o dopad na stav jaterní tkáně (Zaefarian et al. 2019). K narušení jater dochází zpravidla při narušeném metabolismu, a to nejčastěji z důvodu nedostatků ve výživě zvířat. Nebo jsou játra narušena v důsledku parazitární invaze jako cílového orgánu, a nebo jako orgánu migrace

parazitů v rámci standardní anebo náhodné migrační cesty v organismu zvířat. Játra mohou být poškozena rovněž v důsledku infekčního procesu či intoxikace organismu (např. těžkými kovy či toxiny plísní). Negativní vliv na funkci jater může mít i nevhodný způsob chovu (Keutgen, 1999). O zatížení jater hospodářských zvířat svědčí i výsledky rozsáhlé polské studie (Januskeviciene et al., 2010), z kterých vyplývá, že patologické nálezy jsou při postmortální veterinární prohlídce na polských jatkách nejčastěji detekovány v dýchacím ústrojí hospodářských zvířat (konkrétně u 35,61 % ze všech porážených zvířat), v těsném sledu pak následují léze na játrech (zaznamenány u 34,19 % ze všech porážených zvířat).

Patoanatomické nálezy na játrech porážených zvířat jsou zmiňovány v řadě studií, které se zabývají příčinami konfiskace jatečných těl hospodářských zvířat v rámci postmortální veterinární prohlídky. Většina těchto studií se však zaměřila jen na konkrétní druh hospodářského zvířete, např. na skot (Tabaran et al., 2018; Kaluža et al., 2020, 2021), prasata (Lis, 1999, 2002; Večerek et al., 2004, 2020a,b), králíky (Válková et al., 2021; Conficoni et al., 2020; Drozd et al., 2019; Rampin et al., 2008), brojlerová kuřata (Jakob et al., 1998; Amini et al., 2015; Buzdugan et al., 2020), nosnice (Keutgen et al., 1999) či krůty (Lupo et al., 2010).

Játra narušená patologickým procesem znamenají nejen ekonomickou ztrátu v důsledku konfiskace, ale mohou za určitých okolností (např. nedostatečná tepelná úprava) představovat i závažné nebezpečí z pohledu zdraví lidí. Zoonotický potenciál nelze podceňovat u diagnóz jako je např. hepatitis B, kampylobakteriíza, hydatóza, intoxikace těžkými kovy atd. (Zhao et al., 2016; Lemos et al., 2015; Ceccarelli et al., 2018; Tulayakul et al., 2018)

Cílem práce bylo porovnat počty narušení jater u různých druhů a kategorií zvířat porážených na jatkách a zjistit tak celkovou úroveň zdraví a poškození jater pro jednotlivé druhy a kategorie jatečných zvířat a zjistit, které druhy a kategorie jatečných zvířat jsou na tom celkově z pohledu zdraví jater nejhůře a dále zjistit, které naopak nejlépe. Tyto výsledky jsou významné z hlediska potřebných cílených opatření k zlepšování výživy zvířat a nebo z hlediska uplatňování protiparazitárních opatření, směřujících k zlepšování zdraví a tím také welfare jatečných zvířat.

Cílem práce bylo dále rozlišit charakter poškození jater akutní, chronický a parazitární, a to z důvodu bližší specifikace příčiny poškození jater. U akutních poškození je příčinou zpravidla poškození způsobené náhlými změnami ve výživě zvířat, u chronických poškození se zpravidla jedná o poškození způsobené dlouhodobými nedostatky ve výživě zvířat. U parazitárních poškození jde o poškození jater parazity. Porovnání počtů pro akutní a chronické poškození a pro parazitární poškození je významné z pohledu podílu příčin na poškození jater a tím také pro stanovení dalších opatření k snížení úrovně poškození jater u zvířat, a to opatřeními směřujícími proti náhlým změnám ve výživě zvířat, nebo proti dlouhodobým nedostatkům ve výživě zvířat a nebo proti parazitární invazi zvířat.

Materiál a metodika

Poškození jater bylo sledováno u zvířat porážených na jatkách v rámci veterinární dozoru nad zdravotní nezávadností orgánů porážených zvířat při veterinární prohlídce po porážení. Byla sledována všechna zvířata chovaná v chovech a porážená na jatkách v České republice v období let 2010 až 2019.

Veterinární prohlídku u porážených zvířat prováděli úřední veterinární lékaři státní veterinární správy, kteří odlišovali játra bez poškození a játra s poškozením, přičemž zaznamenávali charakter poškození jater v rozlišení poškození akutní, poškození chronické, poškození parazitárního původu a poškození ostatní (zpravidla ikterické změny).

Poškození jater bylo sledováno u skotu pro kategorie dojnice, jalovice, býci ve výkrmu a telata vyřazovaná z chovu, dále u prasat pro kategorie prasnice, prasata ve výkrmu, a selata vyřazovaná z chovu, dále u ovcí pro kategorie bahnice a jehňata, dále u koz pro kategorie

kozy a kůzlata, dále u králíků, a dále u drůbeže pro druhy a kategorie nosnice, brojeři, krůty, kachny domácí, husy domácí.

Pro každou kategorii porážených zvířat byl zjišťován za celé sledované období 10 let počet porážených zvířat a počet nálezů na játrech v členění na akutní, chronické, parazitární, ostatní a dále počty nálezů celkem; počty nálezů byly přepočítány na relativní počty vyjadřované v procentech.

K statistickému porovnání zjištěných počtů nálezů byl využit Chí kvadrát test.

Byl porovnáván výskyt celkových nálezů mezi jednotlivými kategoriemi porážených zvířat s cílem zjistit, u kterých kategorií se vyskytují nálezy na játrech nejčastěji a u kterých naopak nejméně často. Zde byly porovnávány celkové nálezy pro jednotlivé druhy mezi kategorií dospělých zvířat s kategorií vykrmovaných a mladých zvířat, s cílem zjistit pro jednotlivé druhy, zda-li se celkové nálezy na játrech vyskytují častěji u dospělých zvířat a nebo u zvířat vykrmovaných a mladých. Dále zde byly porovnávány celkové nálezy pro jednotlivé druhy mezi kategorií mláďat vyřazovaných z chovu s vykrmovanými a mladými zvířaty, s cílem zjistit pro jednotlivé druhy, zda-li se celkové nálezy na játrech vyskytují častěji u mláďat vyřazovaných z chovu a nebo u zvířat vykrmovaných a mladých.

Byly porovnávány nálezy mezi jednotlivými druhy zvířat celkově, s cílem zjistit, u kterých druhů zvířat se vyskytují celkové nálezy na játrech nejčastěji a u kterých nejméně často. Zde byly porovnávány mezi sebou jednotlivé kategorie zvířat dospělých, s cílem zjistit, u kterých kategorií dospělých zvířat se vyskytují celkové nálezy na játrech nejčastěji a u kterých nejméně často. Dále zde byly porovnávány mezi sebou jednotlivé kategorie zvířat vykrmovaných a mladých, s cílem zjistit, u kterých kategorií vykrmovaných a mladých zvířat se vyskytují celkové nálezy na játrech nejčastěji a u kterých nejméně často.

Obdobně jako pro celkové nálezy byly porovnávány nálezy chronické, stejně tak akutní a stejně tak parazitární.

Ze získaných výsledků byla dovozována zjištění porovnávající dospělá a vykrmovaná zvířata, dále porovnávající mláďata vyřazovaná z chovu a vykrmovaná zvířata, dále porovnávající celkově jednotlivé druhy zvířat mezi sebou, dále porovnávající jednotlivé druhy v kategorii dospělých zvířat a dále porovnávající jednotlivé druhy mezi sebou v kategorii vykrmovaných a mladých zvířat. Tyto závěry byly zjišťovány pro celkové nálezy a dále pro nálezy akutní, nálezy chronické a nálezy parazitární s cílem zjištění pravděpodobného původu poškození jater a tak vytvořit znalostní podklad pro cílení opatření k zlepšení zdraví a kondice jater z potravinových zvířat porážených na jatkách.

Výsledky

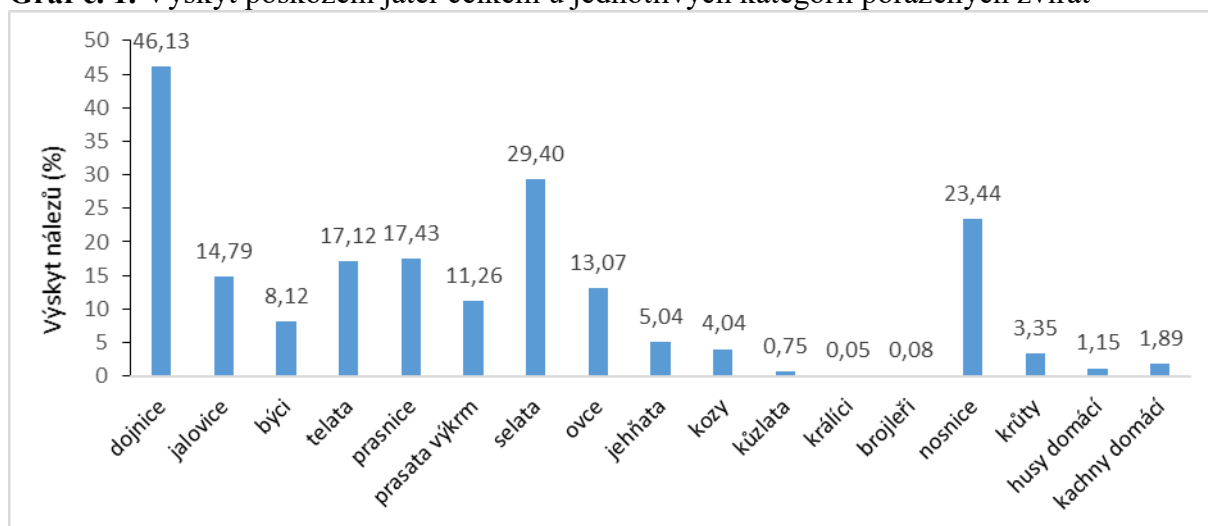
Sledovali jsme výskyt poškození jater u různých druhů a kategorií zvířat porážených na jatkách. Výskyt poškození jater u jednotlivých kategorií porážených zvířat je uveden v grafu č. 1. Statistickým porovnáním byly mezi jednotlivými kategoriemi zjištěny statisticky vysoce významné rozdíly ($p < 0,01$), s výjimkou porovnání koz a jehňat ($p = 0,10$) a koz a krůt ($p = 0,16$).

Z grafu č. 1 je zřejmé, že výskyt poškození jater celkem je u všech druhů vyšší u zvířat dospělých ve srovnání se zvířaty vykrmovanými a mladými, je u skotu a prasat vyšší u mláďat vyřazovaných z chovu ve srovnání se zvířaty vykrmovanými a mladými, je při porovnání druhů u dospělých zvířat nejvyšší v pořadí dojnice, prasnice, ovce, kozy, je při porovnání druhů u vykrmovaných a mladých zvířat nejvyšší v pořadí jalovice a býci, prasata ve výkrmu, jehňata a kůzlata, a dále je pro drůbež a králíky nejvyšší v pořadí krůty, kachny, husy, brojeři a králíci.

Počty porážených zvířat a výskyt poškození jater v členění na akutní, chronické, parazitární a ostatní jsou uvedeny v tabulce č. 1. Z tabulky je zřejmé, že výskyt poškození jater chronických se vyskytuje ve stejné struktuře jako nálezy celkové, že výskyt poškození

jater akutních se vyskytuje ve stejné struktuře jako nálezy celkové. Dále že výskyt poškození jater parazitárního původu se neshoduje se strukturou nálezů akutních a nebo chronických, a to vyšší je u zvířat dospělých ve srovnání se zvířaty vykrmovanými a mladými u ovcí a koz, naopak je tomu u skotu a prasat, dále je u skotu a prasat vyšší u zvířat vykrmovaných a mladých ve srovnání s mláďaty vyřazovanými z chovu, dále je při porovnání druhů u dospělých zvířat nejvyšší v pořadí ovce, dojnice, kozy a prasnice, a dále je při porovnání druhů u vykrmovaných a mladých zvířat nejvyšší v pořadí jehňata, prasata ve výkrmu, jalovice a býci, a kůzlata, a dále že u drůbeže a králíků jsou parazitární nálezy ojedinělé.

Graf č. 1. Výskyt poškození jater celkem u jednotlivých kategorií porážených zvířat



Tabulka č. 1. Počty porážených zvířat a výskyt poškození jater v členění na akutní, chronické, parazitární a ostatní u jednotlivých kategorií porážených zvířat

	dojnice	jalovice	býci	telata	prasnice	prasata výkrm	selata	ovce	jehňata	kozy	kůzlata
poraženo (počet)	1136754	257912	1015541	104459	586245	25027303	123191	22815	114264	1348	5778
akutní nálezy (%)	5,21	1,35	0,43	5,15	0,87	0,22	13,22	0,10	0,04	0,00	0,00
chronické nálezy (%)	38,66	11,82	7,12	11,73	15,95	7,27	14,90	4,86	1,16	3,30	0,53
parazitární nálezy (%)	0,74	1,50	0,56	0,13	0,61	3,76	1,28	8,09	3,84	0,63	0,22
ostatní nálezy (%)	1,52	0,12	0,01	0,11	0,01	0,00	0,00	0,02	0,00	0,11	0,00

	králíci	brojleři	nosnice	krůty	husy domácí	kachny domácí
poraženo (počet)	1876928	1089036337	19441279	1181598	37690	28386382
akutní nálezy (%)	0,00	0,03	2,94	0,00	0,00	0,68
chronické nálezy (%)	0,05	0,05	20,49	2,73	1,11	1,21
parazitární nálezy (%)	0,00	0,00	0,00	0,01	0,04	0,00
ostatní nálezy (%)	0,00	0,00	0,01	0,61	0,00	0,00

Diskuze

Výskyt všech nálezů na játrech je statisticky významně vyšší ve svém počtu u zvířat dospělých ve srovnání se zvířaty vykrmovanými a mladými, a to u skotu (dojnice 46,13 % x býci 8,12 % i jalovice 14,79 %), prasat (prasnice 17,43 % x prasata ve výkrmu 11,26%), ovčí (ovce 13,07 % x jehňata 5,04 %), koz (kozy 4,04 % x kůzlata 0,75 %), slepic (nosnice 23,44 % x brojleři 0,08 %).

Toto zjištění dokládá skutečnost, že vykrmovaná a mladá zvířata jsou organismy s lepší jaterní kondicí než zvířata dospělá, u mladých zvířat je zatížení jater s ohledem na jejich věk kratší a je zde také lepší regenerační schopnost, což se projevuje nižším počtem nálezů na játrech, z pohledu jater jsou tak v lepší kondici zvířata mladá než zvířata dospělá, jejichž játra jsou zatížena dlouhodobě intenzivním metabolismem v důsledku dlouhodobé intenzivní produkce.

Výrazně déle zůstávají v chovech ve srovnání s ostatními kategoriemi hospodářských zvířat především dojnice, ale i krávy bez tržní produkce mléka. Průměrná délka produkčního života dojníc na farmách se pohybuje mezi 4,5–6 lety. V případě krav bez tržní produkce mléka bývá tato doba v průměru až dvakrát delší (Vries and Marcondes, 2020). Zvláště u dojnic má dlouhá doba chovu ve spojení s intenzivní produkcí mléka vliv na zdravotní kondici a také na možný výskyt produkčních onemocnění, které jsou spojeny s charakteristickými nálezy na orgánech včetně jater. Vliv věku na míru konfiskací na jatkách zmiňují i Dupuy et al. (2013) s tím, že nejvyšší míra konfiskací byla zaznamenána u zvířat poražených ve stáří 5-10 let (37,37 %).

Pokud jde o hospodářsky využívané druhy ptáků, je relativně dlouhá doba života (ve srovnání např. s brojlerovými kuřaty či vykrmovanými krůtami) spojená s intenzivní produkcí vajec typická zejména pro nosnice kura domácího. Doba chovu, způsob chovu (v ČR dosud převažuje klecový chov) a využití nosnic se výrazně liší od ostatní poražené drůbeže. Zatímco brojlerová kuřata, husy, kachny a krůty jsou poráženy po několika týdnech až měsících výkrmu (jde tedy obvykle o mladé ptáky v dobré kondici), nosnice jsou odesílány na porážku po přibližně roční intenzivní produkci vajec. Navíc bylo prokázáno, že klecový způsob chovu (ve srovnání s chovem na podestýlce či ve volném výběhu) je u nosnic jedním z environmentálních faktorů, které přispívají k rozvoji syndromu ztučnělých jater (Keutgen et al., 1999). Naše studie potvrdila tyto předpoklady, když v kategorii nosnic (kur domácí) byly zaznamenány léze na játrech u 23,44 % ze všech poražených jedinců, což představuje zdaleka nejvyšší podíl mezi drůbeží a třetí nejvyšší (po dojnících a selatech) hodnotu vůbec.

Pravděpodobnou příčinou neuspokojivého stavu jater je v případě nosnic výživa, která neodpovídá intenzitě jejich produkce. Pokud nosnice nepřijímají dostatek živin vzhledem k úrovni produkce vajec, může u nich docházet k proteolýze jater a svaloviny, lipolýze tukové tkáně a resorpci kostí (Gregory and Robins, 1998).

Efekt věku, způsobu a doby chovu je zvláště patrný v rozdílu mezi množstvím jaterních lézí u nosnic (chronické 20,49 %, akutní 2,94 %) a brojlerových kuřat (chronické 0,04 %, akutní 0,03 %), tedy kategorií v rámci stejného živočišného druhu (kur domácí).

Výskyt všech nálezů na játrech je statisticky významně vyšší ve svém počtu u mláďat vyřazovaných z chovu ve srovnání se zvířaty vykrmovanými, a to u skotu (telata 17,12 % x býci 8,12 % i jalovice 14,79 %) a prasat (selata 29,40 % x prasata ve výkrmu 11,26 %).

Toto zjištění dokládá skutečnost, že mláďata vyřazovaná z chovu pro špatnou kondici a nebo zdraví mají také nižší úroveň zdraví jater než zvířata ponechaná v chovu, tj. zvířata ve výkrmu a nebo zvířata mladá (a to i když jsou starší než vyřazovaná mláďata).

Výskyt všech nálezů na játrech je statisticky významně vyšší ve svém počtu při srovnání jednotlivých druhů, a to v pořadí skot, prasata, ovce a kozy, tzn. pro dospělá zvířata dojnice 46,13 %, prasnice 17,43 %, ovce 13,07 %, kozy 4,04 %. Toto zjištění dokládá skutečnost, že z pohledu jater je nejvyšší zatížení u dojnic, pravděpodobně nejvyšším

rozdílem mezi skutečnou výživou a potřebou metabolismu, což vede k enormnímu zatížení jater, jehož důsledkem jsou chronické či akutní změny jaterní tkáně. Vliv užítkovosti na míru konfiskace na jatkách zmiňují také Vial et al. (2015), kdy u mléčného skotu ve Švýcarsku byla tato podstatně vyšší (79 %) ve srovnání s masným skotem (21 %). Januskeviciene et al. (2010) a Ceccarelli et al. (2018), kteří v rámci svého výzkumu nerozlišovali jednotlivé kategorie skotu, udávají výskyt patoanatomických nálezů (zjištěných při postmortální veterinární prohlídce) na játrech skotu 25,09 %, respektive 7,87 %. Jako nejčastější nález na játrech skotu uvádí Ceccarelli et al. (2018) distomatózu, dále jaterní abscesy a hydatózu (*Echinococcus granulosus*).

U prasnic je s ohledem na charakter výživy založené na směsích s lepší kontrolou živin ve výživě tento dopad na játra podstatně nižší. Přesto jsou prasata druhem hospodářského zvířete, u kterého byl v rámci naší studie zaznamenán relativně vysoký počet nálezů na játrech (selata 29,4 %, prasnice 17,43 %, vykrmovaná prasata 11,26 %). Vysokou míru konfiskací u prasat v důsledku jaterních lézí (9,85 %, 31,79 %, 17,20 %) zmiňují i Ceccarelli et al. (2018), Januskeviciene et al. (2010) a Večerek et al. (2004). Januskeviciene et al. (2010) i Ceccarelli et al. (2018) shodně s naší studií zjistili nejvíce patologických lézí v játrech skotu a prasat, avšak na rozdíl od naší studie zaznamenaly relativně více nálezů u prasat než u skotu.

U ovcí, jejichž výživa se realizuje ve vegetačním období prostřednictvím pastvy, kdy organismus výběrem krmiva sám reguluje přísun živin s ohledem na metabolismu, je tento dopad na játra nižší. U koz je výživa realizována ve stájích a omezeně také pastvou a s ohledem na jejich obecnou citlivost na úroveň výživy a její změny je kozám ve výživě věnována zvláštní pozornost, což se projevuje nízkým počtem nálezů na játrech. Obecně lepší úroveň zdraví ovcí a koz ve srovnání se skotem a prasaty potvrzují ve své studii Januskeviciene et al. (2010) a také Ceccarelli et al. (2018), kteří detekovali patologické léze na játrech u 2,87 % ze všech poražených ovcí a koz, což kvantitativně odpovídá i našim zjištěním. Podle zjištění Ceccarelli et al. (2018) byla u ovcí právě játra orgánem, který byl patologií postižen nejčastěji (játra představovala 77,15 % ze všech konfiskovaných orgánů u ovcí). Chov ovcí je v České republice soustředěn do extenzivních podmínek. Ovce jsou chovány celoročně nebo po většinu roku na pastvinách, což může být spojeno s rizikem výskytu parazitů (Torina et al., 2004). Na rozdíl od ovcí, kozy nejsou charakteristickými pastevními zvířaty a přirozené je pro ně selektivní spásání zejména listů keřů a stromů. Na rozdíl od ovcí se rovněž vyhýbají pokáleným místům (Fox et al., 2013; Yiakoulaki and Papanastasis, 2009). Riziko infekce parazitárními stádii tak může být u koz nižší, což může být i příčinou lepší úrovně zdraví koz ve srovnání s ovci (Ninčáková et al., 2022).

Dále je výskyt nálezů na játrech statisticky významně vyšší ve svém počtu při srovnání jednotlivých druhů u vykrmovaných zvířat, a to v pořadí skot, prasata, ovce a kozy, tzn. jalovice 14,79 % a býci 8,12 %, prasata ve výkrmu 11,26 %, jehňata 5,04 %, kůzlata 0,75 %. Stejně pořadí druhů u vykrmovaných a mladých zvířat jako u dospělých zvířat je dokladem obdobné disproporce mezi skutečnou výživou a metabolickými potřebami také u vykrmovaných a mladých zvířat jaká je u zvířat dospělých.

Dále je statisticky významně vyšší ve svém počtu při srovnání jednotlivých druhů u vykrmované drůbeže a králíků, a to v pořadí krůty 3,35 %, kachny 1,89 %, husy 1,15 %, brojleři 0,08 % a králíci 0,05 %. Úroveň nálezů na játrech u drůbeže a králíků je poměrně nízká, pořadí podle nejvyšších počtů nálezů na játrech dokládá známou skutečnost z praxe o vyšší citlivosti u krůt na správný obsah živin ve výživě, nejnižší úroveň nálezů u brojlerů a králíků dokládá skutečnost odpovídajícího složení krmných směsí s ohledem na metabolické potřeby brojlerů anebo králíků v jednotlivých fázích jejich výkrmu.

Na jatky se dostává kategorie vykrmovaných králíků, což znamená, že se jedná o jedince v dobré kondici (Schwartzkopf-Genswein et al., 2012). Ani na polských jatkách nepatří nálezy na játrech mezi frekventované důvody konfiskace jatečných těl či orgánů

králíků, například jaterní kokcidióza byla v rámci postmortální veterinární prohlídky (prováděné v letech 2010 až 2018) detekována u 0,015 % ze všech poražených králíků (Drozd et al., 2019). Přitom ještě v letech 2007 až 2011 byla jaterní kokcidióza prokázána u 3,34 % králíků poražených v Polsku (Szkucik et al., 2014), což naznačuje příznivý klesající trend ve výskytu tohoto parazitárního poškození jater. Rampin et al. (2008), kteří se zabývali patologickými nálezy u králíků poražených na jatkách v Itálii, zjistili, poškození jater u 0,23 % ze všech poražených králíků, přičemž nejčastější příčinou narušení jaterní tkáně byla jaterní kokcidióza, steatóza a nekrotizující hepatitida. Conficoni et al. (2020), kteří se zabývali patologickými nálezy zjištěnými při postmortální veterinární prohlídce králíků na jatkách v Itálii v letech 2003 až 2017, jaterní léze mezi zaznamenanými nálezy na jatkách vůbec neuvádí.

Pokud jde o srovnání druhů vykrmované drůbeže oproti nosnicím byl zjištěn výrazně nižší počet jaterních lézí. Ze zjištěných nálezů vyplývá také vyšší citlivost krůt na správný obsah živin ve výživě ve srovnání s ostatními druhy vykrmované drůbeže. Patoanatomické nálezy na játrech byly detekovány u 3,35 % ze všech poražených krůt, jednalo se téměř výlučně o nálezy chronického charakteru. Obdobně Januskeviciene et al. (2010) zjistili, že ze všech sledovaných druhů vykrmované drůbeže (brojleři, krůty, kachny) vykazovaly krůty nejvíce patoanatomických nálezů, přičemž hned po končetinách (85,79 % z všech poražených krůt) byly nálezy na játrech nejčastější (45,68 % ze všech poražených krůt). Naopak brojleři obecně vykazují nejnižší počet patoanatomických nálezů ze všech sledovaných druhů a kategorií zvířat (Ninčáková et al., 2022; Januskeviciene et al., 2010), což souvisí se skutečností, že se zároveň jedná o kategorii poráženou v nejnižším věku. V souladu s výsledky naší studie ani Jakob et al. (1998) či Salines et al. (2017) nezmiňují nálezy na játrech jako důvody konfiskace jatečných těl brojlerů. Buzdugan et al. (2020) uvedli perihepatitidu jako třetí nejčastější příčinu konfiskace jatečných těl brojlerů v Anglii. Kanadská studie (Amini et al., 2015) reflektuje zvýšenou míru konfiskace jatečných těl brojlerů v důsledku patologických lézí na játrech (nekrotická hepatitis, perihepatitis a hemoragie). Jako primární příčina těchto jaterních lézí byla identifikována imunosuprese způsobená infekční bursitidou (IBDV).

Jen o málo vyšší četnost jaterních lézí než u brojlerových kuřat byla zaznamenána u hus (1,15 %). Pravděpodobným vysvětlením je, že se jedná o poměrně nenáročný a přizpůsobivý druh, který je navíc i za komerčním účelem často chován extenzivním způsobem (výběh s pastvou, přístup k vodě), který zohledňuje přirozené potřeby tohoto druhu (Mazanowski, 2012). Vzácně bývá u hus detekována nekróza jater, jejíž příčinou může být zánět či intoxikace (Benard et al., 1992). Rovněž u kachen bylo detekováno relativně málo nálezů na játrech (1,89 %). Zajímavé však je, že kachny v rámci vykrmované drůbeže vykazují nejvyšší četnost nálezů akutního charakteru (0,68 %), jejichž příčinou může být infekce (např. hepatitida B, reoviry) nebo intoxikace v důsledku pastvy (těžké kovy, aflatoxikóza) (Cova et al., 1994; Li et al., 2016; Tulayakul et al., 2018). Mezi chronická poškození jater lze u kachen zařadit steatózu nebo dokonce rakovinu jater (vyvolanou virem hepatitidy či aflatoxikózou) (Davail et al., 2005; Cova et al., 1994).

Při zhodnocení výskytu nálezů na játrech chronických, akutních a parazitárních je zřejmé, že chronické nálezy jsou statisticky významně vyšší než nálezy akutní a nebo parazitární u všech druhů a kategorií zvířat a akutní nálezy jsou statisticky významně vyšší než nálezy parazitární, a to u dojnic, telat, prasnic, selat, brojlerů, nosnic a kachen domácích, a naopak statisticky významně vyšší jsou parazitární nálezy než nálezy akutní u jalovic, býků ve výkrmu, prasat ve výkrmu, ovcí, jehňat, koz a kůzlat, králíků, krůt a hus domácích.

Pro chronické nálezy při porovnání počtu nálezů u zvířat dospělých ve srovnání se zvířaty vykrmovanými jsou nálezy vyšší u dospělých zvířat, a odpovídají zjištění nálezům celkovým, při porovnání nálezů u mláďat vyřazovaných z chovu ve srovnání se zvířaty

vykrmovanými jsou nálezy vyšší u mláďat, a odpovídají zjištění nálezům celkovým. Při srovnání jednotlivých druhů u dospělých zvířat je pořadí dojnice, prasnice, ovce a kozy, při srovnání jednotlivých druhů u vykrmovaných a mladých zvířat je pořadí jalovice a býci, prasata ve výkrmu, jehňata a kůzlata, a při srovnání jednotlivých druhů u vykrmované drůbeže a králíků je pořadí krůty, kachny, husy, brojleři a králíci. Tato porovnání odpovídají zjištěním pro celkové počty nálezů. Chronické nálezy představují dominantní podíl celkových nálezů na játrech, vysvětlení pro zjištění vyplývající pro chronické nálezy jsou obdobná, jako pro nálezy celkové, přičemž chronické nálezy jsou více přičítány dlouhodobému působení nevyvážené výživy než náhlým změnám ve výživě zvířat. Typickým příkladem chronického onemocnění jater u hospodářských zvířat je steatóza. Játra jsou místem, kde probíhá syntéza tuku, ale za určitých okolností se může nadbytečný tuk ukládat přímo v játrech, což způsobuje zdravotní problémy (Zaefarian et al., 2019). U drůbeže se vyskytuje syndrom ztučnělých jater (severe fatty liver syndrome), na jehož rozvoji se podílí řada faktorů (environmentální, hormonální, genetické), z nichž některé dosud nebyly zcela objasněny. Nejčastěji bývají tímto syndromem postiženy nosnice a krůty (Hansen and Walzem, 1993).

Pro akutní nálezy odpovídají zjištění nálezům celkovým (s výjimkou nálezů u koz a kůzlat a dále krůt, hus a králíků s nálezem 0 nebo 1). Akutní nálezy představují menší podíl nálezů z celkových nálezů, nicméně jejich stejná struktura jako u nálezů celkových dává obdobná vysvětlení pro akutní nálezy jako u nálezů celkových.

Ze všech druhů a kategorií sledovaných hospodářských zvířat bylo nejvíce nálezů akutního charakteru detekováno u selat (13,22 %), s odstupem následovaly krávy (5,21 %) a telata (5,15 %). Pokud jde o poměr počtu akutních nálezů k celkovému počtu nálezů, nejvyšší podíl akutních nálezů byl zjištěn u selat, brojlerů a telat, jedná se tedy o mladá zvířata, u nichž se chronické procesy dosud nestačily plně rozvinout. Akutní nálezy jsou více přičítány změnám ve výživě než dlouhodobému působení výživových vlivů. Kromě dietetických příčin se mohou akutní patologické procesy v jaterní tkáni rozvinout v důsledku infekce či intoxikace. Například u drůbeže jsou zjišťovány akutní léze na játrech v důsledku salmonelózy, kamylobakterií, aviární chřivky či Markovy choroby, z intoxikací bývá zaznamenávána aflatoxikóza (Verwoerd et al., 2000; Wieliczko et al., 2002; Rashid et al., 2013).

Pro parazitární nálezy je zřejmé, že četnost parazitárních nálezů je ovlivněna druhovou vnímavostí na různé druhy parazitů a také stářím zvířat, a tyto faktory vedou k jiné struktuře nálezů, než je tomu u chronických nebo akutních nálezů.

Při porovnání počtu parazitárních nálezů u zvířat dospělých ve srovnání se zvířaty vykrmovanými byl zjištěn statisticky významně vyšší výskyt u jalovic (1,50 %) ve srovnání s dojnicemi (0,74 %) a býky (0,56 %), a také u vykrmovaných prasat (3,76 %) ve srovnání s prasnicemi (0,61 %), naopak u ovcí byl zjištěn významně vyšší počet nálezů u ovcí (8,09 %) ve srovnání s jehňaty (3,84 %) a u koz (0,63 %) ve srovnání s kůzlaty (0,22 %). Tyto nálezy odpovídají systémům výživy různých druhů a kategorií zvířat ve vztahu k možnostem parazitární invaze. U skotu jsou pastevním způsobem krmeny především jalovice, proto je u jalovic vyšší úroveň parazitární invaze ve srovnání s dojnicemi a nebo s býky, jejichž krmení je stájové a založené na směsích, silážích a senážích. U prasat je výživa založena na směsích, nicméně pro nebezpečí invaze škrkavkami je vyšší parazitárně hygienická péče v chovech věnována prasnicím z důvodu jejich ceny a reprodukčního přínosu, než vykrmovaným prasatům, u nichž je parazitární poškození jater (askarióza) zaznamenáváno nejčastěji (3,76 %) ze všech kategorií prasat. Zamoření chovů prasat škrkavkami zmiňují i Ceccarelli et al. (2018), kteří uvádějí parazitární hepatitidu jako příčinu konfiskace u 96,2 % ze všech vyřazených prasečích jater.

U ovcí je zřejmé, že pastevní způsob výživy vede k parazitární invazi, jejíž dopad je vyšší u bahnic, kde s ohledem na jejich stáří je četnější a delší, než je tomu u jehňat. Ovce (a

jehňata) jsou jediným druhem, u kterého dominovaly jaterní léze parazitárního původu. Toto zjištění potvrzují i Ceccarelli et al. (2018), kteří zjistili parazitární původ dokonce u 96,2 % ze všech jaterních lézí nalezených u ovcí. Torina et al. (2004) upozorňují, že až 80 % patologií u ovcí a koz je spojeno právě s přítomností parazitů.

U koz je způsob chovu ve stájích i pastevní, a proto je četnost parazitárních nálezů nízká a ve srovnání s kůzlaty je vyšší z důvodu možnosti delší doby pro nakažení u dospělých zvířat. Na rozdíl od naší studie zaznamenali Ceccarelli et al. (2018) významné množství patologických nálezů parazitárního původu na játrech (zejména askariózu a distomatózu) prakticky u všech druhů sledovaných hospodářských zvířat.

Při porovnání počtu parazitárních nálezů u mláďat vyřazovaných z chovu ve srovnání se zvířaty vykrmovanými byl zjištěn statisticky významně vyšší výskyt u jalovic (1,50 %) i býků (0,56 %) ve srovnání s telaty (0,13 %), a u prasat ve výkrmu (3,76 %) ve srovnání se selaty (1,28 %). U jalovic a býků je dopad parazitární invaze vyšší než u telat z důvodu jejich vyššího věku než věku telat a tím také delší časové možnosti parazitární invaze než u telat, obdobně je tomu také při porovnání prasat ve výkrmu a selat.

Při porovnání jednotlivých druhů u dospělých zvířat jsou počty nálezů statisticky významně vyšší v pořadí ovce (8,09 %), a po té dojnice (0,74 %) a kozy (0,63 %) a prasnice (0,61 %). Pořadí parazitárních nálezů u dospělých zvířat podle druhů odpovídá způsobu výživy ve spojení s možností parazitární invaze, vysoká je u ovcí, které jsou dlouhodobě paseny ve volné přírodě s vysokou možností parazitárního nakažení, u dojnic a prasnic je stájový chov a u koz je stájový a pastevní chov, s omezenou možností parazitární invaze, proto je ve srovnání s ovcemi úroveň parazitárních nálezů na játrech výrazně nižší.

Dále při porovnání jednotlivých druhů u vykrmovaných zvířat jsou počty nálezů statisticky významně vyšší v pořadí jehňata (3,84 %) a prasata ve výkrmu (3,76 %), ve srovnání s jalovicemi (1,50 %) a býky (0,56 %), a kůzlaty (0,22 %). Pořadí parazitárních nálezů u mladých a vykrmovaných zvířat podle druhů odpovídá způsobu výživy ve spojení s možností parazitární invaze, nejvyšší je u jehňat, které jsou s ovcemi paseny ve volné přírodě s vysokou možností parazitárního nakažení, u jalovic je také převážně pastevní odchov avšak s ohledem na charakter pastvin (nejedná se zpravidla o pastviny ve vlhkých a podmáčených částech luk) s nižší možností parazitární invaze, u prasat ve výkrmu je výskyt parazitární invaze škrkavkami, který je s ohledem na dobu výkrmu a ochranu masa před rezidui antiparazitik řešen jen velmi omezeně, proto je výskyt parazitárních nálezů na játrech u vykrmovaných prasat zaznamenáván, u kůzlat je s ohledem na dobu jejich výkrmu uskutečňován zpravidla spíše stájový než pastevní chov a je zde proto nízká možnost parazitární invaze. Parazitární nálezy u králíků s ohledem na výživu formou granulí jsou velmi nízké a v případě, že se ojediněle vyskytnou jsou spojeny zpravidla s jaterní kokcidiózou u zvířat pocházejících z menších chovů, kde je výživa uskutečňována také trávou a senem. U drůbeže jsou parazitární nálezy ojedinělé.

Závěr

Sledovali jsme poškození jater u skotu, prasat, ovcí, koz, králíků a drůbeže v letech 2010 až 2019 u všech zvířat chovaných porážených na jatkách v České republice. Zjišťovali jsme pro jednotlivé kategorie zvířat celkové počty nálezů na játrech a dále v jejich členění na akutní, chronické, parazitární, ostatní.

Zjistili jsme, že výskyt poškození jater celkem je u všech druhů vyšší u zvířat dospělých ve srovnání se zvířaty vykrmovanými a mladými, je u skotu a prasat vyšší u mláďat vyřazovaných z chovu ve srovnání se zvířaty vykrmovanými a mladými, je při porovnání druhů u dospělých zvířat nejvyšší v pořadí dojnice 46,13%, prasnice 17,43%, ovce 13,07%, kozy 4,04%, je při porovnání druhů u vykrmovaných a mladých zvířat nejvyšší v pořadí jalovice 14,79% a býci 8,12%, prasata ve výkrmu 11,26%, jehňata 5,04%, kůzlata 0,75%, je při porovnání druhů u mláďat vyřazovaných z chovu nejvyšší v pořadí selata 29,40%, telata 17,12%, a dále je pro drůbež a králíky nejvyšší v pořadí krůty 3,35%, kachny 1,89%, husy 1,15%, brojleři 0,08% a králíci 0,05%.

Nálezy chronické a akutní vykazují obdobnou strukturu jako nálezy celkové, nálezy parazitární tuto strukturu (pořadí) nálezů nemají, protože se vyskytují vyšší počty parazitárních nálezů zejména u ovcí, jehňat a prasat ve výkrmu.

Výsledky dokládají zjištění, že vykrmovaná a mladá zvířata mají lepší jaterní kondici než zvířata dospělá, že vyřazovaná mláďata z chovu mají horší jaterní kondici než věkem starší vykrmovaná zvířata, že nejvyšší rozdíl mezi skutečnou výživou a potřebou metabolismu způsobující porušení jater je u skotu, po té u prasat, po té u ovcí a po té u koz, a to jak u dospělých tak také u vykrmovaných a mladých zvířat. U parazitárního zatížení jater výsledky dokládají skutečnost, že způsob výživy ve vztahu k možnostem parazitární invaze se odráží na výskytu parazitárních nálezů na játrech a to nejvíce u zvířat pasených na loukách s parazitární invazí, tj. ovcí (8,09%) a jehňat (3,84%), po té u jalovic (1,5%) a dále u zvířat, kde z hlediska ochrany masa před rezidui antiparazitik je antiparazitární ochrana omezena, tj. u prasat ve výkrmu (3,76%). Zvířata chovaná ve stáji, tj. dojnice, býci, prasnice, ovce, kůzlata jsou zatížena parazitární invazí výrazně méně. U králíků a drůbeže je parazitární poškození jater zjišťováno ojediněle.

Zjištěné výsledky vytváří znalostní podklad pro opatření k zlepšení zdraví a kondice jater u potravinových zvířat.

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

Literatura

- Amini K, Zachar T, Popowich S, Knezacek T, Goodhope B, Willson P, Gomis S 2015: Association of increased rate of condemnation of broiler carcasses due to hepatic abnormalities with immunosuppressive diseases in the broiler chicken industry in Saskatchewan. *Can J Vet Res* 79: 261-267
- Benard, G, Pelletier, JF, Labie, C, Talenton, JY 1992: Liver necrosis in fat geese and ducks - cases and sanitary consequences. *Rev Med Vet-Toulouse* 143: 435-442
- Buzdugan SN, Chang YM, Huntington B, Rushton J, Guitian J, Alarcon P, Blake DP 2020: Identification of production chain risk factors for slaughterhouse condemnation of broiler chickens. *Prev Vet Med* 181: 105036
- Ceccarelli M, Leprini E, Sechi P, Iulietto MF, Grispoli L, Goretti E, Cenci-Goga, BT 2018: Analysis of the causes of the seizure and destruction of carcasses and organs in a slaughterhouse in central Italy in the 2010-2016 period. *Ital J Food Saf* 7: 6899
- Conficoni D, Cullere M, Lago N, Alberghini L, Rossin T, Dalle Zotte A, Giaccone V 2020: Prevalence of post mortem lesions recorded in a large italian rabbit slaughterhouse over a fifteen-year period (2003-2017). *World Rabbit Sci* 28: 39-47
- Cova L, Mehrotra R, Wild CP, Chutimataewin S, Cao SF, Dufлот A, Prave M, Yu SZ, Montesano R, Trepo C 1994: Duck hepatitis-b virus-infection, aflatoxin b-1 and liver-cancer in domestic chinese ducks. *Brit J Cancer* 69: 104-109
- Davail S, Rideau N, Bernadet MD, Andre JM, Guy G, Hoo-Paris R 2005: Effects of dietary fructose on liver steatosis in overfed mule ducks. *Horm Metab Res* 37: 32-35

Drozd L, Paszkiewicz W, Pyz-Lukasik R 2019: Post-slaughter changes in rabbit carcasses in Poland between 2010 and 2018. *Med Weter* 75: 613-616

Dupuy C, Morignat E, Maugey X, Vinard JL, Hendriks P, Ducrot C, Calavas D, Gay E 2013: Defining syndromes using cattle meat inspection data for syndromic surveillance purposes: a statistical approach with the 2005-2010 data from ten French slaughterhouses. *BMC Vet Res* 9: 1-17

Fox NJ, Marion G, Davidson RS, White PCL, Hutchings MR 2013: Modelling Parasite Transmission in a Grazing System: The Importance of Host Behaviour and Immunity. *PLoS ONE* 8: 1-11

Gregory NG, Robins JK 1998: A body condition scoring system for layer hens. *N Z J Agric Res* 41: 555-559

Hansen RJ, Walzem RL 1993: Avian fatty liver hemorrhagic syndrome: a comparative review. *Adv Vet Sci Comp Med* 37: 451-468

Jakob HP, Morgenstern R, Albicker P, Hoop RK 1998: Condemnation reasons of slaughtered broilers from two major Swiss producing companies. *Schweiz Arch Tierh* 140: 60-64

Januskeviciene G, Paulauskas V, Dailidaviciene J, Juozaitiene V 2010: Analysis of pathologic lesions in the livestock and poultry slaughtered in the meat establishments of Lithuania. *Vet Zootec* 52: 33-42

Kaluža M, Večerek V, Voslářová E, Semerád Z, Passantino A 2020: Assessing the standard of health and welfare in individual categories of cattle from the viewpoint of intravital pathological changes. *Agriculture-Basel* 10: 619

Kaluža M, Večerek V, Voslářová E, Semerád Z, Passantino A 2021: Incidence of characteristic findings during veterinary carcass inspections 2010–2019 in the Czech Republic and the relation to the level of health and welfare of individual classes of cattle. *Animals* 11: 537

Keutgen H, Wurm S, Ueberschar S 1999: Pathologic changes in end-of-lay hens with regards to different housing systems. *Deut Tierarztl Woch* 106: 127-133

Lemos A, Morais L, Fontes MD, Pires I, Vieira-Pinto M 2015: *Campylobacter* spp. isolation from infected poultry livers with and without necrotic lesions. *Food Control* 50: 236-242

Lis H 1999: An evaluation of veterinary inspection of slaughtered animals and meat in Poland between 1987-1997. *Med Weter* 55: 243-246

Lis H 2002: Results of veterinary inspection of slaughtered animals and meat in Poland in 2000. *Med Weter* 58: 267-269

Li N, Hong TQ, Wang Y, Wang YL, Yu KX, Cai YM, Liu SD, Wei LM, Chai TJ 2016: The pathogenicity of novel duck reovirus in Cherry Valley ducks. *Vet Microbiol* 192: 181-185

Lupo C, Le Bouquin S, Allain V, Balaine L, Michel V, Petetin I, Colin P, Chauvin C 2010: Risk and indicators of condemnation of male turkey broilers in western France, February-July 2006. *Prev Vet Med* 94: 240-250

Mazanowski A 2012: *Hodowla i chów gęsi*. *Apra*, 402 p.

Ninčáková S, Večerek V, Válková L, Voslářová E, Kaluža M, Zavřelová V 2022: Health status of slaughtered animals as indicated by post-mortem inspection at slaughterhouses. *Acta Vet Brno* 91: in press

Rampin F, Piccirillo A, Schiavon E, Poppi L, Grilli G 2008: Detection of pathological lesions in slaughtered rabbits. *Ital J Anim Sci* 7: 105-111

Rashid N, Bajwa MA, Rafeeq M, Tariq MM, Abbas F, Awan MA, Khan MA, Shahzad I, Rehman A, Ahmad Z 2013: Prevalence of Aflatoxicosis in Broiler Chickens in Quetta, Pakistan. *Pak J Zool* 45: 1021-1026

Salines M, Allain V, Roul H, Magras, C, Le Bouquin S 2017: Rates of and reasons for condemnation of poultry carcasses: harmonised methodology at the slaughterhouse. *Vet Rec* 180: 516-516

Schwartzkopf-Genswein KS, Faucitano L, Dadgar S, Shand P, Gonzalez LA, Crowe TG 2012: Road transport of cattle, swine and poultry in North America and its impact on animal welfare, carcass and meat quality: A review. *Meat Sci* 92: 227-243

Szkucik K, Pyz-Lukasik R, Szczepaniak KO, Paszkiewicz W 2014: Occurrence of gastrointestinal parasites in slaughter rabbits. *Parasitology Research* 113: 59-64

Tabaran A, Dan SD, Reget O, Tabaran AF, Mihaiu M 2018: Slaughterhouse survey on the frequency of pathologies found in bovine post-mortem inspections. *Bull UASVM Vet Med* 75: 251-255

Torina A, Dara S, Marino AMF, Sparagano OAE, Vitale F, Reale S, Caracappa, S 2004: Study of gastrointestinal nematodes in Sicilian sheep and goats. *Ann N Y Acad Sci* 1026: 187-194

Tulayakul P, Mingkhwan R, Hananantachai H, Netvichian R, Khaodhiar S, Songserm T 2018: Heavy metal (Cd and Pb) and aflatoxin contamination in tissues and eggs from free grazing ducks and their environment in central Thailand. *Biol Trace Elem Res* 186: 514-520

Válková L, Večerek V, Voslářová E, Závřelová V, Conte F, Semerád Z 2021: The health and welfare of rabbits as indicated by post-mortem findings at the slaughterhouse. *Animals* 11: 659

Večerek V, Kozák A, Malena M, Chloupek P, Pištěková V 2004: Organs of slaughter pigs as a source of potential risk for human health in the Czech Republic during the years 1995–2002. *Vet Med – Czech* 49: 75-78

Večerek V, Voslářová E, Semerád Z 2020a: Patho-anatomic findings in finisher pigs, sows and piglets detected during veterinary slaughterhouse inspection. *Acta Vet Brno* 89: 341-347

Večerek V, Voslářová E, Semerád Z, Passantino A 2020b: The health and welfare of pigs from the perspective of post mortem findings in slaughterhouses. *Animals* 10: 825

Verwoerd DJ 2000: Ostrich Diseases. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 19: 638-661

Vial F, Schärer S, Reist M 2015: Risk Factors for Whole Carcass Condemnations in the Swiss Slaughter Cattle Population. *PLoS One* 10: 1-17

Vries AD, Marcondes MI 2020: Review: Overview of factors affecting productive lifespan of dairy cows. *Anim* 14: 155-164

Wieliczko A, Dzimira S, Mazurkiewicz M 2002: Marek's disease in flocks of layers and broilers. *Med Weter* 58: 144-147

Yiakoulaki M, Papanastasis V 2009: Foraging behaviour of sheep and goats grazing on silvopastoral systems in Northern Greece. *Options Méditerran* 85: 79-84

Zaefarian FA, Abdollahi MR, Cowieson A, Ravindran V 2019: Avian Liver: The Forgotten Organ. *Animals* 9: 63

Zhao Y, Mao JJ, She RP, Hu FJ, Soomro MH, Liang RP, Yang YF, Du F, Wang TT, Guo ZJ, Cheng MH 2016: Hepatitis associated with hepatitis B virus in broilers. *J Integr Agr* 15: 191-199

Porovnání výskytu poškození ledvin u skotu, prasat, ovcí a koz zjišťovaných na jatkách jako ukazatele zdraví zvířat

Lenka Válková, Eva Voslářová, Vladimír Večerek

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

Abstrakt

Zabývali jsme se výskytem poškození ledvin u skotu, prasat, ovcí a koz u zvířat chovaných a porážených na jatkách v České republice v období 10 let, a to 2010 až 2019. Porovnávali jsme celkové počty nálezů poškození ledvin mezi jednotlivými kategoriemi porážených zvířat. Následně jsme porovnávali úroveň chronických, akutních a parazitárních nálezů navzájem u jednotlivých sledovaných kategorií zvířat. Naše výsledky ukázaly, že výskyt poškození ledvin je u skotu, prasat, ovcí i koz statisticky významně nižší u mladých vykrmovaných zvířat (býci ve výkrmu, prasata ve výkrmu, jehňata a kůzlata), než u dospělých zvířat (dojnice, prasnice, ovce, kozy). Dále jsme zjistili, že výskyt poškození ledvin je u skotu a prasat statisticky významně nižší u mladých vykrmovaných zvířat (býci ve výkrmu, prasata ve výkrmu), než u mláďat vyřazovaných z chovu pro nízkou kondici a nebo zdraví (telata, selata). Zjistili jsme při porovnání jednotlivých kategorií dospělých zvířat, že je statisticky nejnižší výskyt poškození ledvin u koz a ovcí (3,04 % a 3,09 %) (mezi ovcemi a kozami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl $P = 0,93$), následně u prasníc (28,92 %), a nejvyšší byl u dojníc (40,81 %). Při porovnání jednotlivých kategorií vykrmovaných zvířat navzájem jsme zjistili, že výskyt nálezů na ledvinách je statisticky významně nejnižší v pořadí kůzlata (0,26 %), jehňata (0,44 %), vykrmovaní býci (10,88 %) a prasata ve výkrmu (13,94 %). Porovnáním výskytu chronických, akutních a parazitárních poškození ledvin vždy u jednotlivých sledovaných kategorií zvířat jsme zjistili, že se statistickou významností nejvyšší výskyt je u chronických poškození, po té u akutních poškození a nejnižší u parazitárních poškození (s výjimkou statistického porovnání četnosti výskytu akutních a parazitárních nálezů při porovnání koz a kůzlat, kde nebyl zjištěn žádný nález, a s výjimkou ovcí ($P = 0,703$) a jehňat ($P = 0,096$), kde byly zjišťovány jen ojedinělé nálezy). Výsledky ukazují, že z pohledu výskytu ledvinových poškození jako převážný důsledek dysbalance mezi metabolickými potřebami organismu a poskytovanou výživou zvířatům, existují nedostatky významné úrovně, které dokládají stále výrazný prostor pro další optimalizaci výživy jednotlivých kategorií zvířat, zohledňující nejen užitkovost, celkové klinické zdraví, ale také subklinické zdraví zvířat, která povede k snížení výskytu poškození ledvin zjišťovaných při porážení zvířat na jatkách.

Úvod

Ledviny jsou metabolickým orgánem v organismu zvířat, který se podílí svojí vylučovací funkcí na metabolické rovnováze organismu (Skotnicka et al., 2007). Zhoršená funkce ledvin a nebo morfologicky zjištěné poškození ledvin zpravidla souvisejí se zhoršenou funkcí ledvin narušuje celkové subklinické a nebo dokonce klinické zdraví zvířat a tím také úroveň pohody zvířat. Nález poškození ledvin tak dokládá porušení metabolismu zvířete nebo parazitární invazi již v té míře, že se projevuje morfologickým nálezem při prohlídce zvířat po porážení na jatkách. Charakter porušení ledvin v rozlišení nálezu chronického, akutního nebo parazitárního poškození pak umožňuje určit bližší povahu původu poškození ledvin.

Výskyt patoanatomických nálezů na ledvinách porážených zvířat je zmiňován v některých studiích, které se zabývají příčinami konfiskace jatečných těl hospodářských

zvířat či komplexně patoanatomickými nálezy zjištěnými v rámci postmortální veterinární prohlídky na jatkách. Většina těchto studií se však zaměřila jen na konkrétní druh hospodářského zvířete, zejména na skot (Tabaran et al., 2018; Kaluža et al., 2020, 2021) a prasata (Lis, 1999, 2002; Večerek et al., 2004, 2020a,b). Jen málo studií srovnává výskyt patoanatomických nálezů u více druhů či kategorií hospodářských zvířat za stejných podmínek a ve stejném období. Januskeviciene et al. (2010) srovnávali výskyt patologických nálezů u skotu, prasat, ovcí, koz, koní, králíků, zvěře a drůbeže v Litvě v letech 2007–2009. Ceccarelli et al. (2018) analyzovali příčiny konfiskace jatečných těl a orgánů u skotu, prasat, ovcí a koní na vybraných jatkách v Itálii v letech 2010–2016. Lis (2005) sledoval výskyt patologických nálezů u skotu, prasat, ovcí a koní na jatkách v Polsku v roce 2003. Machold et al. (2007) srovnávali výskyt patologických lézí u prasat a skotu chovaných v konvenčních a ekologických chovech v Německu v období jednoho roku. Studie, které by se podrobněji zaměřovaly na výskyt poškození ledvin, mezidruhové srovnání a analýzu možných příčin a souvislostí, byly publikovány spíše mimo Evropu. Elgumaa et al. (2017) srovnávali patologické léze na ledvinách u různých druhů přežvýkavců zjištěné na jatkách v Egyptě. Výskyt a charakter nálezů na ledvinách byl popsán také u porážených velbloudů v Íránu (Rezaie et al., 2014), u skotu v Peru (Macias et al., 2020) nebo u prasat v Brazílii (Carrizo et al., 2011). V evropských podmínkách však takové studie téměř chybí, přestože Jansen and Nordstoga (1992) zjistili výskyt patologických lézí u 59 % z 668 prasat porážených v Norsku a vyšetřených v jejich studii. Na výskyt poškození ledvin u jatečných prasat upozorňují také Spiekermeier et al. (2017) a Scheinert et al. (2016).

Cílem práce bylo zjistit úroveň poškození ledvin u jednotlivých kategorií skotu, prasat, ovcí a koz porážených na jatkách, zjistit, zdali a případně na jaké úrovni se liší poškození ledvin vykrmovaných zvířat od starších dospělých zvířat, zdali a případně na jaké úrovni se liší poškození ledvin u vykrmovaných zvířat od mláďat vyřazovaných z chovu pro neodpovídající kondici a nebo zdraví, dále jak se liší úroveň zdraví ledvin mezi jednotlivými kategoriemi dospělých zvířat a jak se liší úroveň zdraví ledvin mezi jednotlivými kategoriemi vykrmovaných zvířat. Záměrem tohoto porovnání bylo zjistit na základě rozdílů v úrovni poškození ledvin pro různé kategorie zvířat, u kterých kategorií se vyskytuje poškození ledvin nejčastěji a u kterých nejméně a dovodit možná opatření k snížení výskytu poškození ledvin u jatečných zvířat. Dále cílem práce bylo u jednotlivých sledovaných kategorií zvířat porovnat výskyt chronických, akutních a parazitárních poškození ledvin a ze zjištěných rozdílů dovodit dominantní charakter poruchy vedoucí k narušení ledvin zjišťovaných při prohlídce porážených zvířat na jatkách s cílem směřování případných opatření ke zvýšení úrovně zdraví ledvin v chovech jednotlivých kategorií jatečných zvířat.

Materiál a metodika

Porovnávali jsme úroveň zdraví ledvin mezi jednotlivými kategoriemi skotu, prasat, ovcí a koz. Úroveň zdraví ledvin jsme zjišťovali na základě výskytu poškození ledvin, zjišťovaných při veterinární prohlídce zvířat porážených na jatkách.

Výskyt poškození ledvin jsme sledovali u skotu pro kategorie dojnice, jalovice, býci ve výkrmu a telata vyřazovaná z chovu, dále u prasat pro kategorie prasnice, prasata ve výkrmu, a selata vyřazovaná z chovu, dále u ovcí pro kategorie bahnice a jehňata, dále u koz pro kategorie kozy a kůzlata.

Období zahrnuté do sledování představovalo 10 let, a to roky 2010 až 2019. V tomto období jsme vyhodnocovali výskyt poškození ledvin u zvířat sledovaných kategorií chovaných a porážených na jatkách v České republice. Rozsah sledování byl vymezen všemi poráženými zvířaty, tj. počtem 1 136 754 porážených dojnic, 257 912 porážených jalovic, 1 015 541 porážených býků ve výkrmu, 104 459 porážených telat vyřazených z chovu pro kondiční a nebo zdravotní důvody, 586 245 porážených prasníc, 25 027 303 porážených

prasat ve výkrmu, 123 191 poražených selat vyřazených z chovu pro kondiční a nebo zdravotní důvody, 22 815 poražených ovcí, 114 264 poražených jehňat, 1 348 poražených koz, 5 778 poražených kůzlat.

Prohlídku ledvin porážených zvířat prováděli úřední veterinární lékaři na jatkách, přičemž zaznamenávali počty zdravých ledvin a počty poškozených ledvin s členěním na poruchy chronické, akutní a parazitární.

Zjištěné počty za celé sledované období pro každou kategorii zvířat jsme přepočítali na relativní počty jako podíl výskytu poškození ledvin k počtu poražených zvířat příslušné kategorie zvířat přepočtený na procenta.

Porovnávali jsme výskyt poškození ledvin mezi jednotlivými kategoriemi porážených zvířat, a to z pohledu srovnání zvířat ve výkrmu a dospělých zvířat, dále z pohledu srovnání zvířat ve výkrmu a mláďat vyřazovaných z chovu pro neodpovídající kondici a nebo zdraví, z pohledu porovnání kategorií dospělých zvířat navzájem a dále z pohledu porovnání kategorií zvířat ve výkrmu navzájem. Dále jsme porovnávali uvnitř příslušné kategorie zvířat výskyt chronického, akutního a parazitárního poškození ledvin.

K statistickému porovnání zjištěných počtů nálezů byl využit Chí kvadrát test.

Ze zjištěných výsledků jsme usuzovali na rozdíly v úrovni ledvinného zdraví mezi vykrmovanými zvířaty a dospělými, mezi vykrmovanými zvířaty a vyřazovanými mláďaty, mezi jednotlivými kategoriemi dospělých zvířat, mezi jednotlivými kategoriemi vykrmovaných zvířat a dále mezi výskytem chronických, akutních a parazitárních poškození ledvin. Záměrem tohoto porovnání bylo zjistit rozdíly v úrovni poškození ledvin pro různé kategorie zvířat a určit u kterých kategorií se vyskytují poškození ledvin nejčastěji a u kterých nejméně často a dovést důvody těchto rozdílů vedoucí k vymezení opatření zaměřených k snížení výskytu poškození ledvin u jatečných zvířat a ke zvýšení úrovně zdraví ledvin v chovech jednotlivých kategorií jatečných zvířat.

Výsledky

Výskyt poškození ledvin u skotu, prasat, ovcí a koz porážených na jatkách je uveden v grafu 1. Bylo zjištěno, že u zvířat vykrmovaných ve srovnání se zvířaty dospělými je statisticky významně nižší ve svém počtu, a to u skotu (býci 10,87 % i jalovice 16,24 % x dojnice 40,76 %), i u prasat (prasata ve výkrmu 13,94 % x prasnice 28,91 %), i u ovcí (jehňata 0,44 % x ovce 3,09 %), a i u koz (kůzlata 0,26 % x kozy 3,04 %).

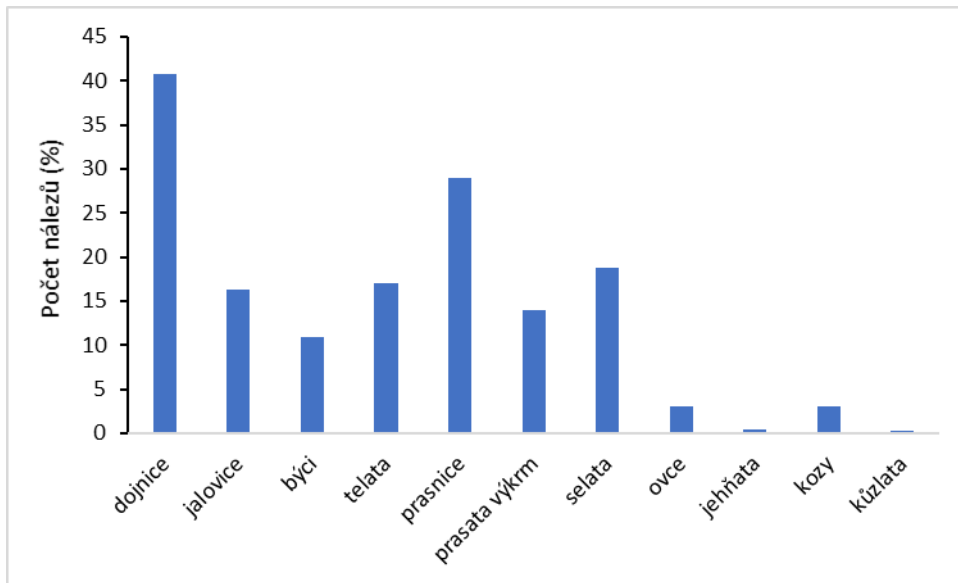
Při srovnání vykrmovaných zvířat s mláďaty vyřazovanými z chovu bylo zjištěno, že výskyt nálezů na ledvinách je statisticky významně nižší u zvířat vykrmovaných než u mláďat vyřazovaných z chovu, a to u skotu (býci 10,87 % i jalovice 16,24 % x telata 17,01 %) a u prasat (prasata ve výkrmu 13,94 % x selata 18,70 %).

Porovnáním jednotlivých druhů v kategorii dospělých zvířat navzájem jsme zjistili, že výskyt nálezů na ledvinách je statisticky významně nejnižší v pořadí ovce a kozy, prasata, skot, a to u dospělých zvířat v pořadí kozy a ovce (3,04 % a 3,09 %) (mezi ovcemi a kozami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl), prasnice (28,92 %), dojnice (40,81 %).

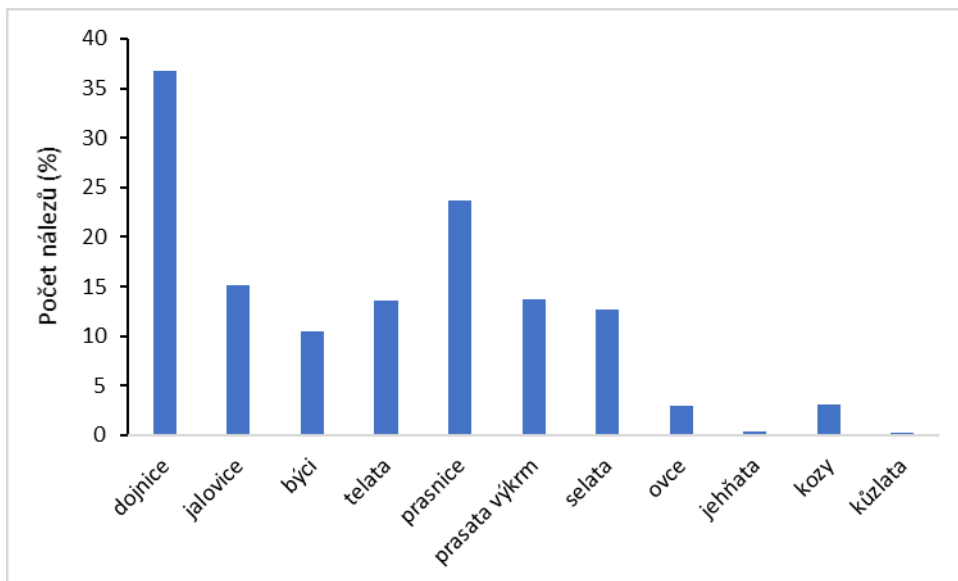
Porovnáním jednotlivých druhů v kategorii vykrmovaných zvířat navzájem jsme zjistili, že výskyt nálezů na ledvinách je statisticky významně nejnižší v pořadí kůzlata (0,26 %), jehňata (0,44 %), býci (10,88 %) a prasata ve výkrmu (13,94 %).

V grafu 2 je uveden výskyt chronického poškození ledvin, v grafu 3 je uveden výskyt akutního poškození ledvin a v grafu 4 je uveden výskyt parazitárního poškození ledvin u jednotlivých kategorií skotu, prasat, ovcí a koz porážených na jatkách.

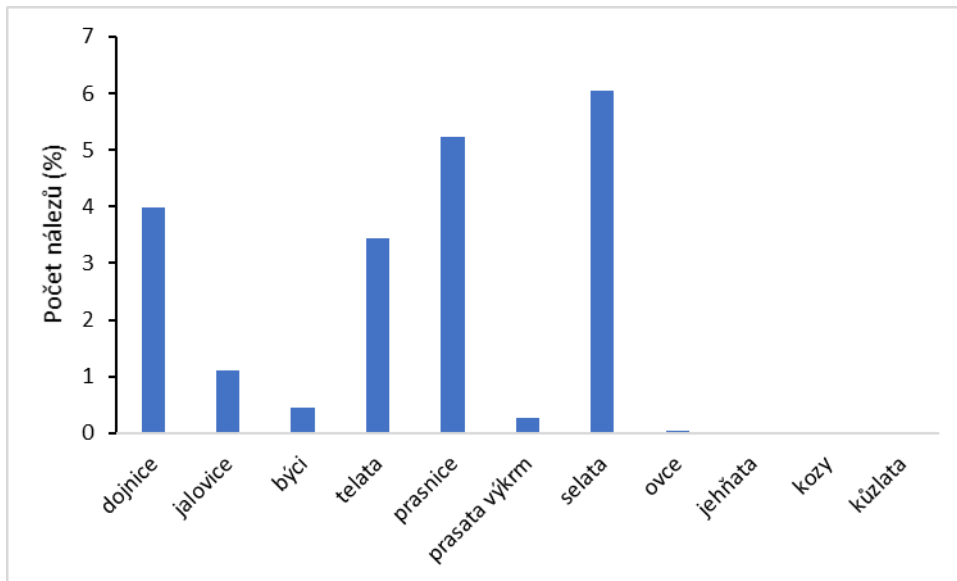
Graf 1. Výskyt poškození ledvin celkem u jednotlivých kategorií skotu, prasat, ovcí a koz porážených na jatkách



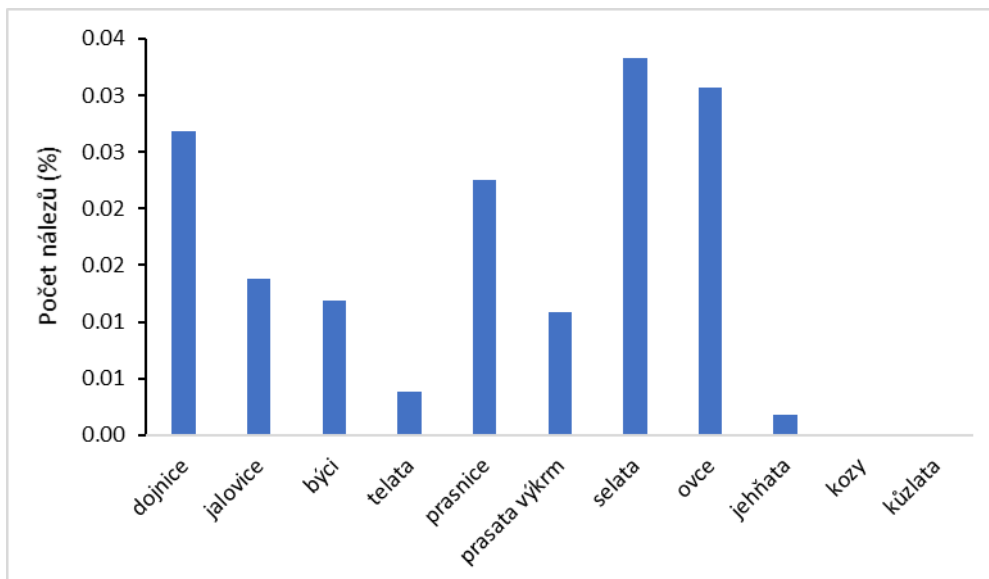
Graf 2. Výskyt chronického poškození ledvin u jednotlivých kategorií skotu, prasat, ovcí a koz porážených na jatkách



Graf 3. Výskyt akutního poškození ledvin u jednotlivých kategorií skotu, prasat, ovcí a koz porážených na jatkách



Graf 4. Výskyt parazitárního poškození ledvin u jednotlivých kategorií skotu, prasat, ovcí a koz porážených na jatkách



Porovnáním úrovní uvedených v grafech 2 až 4 výskytu nálezů chronického, akutního a parazitárního poškození ledvin u skotu, prasat, ovcí a koz zjišťovaných na jatkách je zřejmé, že úroveň nálezů u všech druhů a kategorií porážených zvířat je nejvyšší pro chronická poškození, po té pro akutní poškození a nejnižší pro parazitární poškození, při čemž statistické porovnání četnosti výskytu chronických a akutních nálezů vykazovalo statisticky významný rozdíl u všech kategorií, statistické porovnání četnosti výskytu chronických a parazitárních nálezů vykazovalo statisticky významný rozdíl u všech kategorií, statistické porovnání četnosti výskytu akutních a parazitárních nálezů vykazovalo statisticky významný rozdíl u všech kategorií s výjimkou koz a kůzlat, kde nebyl zjištěn žádný nález, a s výjimkou ovcí ($P = 0,703$) a jehňat ($P = 0,096$), kde byly zjišťovány jen ojedinělé nálezy.

Diskuze

Bylo zjištěno, že u zvířat vykrmovaných ve srovnání se zvířaty dospělými je statisticky významně nižší výskyt nálezů na ledvinách. Toto zjištění dokumentuje skutečnost, že zvířata vykrmovaná mladá mají lepší ledvinnou kondici než dospělá zvířata, protože vyšší věk a tím doba působení k narušení ledvin je u dospělých zvířat delší než u vykrmovaných mladých zvířat.

Při srovnání vykrmovaných zvířat s mláďaty vyřazovanými z chovu bylo zjištěno, že výskyt nálezů na ledvinách je statisticky významně nižší u zvířat vykrmovaných než u mláďat vyřazovaných z chovu, a to u skotu a u prasat. Z našeho zjištění je zřejmé, že vykrmovaná zvířata ponechaná v chovu na výkrm mají lepší ledvinnou kondici než mláďata vyřazovaná z chovu, z chovu vyřazovaná mláďata pro špatný výživný stav a nebo zdraví mají nižší úroveň zdraví ledvin než zvířata ponechaná v chovu.

Porovnáním jednotlivých druhů v kategorii dospělých zvířat navzájem jsme zjistili, že výskyt nálezů na ledvinách je statisticky významně nejnižší v pořadí ovce a kozy, prasata, skot, a to u dospělých zvířat v pořadí kozy a ovce (3,04 % a 3,09 %) (mezi ovce a kozami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl), prasnice (28,92 %), dojnice (40,81 %). Tyto výsledky dokládají, že nejnižší metabolické zatížení vedoucí k narušení ledvin (chronickému i akutnímu) je u koz a ovcí, kde je realizováno ve významné části přirozenou pastvou, kdy zvířata výběrem výživy pozitivně regulují metabolismus a v tomto důsledku pak je dopad na zatížení a následné poškození ledvin velmi malé. U prasnic je výživa realizována převážně krmnými směsmi a ve srovnání s dojnicemi je tato výživa z pohledu metabolismu prasnic méně zatěžující ledviny než u dojnic. Výživa dojnic, založená na silážích, senážích, a krmných směsích je z pohledu potřeb metabolismu nedostatečně vyvážená a tím dochází k výraznému zatěžování metabolismu dojnic s dopadem na ledviny a jejich následnému poškození, což se projevuje výskytem přes 40 % poškozených ledvin u dojnic a ve srovnání s ostatními druhy je enormní.

Porovnáním jednotlivých druhů v kategorii vykrmovaných zvířat navzájem jsme zjistili, že výskyt nálezů na ledvinách je statisticky významně nejnižší v pořadí kůzlata (0,26 %), jehňata (0,44 %), býci (10,88 %) a prasata ve výkrmu (13,94 %). Nejnižší metabolické zatížení vedoucí k narušení ledvin (chronickému i akutnímu) je u kůzlat a jehňat, kde je výživa realizována přirozenou pastvou a zvířata tak výběrem výživy mohou pozitivně regulovat metabolismus a dopad na poškození ledvin je velmi malý. U prasnic je výživa realizována převážně krmnými směsmi a ve srovnání s dojnicemi je tato výživa z pohledu metabolismu prasnic méně zatěžující ledviny než u dojnic. U býků je z hlediska potřeb metabolismu výživa částečně nedostatečně vyvážená a tím dochází k zatěžování jejich metabolismu a následnému poškození ledvin, intenzita zatížení je však nižší než u vykrmovaných prasat. Růst vykrmovaných prasat je podstatně intenzivnější než vykrmovaných býků, a proto nároky na výživu odpovídající tomuto intenzivnímu metabolismu jsou výrazně vyšší, krmné směsi ve výkrmu prasat však tuto potřebu nekryjí zcela dostatečně a tyto dysbalance se projevují dopadem na zatížení a následné poškození ledvin, jejichž výskyt je tak vyšší než u vykrmovaných býků.

Z výsledků je zřejmé, že metabolické zatížení ledvin při dysbalanci metabolických potřeb organismu a výživy zvířat je převážně nižšího stupně působící delší časové období mající dopad na chronická poškození ledvin. Výskyt akutních poškození ledvin souvisejících s náhlou výraznou změnou výživy zvířat s dopadem na výrazné zatížení metabolismu a tím také ledvin zvířat je v chovech sledovaných kategorií zvířat statisticky významně méně časté. Parazitární poškození ledvin se vyskytuje ve srovnání s chronickými a akutními nálezy statisticky významně málo a je víceméně velmi řídké, což souvisí se skutečností, že ledviny nejsou cílový orgán v případně invaze endoparazitů skotu, prasat, ovcí i koz.

Závěr

Zabývali jsme se výskytem poškození ledvin u skotu, prasat, ovcí a koz u zvířat chovaných a porážených na jatkách v České republice v období 10 let, a to 2010 až 2019. Porovnávali jsme celkové počty nálezů poškození ledvin mezi jednotlivými kategoriemi porážených zvířat. Následně jsme porovnávali úroveň chronických, akutních a parazitárních nálezů navzájem u jednotlivých sledovaných kategorií zvířat.

Naše výsledky ukázaly, že výskyt poškození ledvin je u skotu, prasat, ovcí i koz statisticky významně nižší u mladých vykrmovaných zvířat (býci ve výkrmu, prasata ve výkrmu, jehňata a kůzlata), než u dospělých zvířat (dojnice, prasnice, ovce, kozy).

Dále jsme zjistili, že výskyt poškození ledvin je u skotu a prasat statisticky významně nižší u mladých vykrmovaných zvířat (býci ve výkrmu, prasata ve výkrmu), než u mláďat vyřazovaných z chovu pro nízkou kondici a nebo zdraví (telata, selata).

Zjistili jsme při porovnání jednotlivých kategorií dospělých zvířat, že je statisticky nejnižší výskyt poškození ledvin u koz a ovcí (3,04 % a 3,09 %) (mezi ovcemi a kozami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl), následně u prasnic (28,92 %), a nejvyšší byl u dojníc (40,81 %).

Při porovnání jednotlivých kategorií vykrmovaných zvířat navzájem jsme zjistili, že výskyt nálezů na ledvinách je statisticky významně nejnižší v pořadí kůzlata (0,26 %), jehňata (0,44 %), vykrmování býci (10,88 %) a prasata ve výkrmu (13,94 %).

Porovnáním výskytu chronických, akutních a parazitárních poškození ledvin vždy u jednotlivých sledovaných kategorií zvířat jsme zjistili, že se statistickou významností nejvyšší výskyt je u chronických poškození, po té u akutních poškození a nejnižší u parazitárních poškození (s výjimkou statistického porovnání četnosti výskytu akutních a parazitárních nálezů při porovnání koz a kůzlat, kde nebyl zjištěn žádný nález, a s výjimkou ovcí a jehňat, kde byly zjištěny jen ojedinělé nálezy).

Výsledky ukazují, že z pohledu výskytu ledvinných poškození jako převážný důsledek dysbalance mezi metabolickými potřebami organismu a poskytovanou výživou zvířatům, existují nedostatky významné úrovně, které dokládají stále výrazný prostor pro další optimalizaci výživy jednotlivých kategorií zvířat, zohledňující nejen užitkovost, celkové klinické zdraví, ale také subklinické zdraví zvířat, která povede k snížení výskytu poškození ledvin zjišťovaných při porážení zvířat na jatkách.

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

Literatura

- Carrijo KD, do Nascimento ER, Tortelly R 2011: Porcine enzootic pneumonia: Relationship between microscopic lung and kidney lesions in Santa Catarina, Brazil. *Biosci J* 27: 439-443
- Ceccarelli M, Leprini E, Sechi P, Iulietto MF, Grispoli L, Goretti E, Cenci-Goga, BT 2018: Analysis of the causes of the seizure and destruction of carcasses and organs in a slaughterhouse in central Italy in the 2010-2016 period. *Ital J Food Saf* 7: 6899
- Elgumaa MM, Mohammed FF, Elmady MM, Bakeer AM, Gad MH 2017: Pathological characterization of renal lesions developed in some ruminant species in Egyptian slaughter house. *Res J Pharm Biol Chem Sci* 8: 1867-1878
- Jansen JH, Nordstoga K 1992: Renal lesions in Norwegian slaughter pigs - macroscopic and light microscopic studies. *J Vet Med A* 39: 582-592
- Januskeviciene G, Paulauskas V, Dailidaviciene J, Juozaitiene V 2010: Analysis of pathologic lesions in the livestock and poultry slaughtered in the meat establishments of Lithuania. *Vet Zootec* 52: 33-42

Kaluža M, Večerek V, Voslářová E, Semerád Z, Passantino A 2020: Assessing the standard of health and welfare in individual categories of cattle from the viewpoint of intravital pathological changes. *Agriculture-Basel* 10: 619

Kaluža M, Večerek V, Voslářová E, Semerád Z, Passantino A 2021: Incidence of characteristic findings during veterinary carcass inspections 2010–2019 in the Czech Republic and the relation to the level of health and welfare of individual classes of cattle. *Animals* 11: 537

Lis H 1999: An evaluation of veterinary inspection of slaughtered animals and meat in Poland between 1987-1997. *Med Weter* 55: 243-246

Lis H 2002: Results of veterinary inspection of slaughtered animals and meat in Poland in 2000. *Med Weter* 58: 267-269

Lis H 2005: Results of veterinary inspection of slaughter animals and meat in Poland in 2003. *Med Weter* 61: 1160-1161

Macias DIB, Goicochea CAB, Ruano MP, Ruales APR, Flores MAF, Loor LV, Rodriguez RAJ, Rodriguez OF 2020: Association between the presence of antibodies against *Leptospira* and kidney lesions in cattle. *Rev Invest Vet Peru* 31: 19028

Machold U, Troeger K, Moje M 2007: Organic versus conventional livestock production systems. *Fleischwirtschaft* 87: 89-93

Rezaie A, Mohamadian B, Anbari S, Hossein Zadeh K 2014: Histopathological investigations on renal lesions in slaughtered camel (*Camelus dromedarius*) in North East of Iran. *Kafkas Univ Vet Fak* 20: 501-506

Scheinert J, Muller K, Meiler H, Schoon HA 2016: The pig kidney in the 21st century - which diagnoses could be made in the abattoir and how should they be interpreted? *J Food Saf Food Qual* 67: 64-71

Skotnicka E, Muszczyński Z, Dudzińska W, Suska M 2007: A review of the renal system and diurnal variations of renal activity in livestock. *Irish Vet J* 60: 161-168

Spiekermeier I, Freitag M, Baumgartner W 2017: Interstitial nephritis in pigs. *Tieraerztl Prax G N* 45: 350-356

Tabaran A, Dan SD, Reget O, Tabaran AF, Mihaiu M 2018: Slaughterhouse survey on the frequency of pathologies found in bovine post-mortem inspections. *Bull UASVM Vet Med* 75: 251-255

Večerek V, Kozák A, Malena M, Chloupek P, Pištěková V 2004: Organs of slaughter pigs as a source of potential risk for human health in the Czech Republic during the years 1995–2002. *Vet Med – Czech* 49: 75-78

Večerek V, Voslářová E, Semerád Z 2020a: Patho-anatomic findings in finisher pigs, sows and piglets detected during veterinary slaughterhouse inspection. *Acta Vet Brno* 89: 341-347

Večerek V, Voslářová E, Semerád Z, Passantino A 2020b: The health and welfare of pigs from the perspective of post mortem findings in slaughterhouses. *Animals* 10: 825

Využití infračervené termografie při hodnocení akutního stresu u králíka domácího

Gabriela Lukešová, Martina Volfová, Monika Šebánková, Eva Voslářová,
Vladimír Večerek

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

Abstrakt

Infračervená termografie je poměrně novou, ale nadějnou metodou v hodnocení stresu a zdravotních poruch u zvířat. Výhoda této metody spočívá především v distančním získávání dat bez nutnosti manipulace se zvířetem, která by mohla ovlivnit výsledek pokusu. Pro snímání králíka je ideálním místem vnitřní koutek oka, neboť zde není žádný pokryv srsti a je snadno dostupným místem pro získávání snímků. Pomocí termokamery byla změřena povrchová teplota vnitřního koutku oka 12 králíků vystavených stresovému faktoru, kterým byla manipulace a tetování uší. Bazální hodnota povrchové teploty naměřená v kotci před jakoukoli manipulací byla průměrně 36,75 °C ($\pm 0,29$ °C). Při následné fixaci a tetování došlo k výraznému nárůstu povrchové teploty v oblasti koutku oka ($p < 0,01$), přičemž svého maxima dosáhla během samotného tetování (průměrně 38,62 °C, $\pm 0,15$ °C). Rozdíl v naměřených teplotách nebyl významný pouze při porovnání teplot při fixaci před a po tetování ($p < 0,01$). Ani po 15-20 minutách nedosahovala hodnota povrchové teploty naměřené opět v kotci (průměr 37,78 °C, $\pm 0,16$ °C) bazální teploty naměřené před pokusem. Při znalosti techniky měření termokamerou a respektování vnějších faktorů, které mohou měření ovlivňovat, lze tuto metodu velmi snadno využít i k dalším studiím týkajícím se welfare králíků nebo k hodnocení jejich zdravotního stavu souvisejícím se změnám teploty na povrchu těla.

Úvod

Králíci jsou druhem hojně využívaným v intenzivních chovech pro získávání králíčího masa nebo jako laboratorní zvířata. Jejich život je v těchto chovech spjat s mnoha stresovými vlivy, které souvisí s podmínkami ustájení, jakou je například teplota (Dalmau et al., 2015), a také s přepravou (Mazzone et al., 2010). I přes snahy o zlepšení životních podmínek jsou stále některé aspekty intenzivního chovu pro králíky nevyhovující (Trocino and Xiccato, 2010). Rovněž laboratorní podmínky mají prokazatelně negativní vliv na welfare králíků a jsou spojovány s výskytem poruch chování v důsledku nevhodného sociálního uspořádání (Chu et al., 2004) nebo omezeného prostoru (Gunn and Morton, 1995). Vzhledem k snaze zajistit přijatelnou úroveň welfare zvířat v hospodářských nebo laboratorních chovech se výzkumy zaměřují na faktory, které tato zvířata ovlivňují, a na možnosti, jak vliv těchto faktorů na zvířata monitorovat.

Jednou z možností, jak získávat data o úrovni životní pohody zvířat, je detekce stresu. Možností, jak stanovit hladinu stresu u králíků, je více. Využívá se například laboratorní stanovení hladin glukokortikoidů, konkrétně kortikosteronu, který je u králíka dominantním hormonem, v krvi (Hudson et al., 2011), trusu (Prola et al., 2013) nebo ve slinách (Munari et al., 2020). Další možností je využití termokamery, která je schopná převádět infračervené záření vyzařující z těla králíka a převádět toto záření na výsledné hodnoty povrchové teploty. Je prokázáno, že akutní stres způsobuje změny na povrchu těla zvířat (Almeida et al., 2018; Bartolomé et al., 2019; Herborn et al., 2015) v důsledku působení glukokortikoidních hormonů (Cabezas et al., 2007) a prostřednictvím termokamery lze ze snímků získat data o těchto změnách. tato metoda se mimo jiné používá také k detekci některých zdravotních poruch u zvířat, která se také projevují změnou teploty na povrchu (Colak et al., 2008; Wilcox

et al., 2009). Výhodou této metody je její rychlost a především to, že se jedná o zcela bezkontaktní způsob měření – je tedy možné vyhnout se ovlivnění konečných hodnot přímou manipulací se zvířetem. Je však třeba počítat s určitými faktory, které mohou měření ovlivnit – například proudění vzduchu, sluneční záření nebo vlhkost (Travain and Valsecchi, 2021).

Cílem této práce bylo získat data o povrchové teplotě na vnitřním koutku oka králíků, naměřit hodnoty bazální teploty u králíka v kleci a následně je porovnat s hodnotami během manipulace, tetování a po něm.

Materiál a metodika

Ke snímání králíků byla využita termokamera testo 890-2 (Testo SE & Co. KGaA, Německo) s nastavenou emisivitou 0,97. Snímky byly pořizovány v pravém úhlu ke hlavě králíka ze vzdálenost 0,5 metru. Měření bylo prováděno na 12 králících tří plemen (kastorex, velký světlý stříbrný králík, meklenburský strakáč černý) ve stáří 7-8 měsíců. Králíci byli nejdříve snímáni termokamerou ve svých ubikacích (klecích), kde s nimi nebylo nijak manipulováno (bazální hodnota). Poté byli ze svých kotců přemístěni na stůl, kde byli zafixováni druhou osobu, která se při fixaci vyvarovala dotyku v oblasti očí, aby neovlivnila povrchovou teplotu. Při této manipulaci a znehybnění králíka (fixace 1) byli králíci snímáni po dobu 3 minut a následně bezprostředně v průběhu 1 minuty po tetování (tetování), které proběhlo tetovacími kleštěmi. Poté byla opět hlava králíka snímána po dobu dalších 3 minut (fixace 2) a následně byl králík vrácen do kotce, kde byl opět snímán po dalších 10 minutách (po ukončení). Výsledné hodnoty teplot byly odečítány z vnitřního koutku oka, které se pro tento účel jeví jako neoptimálnější – nedochází k ovlivnění vlhkosti, jako je tomu na nose. Vhodným místem pro snímání povrchové teploty jsou také uši králíka, které v tomto případě vzhledem k probíhajícímu tetování nemohly být využity.

Pro statistické zhodnocení byly hodnoty naměřené teploty u všech králíků rozděleny do následujících kategorií: bazální hodnota (v kleci před jakoukoli manipulací), fixace 1 (před tetováním u fixovaného králíka na stole), tetování (hodnoty naměřené do 1 minuty po provedení tetování), fixace 2 (během 2. – 4. minuty po tetování) a po ukončení (10 minut po návratu do kotce). Ke statistickému zpracování byl využit program UNISTAT 6.5 for Excel (Unistat Ltd., London, UK). Ke stanovení rozdílů mezi naměřenými hodnotami u jednotlivých kategorií (bazální teplota, fixace 1, tetování, fixace 2 a po ukončení) byla využita Friedmanova dvoufaktorová analýza rozptylu s mnohonásobným porovnáním pro t-rozdělení. Stanovené byly také minimální, maximální a průměrné hodnoty povrchové teploty u jednotlivých kategorií. Ve všech statistických testech byla hodnota $p < 0,01$ stanovena jako statisticky významná.

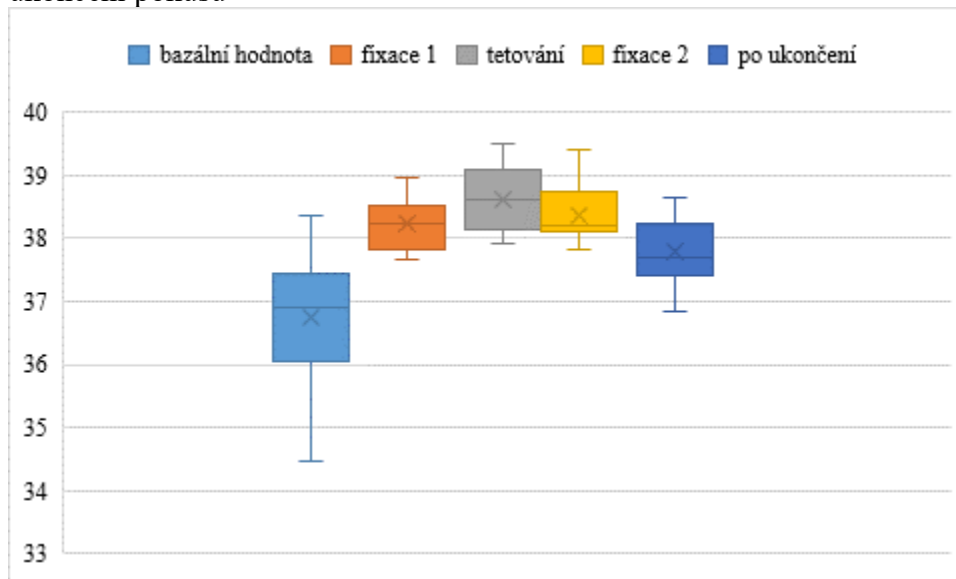
Výsledky

Během měření byl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) mezi všemi měřenými kategoriemi s výjimkou srovnání teplot naměřených při fixaci před tetováním (fixace 1) a fixaci po tetování (fixace 2), kde nebyl nalezen statistický rozdíl ($p > 0,01$). Tabulka č. 1 zobrazuje průměrné, minimální a maximální hodnoty naměřené během jednotlivých situací a graf č. 1 znázorňuje změny teploty v rámci jednotlivých kategorií.

Tabulka č. 1. Minimální, maximální a průměrné hodnoty povrchové teploty ve vnitřním koutku oka naměřená u všech 12 králíků v jednotlivých fázích měření

°C	bazální hodnota	fixace 1	tetování	fixace 2	po ukončení
průměr	36,75	38,22	38,62	38,37	37,78
minimum	34,45	37,65	37,9	37,81	36,85
maximum	38,35	38,95	39,5	39,41	38,65

Graf č. 1. Srovnání změn povrchových teplot 12 králíků v kleci, během fixace, tetování a po ukončení pokusu



Diskuze

Welfare králíků chovaných pro produkci masa, při přepravě, a v případě chovu v laboratorních podmínkách je aktuálně řešeným problémem (Cullere and Dalle Zotte, 2018), neboť tyto chovy mají negativní vliv nachování zvířat a snižují jejich životní úroveň (Dixon et al., 2010; Whary et al., 1993). U králíků v této studii bylo prokázáno, že teplota při akutním stresu v oblasti oka významně stoupá. Zvýšení povrchové teploty na oku obdobně jako u králíků v této studii bylo prokázáno také u koz (Bartolomé et al., 2019), koní (Yarnell et al., 2013) a také u psů, u kterých byl hodnocen vliv stresu při vyšetření veterinárním lékařem (Travain et al., 2015). U těchto psů byly hodnoty povrchové teploty nejvyšší během samotného vyšetření oproti hodnotám před a po vyšetření. Toto odpovídá našemu zjištění, kdy nejvyšší hodnota byla naměřena bezprostředně po tetování (38,62 °C) oproti teplotám před a po něm (38,22 °C, respektive 38,37 °C), všechny tyto teploty však zůstávaly významně vyšší než bazální hodnota (36,75 °C). Autoři u těchto psů také popisují, že termokamera měla na psy rušivý vliv, kdy zvířata na namířenou kameru reagovali odvracením hlavy, což u králíků nebylo pozorováno. K obdobným výsledkům přišly také další autoři při hodnocení akutního stresu u volně žijících druhů zvířat, konkrétně u sýkorek modřinek (Jerem et al., 2019). V tomto případě autoři popisují před vzestupem teploty také její pokles, zřejmě vlivem vazokonstrikce v dané oblasti bezprostředně po vystavení silnému stresovému faktoru. Tento pokles u králíků zaznamenán nebyl, což může být dáno odlišným provedením pokusu, případně k tomuto poklesu došlo v několika vteřinách po tetování, kdy vzhledem k pohybům hlavy v důsledku bolesti nebyly snímky provedeny. Mírný pokles povrchové teploty v oblasti očí králíků popisují také autoři Luzi et al. (2007), kteří naměřili jako průměr bazálních teplot naměřených v klecích v oblasti oka 35,4°C a po stresové zátěži 35,1 °C, nicméně v tomto případě byly snímky pořízeny až 15 minut po vystavení stresové situaci a je tedy možné, že během této doby mohlo dojít k opětovnému poklesu teplot, jak bylo zjištěno i v naší studii (teplota po ukončení fixace). Přesto na rozdíl od této studie se v našem případě se hodnoty po ukončení pokusu (37,78 °C) stále pohybovaly nad hodnotou bazální (36,75 °C). Nižší hodnoty při akutním stresu mohou být způsobeny vazokonstrikcí v dané oblasti (Herborn et al., 2015), ale vliv na vazokonstrikci nebo vazodilataci se zřejmě na těle může různit, jak bylo zjištěno u potkanů (Vianna and Carrive, 2005).

Stresová situace měla vliv na změnu povrchové teploty v koutku oka králíka a potvrdila tak vhodnost tohoto místa k získávání dat vzhledem k minimálnímu osrstění, jak

zmiňují také autoři Jaén-Télez et al. (2020). Vzhledem k tomu, že se jednalo o králíky do určité míry zvyklé na přítomnost člověka, což snižuje jejich strach z osob ve své blízkosti (Pongrácz et al., 2001), je možné, že nejvyšší teploty byly právě v reakci na bolest během tetování a u zvířat nenavyklých na blízkost člověka by již samotná manipulace mohla výrazněji zvyšovat povrchovou teplotu.

Závěr

Infračervená termografie dokáže poskytnout data o změnách povrchové teplotě v souvislosti s akutním stresem u králíků. Tato metoda je výhodná zejména z toho pohledu, že není nutné se zvířaty manipulovat a nedojde tak k ovlivnění výsledků. Při akutním stresu dochází ke stoupání teploty na oku králíka, které se jeví jako vhodné místo k měření, které není pokryto srstí a je dobře dostupné pro snímání. Akutní stresová reakce a bolest způsobují výrazné zvýšení teploty v této oblasti a klesá po určitou dobu po ukončení manipulace.

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

Literatura

- Bartolomé, E., Azcona, F., Cañete-Aranda, M., Perdomo-González, D.I., Ribes-Pons, J., Terán, E.M. 2019. Testing eye temperature assessed with infrared thermography to evaluate stress in meat goats raised in a semi-intensive farming system: a pilot study. *Arch. Anim. Breed.* 62: 199-204.
- Cabezas, S., Blas, J., Marchant, T.A., Moreno, S. 2007. Physiological stress levels predict survival probabilities in wild rabbits. *Hormones and Behavior* 51: 313-320.
- Colak, A., Polat, B., Okumus, Z., Kaya, M., Yanmaz, L.E., Hayirli, A. 2008. Short Communication: Early Detection of Mastitis Using Infrared Thermography in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 91: 4244–4248.
- Cullere, M., Dalle Zotte, A. 2018. Rabbit meat production and consumption: State of knowledge and future perspectives. *Meat Science* 143: 137-146.
- Dalmau, A., Catanese, B., Rafel, O., Rodriguez, P., Fuentes, C., Llonch, P., Mainau, E., Velarde, A., Ramón, J., Taberner, E., López-Béjar, M., Piles, M. 2015. Effect of high temperatures on breeding rabbit behaviour. *Anim. Prod. Sci.* 55: 1207.
- Dixon, L.M., Hardiman, J.R., Cooper, J.J. 2010. The effects of spatial restriction on the behavior of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Veterinary Behavior* 5: 302-308.
- Gunn, D., Morton, D.B. 1995. Inventory of the behaviour of New Zealand White rabbits in laboratory cages. *Applied Animal Behaviour Science* 45: 277-292.
- Herborn, K.A., Graves, J.L., Jerem, P., Evans, N.P., Nager, R., McCafferty, D.J., McKeegan, D.E.F. 2015. Skin temperature reveals the intensity of acute stress. *Physiology & Behavior* 152: 225-230.
- Hudson, R., Maqueda, B., Velázquez Moctezuma, J., Morales Miranda, A., Rödel, H.G. 2011. Individual differences in testosterone and corticosterone levels in relation to early postnatal development in the rabbit *Oryctolagus cuniculus*. *Physiology & Behavior* 103: 336-341.
- Chu, L., Garner, J.P., Mench, J.A. 2004. A behavioral comparison of New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) housed individually or in pairs in conventional laboratory cages. *Applied Animal Behaviour Science* 85: 121-139.
- Jaén-Télez, J.A., Sánchez-Guerrero, M.J., López-Campos, J.I., Valera, M., González-Redondo, P. 2020. Acute stress assessment using infrared thermography in fattening rabbits reacting to handling under winter and summer conditions. *Span J Agric Res* 18: e0502.
- Jerem, P., Jenni-Eiermann, S., McKeegan, D., McCafferty, D.J., Nager, R.G. 2019. Eye region surface temperature dynamics during acute stress relate to baseline glucocorticoids independently of environmental conditions. *Physiology & Behavior* 210: 112627.

- Luzi, F., Ludwig, N., Gargano, M., Milazzo, M., Carezzi, C., Verga, M. 2007. Evaluation of skin temperature change as stress indicator in rabbit through infrared thermography. *Italian Journal of Animal Science* 6: 769.
- Mazzone, G., Vignola, G., Giammarco, M., Manetta, A.C., Lambertini, L. 2010. Effects of loading methods on rabbit welfare and meat quality. *Meat Science* 85: 33-39.
- Munari, C., Ponzio, P., Macchi, E., Elkhawagah, A.R., Tarantola, M., Ponti, G., Mugnai, C. 2020. A multifactorial evaluation of different reproductive rhythms and housing systems for improving welfare in rabbit does. *Applied Animal Behaviour Science* 230: 105047.
- Pongrácz, P., Altbäcker, V., Fenes, D. 2001. Human handling might interfere with conspecific recognition in the european rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): Object-Specific Effect of Early Handling. *Dev. Psychobiol.* 39: 53–62.
- Prola, L., Cornale, P., Renna, M., Macchi, E., Perona, G., Mimosi, A. 2013. Effect of Breed, Cage Type, and Reproductive Phase on Fecal Corticosterone Levels in Doe Rabbits. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 16: 140–149.
- Travain, T., Valsecchi, P. 2021. Infrared Thermography in the Study of Animals' Emotional Responses: A Critical Review. *Animals* 11: 2510.
- Travain, T., Colombo, E.S., Heinzl, E., Bellucci, D., Prato Previde, E., Valsecchi, P. 2015. Hot dogs: Thermography in the assessment of stress in dogs (*Canis familiaris*)—A pilot study. *Journal of Veterinary Behavior* 10: 17-23.
- Trocino A., Xiccato G. 2010. Animal welfare in reared rabbits: a review with emphasis on housing systems. *World rabbit sci.* 14: 77-93.
- Vianna, D.M.L., Carrive, P. 2005. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. *European Journal of Neuroscience* 21: 2505-2512.
- Whary, M., Peper, R., Borkowski, G., Lawrence, W., Ferguson, F. 1993. The effects of group housing on the research use of the laboratory rabbit. *Lab Anim* 27: 330-341.
- Wilcox, C.S., Patterson, J., Cheng, H.W. 2009. Use of thermography to screen for subclinical bumblefoot in poultry. *Poultry Science* 88: 1176-1180.
- Yarnell, K., Hall, C., Billett, E. 2013. An assessment of the aversive nature of an animal management procedure (clipping) using behavioral and physiological measures. *Physiology & Behavior* 118: 32-39.

Hodnocení akutního stresu u králíka domácího (*Oryctolagus cuniculus f. domestica*) stanovením glukokortikoidů ve slinách

Gabriela Lukešová, Eva Voslášková, Martina Volfová, Vladimír Večerek

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

Abstrakt

Hodnocení stresu u hospodářských zvířat je aktuálním tématem a metody stanovení úrovně stresu jsou často diskutovány. Možnost stanovit hladinu kortikosteronu u králíků je spojena s mnoha výhodami, neboť se jedná o neinvazivní metodu sběru vzorků, které zároveň spolehlivě odráží momentální stav zvířete bez zkreslení výsledků, jako je tomu například při odběrech krve. V rámci hodnocení bylo 6 králíkům domácích při fixaci odebrán vzorek slin v 6, 9, 12, 15 a 18 hodin v průběhu tří po sobě jdoucích dnů. Hladiny kortikosteronu ve slinách u jednotlivých králíků vykazovaly obdobné kolísání v průběhu dne s významným navýšením mezi 12. a 15. hodinou ($p < 0,05$), a ačkoli variabilita v koncentracích byla poměrně vysoká, mezi jednotlivými králíky nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v koncentracích kortikosteronu. Ačkoli bazální hodnota kortikosteronu u králíků není známá a je těžké ji určit, tato studie jako jedna z mála předkládá výsledky kolísání koncentrací kortikosteronů ve slinách králíků a konkrétní výsledky naměřených koncentrací.

Úvod

Hodnocení stresu u zvířat je aktuálním tématem v oblasti welfare a vzhledem ke snaze rozvíjet postupy šetrné ke zvířatům jsou stále vyvíjeny a zdokonalovány neinvazivní metody. Jako matrice pro analýzu metabolitů glukokortikoidních hormonů kortizolu a kortikosteronu zde slouží různé biologické materiály, jako jsou sliny, srst, moč, mléko a výkaly (Verkerk et al., 1998, Kobelt et al., 2003, McCobb et al., 2005, Finkler and Terkel, 2010, Snyder et al., 2012, Volfova et al., 2019). V minulosti bylo nejužívanější metodou pro stanovení koncentrace glukokortikoidů odebrání krve zvířete (Romero, 2002). Odběr je však poměrně stresující, což může ovlivnit výsledné hodnoty. Problémem je také omezení použití invazivního odběru vzorků u velmi malých zvířat, který je kromě negativních dopadů na welfare jedince vysoce rizikovým úkonem spojeným s velkou ztrátou krve a následným úhynem, navíc není možné u takových zvířat odběr opakovat a hodnotit tak například hormonální status jedince během probíhající choroby (Touma and Palme, 2005). Vylučování glukokortikoidních hormonů je ovlivňováno cirkadiánními rytmy, kdy během 24hodinových cyklů, které jsou ovlivňovány jak endogenními, tak exogenními faktory (střídáním dne a noci), dochází ke kolísání v hladinách výše uvedených hormonů. Na základě koncentrací naměřených z krve tedy nelze přesně určit úroveň stresové reakce jedince, protože pouze vypovídají o aktuálním stavu zvířete, který je navíc ovlivněný samotným odběrem (Sapolsky et al., 2000).

Neinvazivní metody naopak nabízí oproti invazivním metodám řadu výhod. Například umožňují monitorovat nejen krátkodobé, ale i dlouhodobé změny v koncentracích metabolitů glukokortikoidů, které jsou podstatné při déle probíhajících studiích sledujících například kolísání hladin metabolitů během ročních období apod. (Touma et al., 2004). Hodnocení kortizolu či kortikosteronu ze slin je v současné době hojně využívanou metodou u hospodářských i zájmových zvířat (Kobelt et al., 2003). Dle dosavadních studií je zjištěno, že se hladina kortizolu v krvi odebíraného zvířete zvyšuje po 3 minutách od zahájení manipulace. Dle Kobelt et al. (2003) nedocházelo do 4 minut od zahájení manipulace se

zvířetem ke zvýšení hladin kortizolu ve slinách, což potvrzuje, že neinvazivní odběr vzorků je mnohem více reprezentativní a není ovlivněn samotným odběrem.

Králík domácí je druh hojně využívaný v intenzivních chovech pro produkci masa, ale také jako laboratorní zvíře. Během života se králíci setkávají s celou řadou stresových faktorů, které mají velký vliv na úroveň kvality jejich života (Dalmau et al., 2015; Mazzone et al., 2010). Pro hodnocení stresu u králíka již byly v minulosti využity invazivní metody jako je odběr krve (Hudson et al., 2011) nebo neinvazivní metody stanovení hladiny hormonů z trusu (Prola et al., 2013), a je známa pouze jedna studie, zabývající se odběrem a stanovení glukokortikoidů ze slin (Munari, 2020). Při hodnocení hladin stresových markerů u králíků ze slin je však potřeba si uvědomit, že na rozdíl od většiny savců je dominantně vylučován kortikosteron (Palme, 2019), nikoliv kortizol. Kortikosteron je ve větší míře také vylučován například u ptáků a hlodavců (Romero, 2004). Výhody použití neinvazivních metod spočívají nejen v šetrnosti vůči zvířeti, ale v případě stresu také nedochází ke zkreslení výsledků samotnou manipulací, případně doprovázenou bolestí, během odběru vzorku. Pro stanovení kortikosteronu ze slin je možné využít ELISA Immunoassay kitů (Palme, 2012).

Cílem studie bylo stanovení koncentrace kortikosteronu ve slinách u králíka domácího a jejího kolísání hladiny kortikosteronu v průběhu dne.

Materiál a metodika

Pro experiment bylo vybráno 10 dospělých králíků hybrid HYLEA (Farma Kočárovi s.r.o., Jaroměřice nad Rokytnou). Králíci byli umístěni v nerezových koticích s plastovým roštem a plošinou v prostorách s kontrolovanými podmínkami prostředí, které zahrnovaly 12 h světelný režim. Teplota byla udržována v rozmezí 17 až 23 °C a vlhkost 45 % až 60 %. Voda byla podávána ad libitum, krmeni byli 1x denně kompletní krmnou směsí. Králíci mezi sebou měli vizuální, čichový i hlasový kontakt.

Série odběrů probíhala po dobu 3 dnů. Každý den byl odběr realizován v 6, 9, 12, 15 a 18 hodin. Celkově tedy bylo odebráno 15 vzorků od každého králíka. Odběr slin byl proveden z tlamy pomocí odběrového setu Salivette (Sarstedt, Nümbrecht, Německo). Odběrový tampón byl pomocí peánu vložen do koutku tlamy králíka, který jej následně žvýkal po dobu 60-90s. Salivette sety byly ihned po odběru centrifugovány (6000ot/ 15 min). Vzorek slin byl přesunut do zkumavek Eppendorf a zmražen a uchováván v teplotě -80 °C. Množství slin odebraných od jednotlivých králíků byl individuální v rozmezí 0,02 – 0,5 ml. Během odběrů byli vyřazeni králíci, u kterých nebyl odebrán dostatečný vzorek pro hodnocení – jednalo se o 4 králíky, vzorky slin tak byly hodnoceny od 6 králíků.

Pro detekci kortikosteronu ve slinách králíků byl využit Corticosterone Competitive ELISA Kit (ThermoFisher Scientific, Česká republika) určený pro stanovení kortikosteronu ve vzorcích trusu, plazmy, séra a moči bez ohledu na druh zvířete s citlivostí 18,6 pg/ml a detekčními limity 78,125-10 000 pg/ml. Hodnocení bylo provedeno na kalorimetrickém snímači při vlnové délce 450 nm a výsledky byly odečteny z křivky navržené v software Arigo 's ELISA calculator (www.arigobio.com).

Pro vyhodnocení byly výsledné hodnoty u každého králíka v určitou hodinu vypočítány jako průměr hodnot tří vzorků odebraných ve stejný čas (tedy v 6, 9, 12, 15 a 18 hodin). Ke statistickému zpracování byl využit program UNISTAT 6.5 for Excel (Unistat Ltd., London, UK). Ke stanovení rozdílů mezi naměřenými hodnotami u králíků v jednotlivých sledovaných časech a také pro zhodnocení kolísání hladin kortikosteronu u každého králíka během dne byla využita Friedmanova dvoufaktorová analýza rozptylu s mnohonásobným porovnáním pro t-rozdělení. Stanovené byly také minimální, maximální a průměrné hodnoty koncentrace kortikosteronu v daných časech odběru. Ve statistických testech byla hodnota $p < 0,05$ stanovena jako statisticky významná.

Výsledky

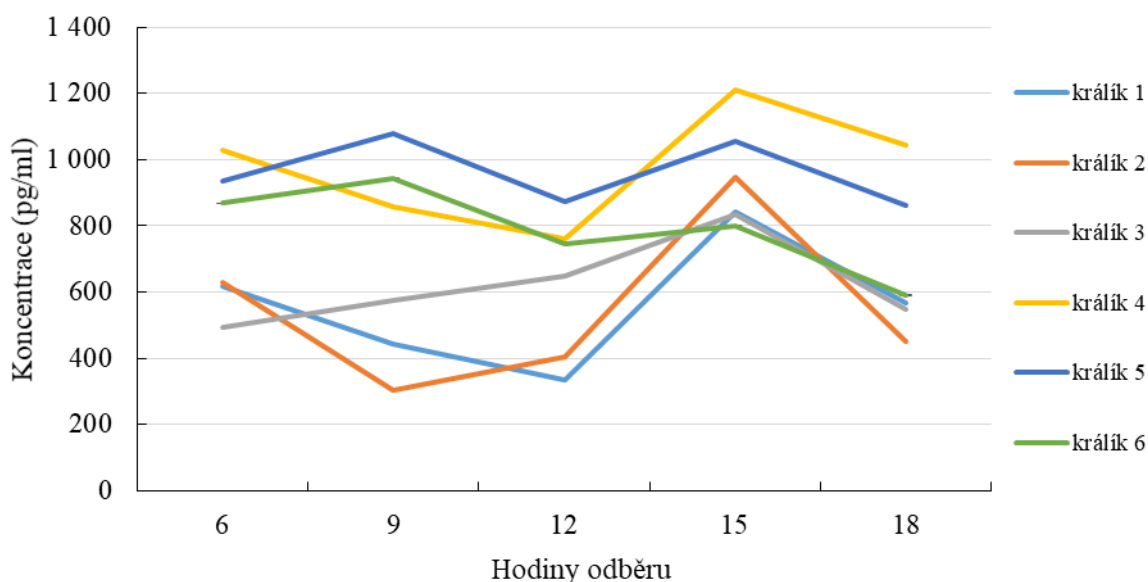
Pomocí testovací sady Corticosterone Competitive ELISA Kit byly zaznamenány následující průměrné koncentrace kortikosteronu ve slinách šesti králíků (Tabulka č. 1).

Tabulka č. 1. Průměrné koncentrace kortikosteronu ve slinách 6 králíků při odběrech v 6, 9, 12, 15 a 18 hodin (pg/ml).

Králík	Čas				
	6,00	9,00	12,00	15,00	18,00
1	617,52 ± 15,06	443,30 ± 63,45	336,07 ± 270,53	841,25 ± 186,80	568,97 ± 28,65
2	628,77 ± 325,76	304,61 ± 64,69	402,76 ± 236,15	947,55 ± 308,06	452,45 ± 203,58
3	493,18 ± 71,62	575,69 ± 179,60	650,35 ± 3,76	832,85 ± 143,86	548,12 ± 100,11
4	1 028,96 ± 145,31	857,17 ± 78,32	759,54 ± 152,34	1 211,77 ± 182,39	1 042,71 ± 310,62
5	935,75 ± 140,40	1 078,59 ± 54,34	873,01 ± 124,78	1 055,67 ± 123,67	859,94 ± 94,19
6	867,63 ± 79,76	944,20 ± 505,57	746,46 ± 465,28	799,61 ± 257,43	590,88 ± 307,34

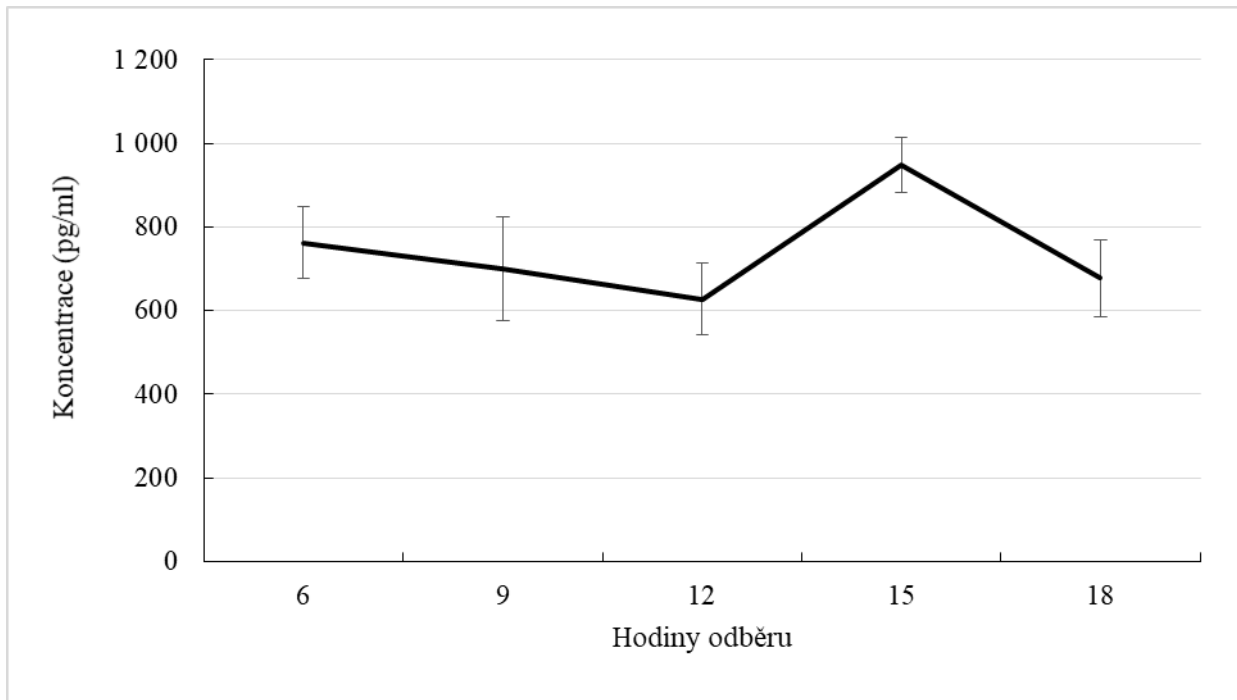
U naměřených průměrných koncentrací kortikosteronu ve slinách v jednotlivých časech nebyly mezi jednotlivými králíky zjištěny rozdíly významné rozdíly ($p > 0,05$) (graf č. 1).

Graf č. 1. Kolísání koncentrace kortikosteronu ve slinách všech šesti králíků během dne při odběrech v 6, 9, 12, 15 a 18 hodin.



V další fázi bylo sledováno kolísání hladin kortikosteronu ve slinách všech králíků v průběhu dne. Mezi hodnotami naměřenými v 12,00 a 15,00 byl významný rozdíl ($p < 0,05$) u všech šesti králíků (graf č.2).

Graf č. 2. Kolísání koncentrace kortikosteronu ve slinách králíků během dne při odběrech v 6, 9, 12, 15 a 18 hodin.



Kolísání koncentrací kortikosteronu naměřeného ve slinách u všech šesti králíků zvláště během dne ukazuje graf č. 2.

Diskuze

Jak vyplývá z našich výsledků, mezi sledovanými jedinci nedocházelo v jednotlivých časech odběrů k rozdílným v koncentracích slinného kortikosteronu. Všechny šest králíků tedy reagovalo na manipulaci (vytažení z klece a fixace z důvodu odběru slin) a následný odběr stejně. V jednotlivých časech byly patrné minimální nevýznamné odchylky v hladinách slinného kortikosteronu, kdy například v 6 hodin ráno byla nejnižší naměřená hodnota 493,18 pg/ml a nejvyšší 1 028,96 pg/ml. Rozdíly mezi jedinci jsou obvyklé, protože každý reaguje na stresovou zátěž rozdílně a velmi závisí na jeho charakteru, zkušenosti se stresem apod. (Touma and Palme, 2005). Nelze tedy jednoznačně stanovit referenční rozmezí koncentrací glukokortikoidů naměřených ve vzorcích, neboť výše hladiny závisí vždy na konkrétní situaci, konkrétních podmínkách, kde jsou zvířata umístěna a na jednotlivcích. Například hladiny kortikosteronu ve slinách králíků naměřené v naší studii jsou velmi odlišné od hladin naměřených u králíků ve studii Munari et al. (2020). Zde byly mimo jiné hodnoceny hladiny slinného kortikosteronu u ramlic v intenzivní reprodukci. Naměřené průměrné hodnoty kortikosteronu ze slin se pohybovaly v rozmezí 1036 až 2929 ng/ml, u našich králíků byly naměřené průměrné koncentrace slinného kortikosteronu v rozmezí 628 až 948 pg/ml. Tato skutečnost může být vysvětlována tím, že v naší studii se jednalo o králíky výrazně méně zatížené stresem, neboť autoři Munari et al. (2020) měli za cíl vyhodnotit nejlepší kombinaci systémů ustájení a reprodukčních rytmů. Bohužel další výzkumy zaměřující se na hladiny kortikosteronu ve slinách králíků autorům nejsou známy a nelze je porovnat se zjištěnými výsledky. Jsou známy pouze výsledky výzkumu a hladiny kortikosteronu v krvi králíků, kde se jako klidová hodnota uvádí koncentrace 15 200 pg/ml (Schoemaker and van Zeeland, 2021). Koncentrace zjištěná ve slinách by potom potvrdila domněnku, že ve slinách se

nachází zhruba 10 % koncentrace v krvi (Fell et al., 1985; Fell and Shutt, 1986; Schoemaker and van Zeeland, 2021).

Jak bylo dále zjištěno, během dne dochází ke kolísání hladiny slinného kortikosteronu. Jak potvrzují jiné studie, diurnální kolísání ve vylučování glukokortikoidů je běžné a u různých druhů je pík zaznamenán v různých časech (Gianetto et al., 2014; Hambrecht et al., 2020; Touma and Palme, 2005; Verspeek et al., 2021). Například u většiny diurnálních zvířat obvykle nastává ke konci období tmy, zatímco u primárně nočních živočichů, dochází k vrcholu sekrece na konci světelné periody (Touma and Palme, 2005). U králíků v naší studii došlo mezi 6 hodinou ranní a 18 hodinou odpolední k významnému zvýšení hladin kortikosteronu ze slin v 15 hodin. V některých případech nemusí být kolísání v hladinách glukokortikoidů během dne zaznamenáno, především pokud dojde k působení silného stresoru, který může narušit diurnální rytmus, jak ve své studii dokazuje Hambrecht et al. (2020).

Závěr

Z hlediska welfare a ochrany zdraví zvířat chovaných pro laboratorní a hospodářské účely je nutné získat co nejvíce informací o jejich reakci na stresory souvisejícími s jejich chovem, a pokusit se je přizpůsobit tak, aby odpovídaly požadavkům zvířat a zvyšovaly úroveň jejich welfare. Enzymová imunoanalýza použitá v této studii se ukázala být dostatečně citlivá k detekci hladin kortikosteronů ze slin králíků a bylo prokázáno, že koncentrace kortikosteronu v průběhu dne kolísají i bez zjevného stresového faktoru a mohou tak být dále využity ve zdokonalování této metody a také v souvislosti s podmínkami chovu králíků.

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

Literatura

- Cook, N.J., Schaefer, A.L., Lepage, P., Jones, S.M. 1996. Salivary vs. Serum cortisol for the assessment of adrenal activity in swine. *Canadian Journal of Animal Science* 76: 329-335.
- Dalmau, A., Catanese, B., Rafel, O., Rodriguez, P., Fuentes, C., Llonch, P., Mainau, E., Velarde, A., Ramón, J., Taberner, E., López-Béjar, M., Piles, M. 2015. Effect of high temperatures on breeding rabbit behaviour. *Anim. Prod. Sci.* 55: 1207.
- Fell, L.R., Shutt, D.A. 1986. Adrenocortical response of calves to transport stress as measured by salivary cortisol. *Can. J. Anim. Sci.* 66: 637-641.
- Fell, L.R., Shutt, D.A., Bentley, C.J. 1985. Development of a salivary cortisol method for detecting changes in plasma "free" cortisol arising from acute stress in sheep. *Australian Vet J* 62: 403-406.
- Finkler, H., Terkel, J. 2010. Cortisol levels and aggression in neutered and intact free-roaming female cats living in urban social groups. *Physiology & Behavior* 99: 343-347.
- Giannetto, C., Fazio, F., Assenza, A., Alberghina, D., Panzera, M., Piccione, G. 2014. Parallelism of circadian rhythmicity of salivary and serum cortisol concentration in normal dogs. *Journal of Applied Biomedicine* 12: 229-233.
- Hambrecht, S., Oerke, A.K., Heistermann, M., Dierkes, P.W. 2020. Diurnal variation of salivary cortisol in captive African elephants (*Loxodonta africana*) under routine management conditions and in relation to a translocation event. *Zoo Biology* 39: 186-196.
- Hudson, R., Maqueda, B., Velázquez Moctezuma, J., Morales Miranda, A., Rödel, H.G. 2011. Individual differences in testosterone and corticosterone levels in relation to early postnatal development in the rabbit *Oryctolagus cuniculus*. *Physiology & Behavior* 103: 336-341.
- Kinn Rød, A.M., Harkestad, N., Jellestad, F.K., Murison, R. 2017. Comparison of commercial ELISA assays for quantification of corticosterone in serum. *Scientific Reports* 7: 6748.

- Kobelt, A.J., Hemsworth, P.H., Barnett, J.L., Butler, K.L. 2003. Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. *Research in Veterinary Science* 75: 157-161.
- Mazzone, G., Vignola, G., Giammarco, M., Manetta, A.C., Lambertini, L. 2010. Effects of loading methods on rabbit welfare and meat quality. *Meat Science* 85: 33-39.
- McCobb, E.C., Patronek, G.J., Marder, A., Dinnage, J.D., Stone, M.S. 2005. Assessment of stress levels among cats in four animal shelters. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 226: 548-555.
- Munari, C., Ponzio, P., Macchi, E., Elkhawagah, A.R., Tarantola, M., Ponti, G., Mugnai, C. 2020. A multifactorial evaluation of different reproductive rhythms and housing systems for improving welfare in rabbit does. *Applied Animal Behaviour Science* 230: 105047.
- Palme, R. 2012. Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assessment in farm animals. *Animal Welfare* 21: 331-337.
- Palme, R. 2019. Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. *Physiology & Behavior* 199: 229-243.
- Prola, L., Cornale, P., Renna, M., Macchi, E., Perona, G., Mimosi, A. 2013. Effect of Breed, Cage Type, and Reproductive Phase on Fecal Corticosterone Levels in Doe Rabbits. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 16: 140-149.
- Romero, L.M. 2002. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and Comparative Endocrinology* 128: 1-24.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews* 21: 55-89.
- Schoemaker, N.J., van Zeeland, Y.R.A. 2021. Endocrine Diseases of Ferrets, in: *Ferrets, Rabbits, and Rodents*. Elsevier, pp. 77-91.
- Snyder, R.J., Perdue, B.M., Powell, D.M., Forthman, D.L., Bloomsmith, M.A., Maple, T.L. 2012. Behavioral and hormonal consequences of transporting giant pandas from china to the united states. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 15: 1-20.
- Touma, C.H., Palme, R. 2005. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1046: 54-74.
- Touma, C.H., Palme, R., Sachser, N. 2004. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Hormones and Behavior* 45: 10-22.
- Verkerk, G.A., Phipps, A.M., Carragher, J.F., Matthews, L.R., Stelwagen, K. 1998. Characterization of milk cortisol concentrations as a measure of short-term stress responses in lactating dairy cows. *Animal Welfare* 7: 77-86.
- Verspeek, J., Behringer, V., Laméris, D.W. et al. 2021. Time-lag of urinary and salivary cortisol response after a psychological stressor in bonobos (*Pan paniscus*). *Scientific Reports* 7905: 1-12.
- Volfova, M., Machovcova, Z., Schwarzenberger, F., Voslarova, E., Bedanova, I., Vecerek, V. 2019. The effects of transport stress on the behaviour and adrenocortical activity of the black-and-white ruffed lemur (*Varecia variegata*). *Acta Veterinaria Brno* 88: 85-92.

Zmeny zdravotných indikátorov welfare u mačiek v útulku ustajnených v skupine

Veronika Vojtkovská, Eva Voslářová, Vladimír Večerek

Ústav ochrany a welfare zvierat a verejného veterinárneho lékařství, FVHE VETUNI

Abstrakt

Táto štúdia sa zameriavala na dlhodobý monitoring zdravotných indikátorov welfare u populácie skupinovo ustajnených mačiek umiestnených v no-kill útulku súkromného typu v Českej republike, s cieľom vyvrátenia alebo potvrdenia hypotézy o zmene stavu mačiek (zhoršení alebo zlepšení) v priebehu pobytu v útulku. Sledovanie populácie mačiek prebiehalo počas jedného kalendárneho roka, zaznamenávanie dát prebiehalo vždy v dvojtýždennom intervale. Mačky boli hodnotené pomocou protokolu obsahujúceho 8 zdravotne orientovaných indikátorov welfare: telesná kondícia (BCS), viditeľnosť tretieho viečka, výtok z oka, iritácia oka, výtok z nosa, prítomnosť patologických zvukov, kvalita srsti, prítomnosť abnormálneho postoja a krívania. Stav mačky v každom indikátore bol ohodnotený na 5 bodovej stupnici, kde stupeň 1 reprezentoval optimálny stav a stupeň 5 závažné zhoršenie stavu v danom indikátore s výnimkou indikátora body condition, kde stupeň 3 predstavoval optimálny stav. Počas pobytu v útulku bolo zhoršenie známky v aspoň jednom z indikátorov zaznamenané u 41.6% mačiek. V rámci porovnania skóre mačiek pri prvom a poslednom hodnotení, bolo významné zlepšenie stavu zaznamenané v indikátore BCS a kvalite srsti. Najväčší počet mačiek, u ktorých sa stav v priebehu útulku zhoršil, bol spomedzi indikátorov viazucich sa k výskytu horných dýchacích ciest, zaznamenaný u indikátora výtok z oka (oproti skóre pri prijatí sa stav trvalo alebo prechodne zhoršil u 18.4% mačiek). S predlžujúcim sa pobytom mačky v útulku môže dochádzať k narušeniu welfare vplyvom stresu a vystaveniu zvierat veľkému infekčného tlaku. Ustajnenie mačiek v jednej veľkej skupine je z pohľadu nastavenia managementu k zabráneniu šírenia nákaz problematické; vytváranie menších, oddelených skupín je kľúčové. Špecifikácia podmienok vhodných pre zriadenie útulku by mala byť súčasťou právnych predpisov na ochranu zvierat v jednotlivých krajinách.

Úvod

Cieľom zariadení poskytujúcich starostlivosť o opustené a túlavé zvieratá je vo všeobecnosti okrem úspešnej adopcie čo najväčšieho počtu zvierat resp. vrátenia zvierat a jeho pôvodnému vlastníkovi i zabezpečenie dočasného umiestnenia, ktoré napĺňa požiadavky zvierat z pohľadu vhodnej výživy, ustajnenia, zdravotnej starostlivosti a ľudského kontaktu. Útulky nie sú zariadeniami, ktoré by mohli zvieratám poskytnúť vhodné zázemie z dlhodobého hľadiska a nenahrádzajú nový domov v plnej miere (Vojtkovská et al., 2020); kvalita poskytovanej starostlivosti je kritickým aspektom welfare v mnohých útulkoch (Carlstead et al., 1993). Napĺňanie prirodzených požiadaviek mačiek sa môže výrazne líšiť naprieč rôznymi typmi zariadení (Turner et al., 2012); niektoré štáty (napr. Česká republika, Rakúsko, Taliansko, Nemecko, Grécko) (Barnard et al., 2016; Arhant & Troxler, 2017; Vojtkovská et al., 2020) implementovali tzv. „no-kill“ politiku útulkov do svojich národných legislatív (pre tieto zariadenia platí, že zvieratá nie je možné utrátiť z dôvodu preplnenosti útulku resp. z dôvodu nízkej adopčnej atraktivity zvierat a pre potenciálnych osvojiteľov, čo typicky platí pre staršie a handicapované mačky (Gouveia et al., 2011)). U zvierat teda vzhľadom na dlhodobé umiestnenie v útulku hrozí narušenie kvality života, prejavujúce sa v behaviorálnych prejavoch (zvieratá môžu dlhodobo prežívať stres) a v zhoršení zdravotného stavu (Vojtkovská et al., 2020).

Faktory prostredia útulku (umiestnenie do neznámeho, niekedy na stimuly chudobného zázemia, nedostatok miesta, zmenu denného režimu, veterinárne ošetrenia, prítomnosť iných

zvierat a neznámych osôb a celkovú nedostatočnú kontrolu nad prostredím) môže mačka vnímať ako stresujúce (Amat et al., 2016; Stella et al., 2016; Vitale et al., 2019). V skorších štúdiách bola spojenosť medzi stresom a narušením imunity, ktorej dôsledkom je rozvoj alebo reaktivácia ochorenia, dobre zdokumentovaná (Pruett, 2003; Tanaka et al., 2012; Gourkow et al., 2014). Zdravotný stav mačiek však môže byť okrem pretrvávajúceho stresu ohrozený i prítomnosťou mačiek s neznámou zdravotnou históriou, zvýšená koncentrácia mačiek je spájaná so zvýšenou morbiditou (Stavisky & Adams, 2018). Z pohľadu šírenia nákaz sa vytváranie veľkých skupín, ktoré nie sú stabilné (dochádza v nich k obmenám jedincov) neodporúča (Stavisky & Adams, 2018); napriek tomu k ich vytváraniu v mnohých útulkoch dochádza hlavne z dôvodu nedostatku priestoru (Gouveia et al., 2011). Skupinové ustajnenie mačiek v útulkoch je preferovaným typom ustajnenia v mnohých štátoch a jeho pozitíva a negatíva oproti individuálnemu ustajneniu sú predmetom štúdií vedeckej komunity (Kessler & Turner, 1997; Kessler & Turner, 1999; Ottway & Hawkins, 2003; Gourkow & Fraser, 2006; Finka et al., 2014; Foster & Ijichi, 2017; Suchak & Lamica, 2018). Vzhľadom na možnosť narušenia zdravotného stavu mačiek po umiestnení do útulku, by v prípade hodnotenia welfare v zariadeniach, kde môžu byť zvieratá kvôli no-kill politike umiestnené dlhodobo, mali byť do protokolu zahrnuté adekvátne zdravotné ukazovatele (Botreau et al., 2007). Indikátory by mali byť vybrané tak, aby odrážali najčastejšie pozorovateľné príznaky narušeného zdravia vyskytujúce sa u mačiek v útulkoch (Vojtkovská et al., 2020). K frekventovane vyskytujúcim sa zdravotným problémom patria infekcie horných dýchacích ciest (URTD) (Tanaka et al., 2012; Gourkow et al., 2013), preto je vhodné zaradiť do hodnotenia prítomnosť špecifických príznakov napr. výtok z očí a nosa (Tanaka et al., 2012). Hodnotenie telesnej kondície môže poskytnúť užitočné informácie, keďže zmena telesnej hmotnosti môže indikovať závažný zdravotný problém resp. prítomnosť stresu vo všeobecnosti (Tanaka et al., 2012; Stella et al., 2013). Neadekvátna starostlivosť o srst', nedostatočná výživa, sociálne konflikty v skupine a chronické ochorenia sa odrážajú v kvalite srsti, preto je vhodné zaradiť ju k welfare indikátorom (Scott et al., 2002), rovnako ako aj neschopnosť zvierat'a normálne sa pohybovať v dôsledku zranenia alebo ochorenia (Kent et al., 2010; Bennett et al., 2012).

Prvým cieľom našej štúdie bol dlhodobý monitoring zmien vo vybraných, zdravotne orientovaných welfare indikátoroch mačiek v no-kill útulku súkromného typu, v ktorom sú zvieratá umiestnené spoločne v jednej veľkej skupine. Druhým cieľom bolo zistiť, či v priebehu pobytu mačiek v útulku dochádza k zlepšovaniu alebo k zhoršovaniu ich stavu.

Materiál a metodika

Charakteristika útulku

Zber dát pre analýzu bol realizovaný v súkromnom útulku so skupinovým ustajnením mačiek, nachádzajúcom sa v Českej republike. Útulok sa vyznačuje no-kill politikou, nakoľko utratenie zvierat'a z iných než zdravotných dôvodov nie je v Českej republike povolené podľa platnej legislatívy (zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvierat proti týraniu). Kapacita tohto zariadenia je 25 mačiek, s ročným príjmom okolo 200 zvierat. Po prijatí do útulku sú všetky mačky najprv samostatne alebo v skupine (ak boli prijaté z rovnakého zdroja) umiestnené do karanténneho zariadenia (karanténnych boxov o veľkosti 80x40x60 cm), v ktorých majú k dispozícii mačaciu toaletu, misky na potravu a vodu, hračku a peliešok. Útulok disponuje spolu 5 karanténnymi boxami. Počas karantény, ktorej dĺžka sa líši podľa potreby (úroveň zdravotného stavu konkrétneho zvierat'a, no zároveň nie je kratšia ako 5 dní), sú všetky jedince prehladnuté zmluvným veterinárnym lekárom a ošetrené (zaočkované, ošetrené proti vnútorným a vonkajším parazitom a vykastrované) ak to dovoľuje ich vek a zdravotný stav. Po absolvovaní karantény, sú mačky zaradené do jednej veľkej skupiny medzi ostatné zvieratá. K vlastnému ustajneniu slúži podlahová plocha o celkovej rozlohe 53 m²; útulok

tvoria dve miestnosti (38 m²) a vonkajšia voliéra (15m²); zmienené priestory sú navzájom prepojené. V prvej miestnosti sa nachádzajú karanténne boxy, vyšetrovací stôl a pomôcky slúžiace ku kŕmeniu a ošetrovaniu zvierat. Vo vnútorných priestoroch útulku, ktoré sú mačacím priechodom prepojené s vonkajšou voliérou sa spolu nachádza 8 mačacích toaliet, 5 misiek so suchým krmivom, 7 misiek s vodou, hračky a ďalšie objekty, do ktorých sa môžu mačky v prípade potreby skrýť alebo v nich odpočívať (pelechy a mačacie stromy). Opísané priestory, ktoré majú mačky k dispozícii nie je možné predeliť, čo útulku neumožňuje vytváranie homogénnych skupín (ustajnenie mačiek podobného veku alebo mačiek prijatých z jednej domácnosti). Výnimku tvoria mačky s mláďatami a mačky vo vysokom štádiu gravidity, pre ktoré má útulok k dispozícii samostatné priestory. Keďže je možné do tohto priestoru umiestniť iba jednu matku s potomstvom, sú z kapacitných dôvodov v prípade prijatia ďalšieho vrhu, zvieratá prevezené do iného útulku. O zvieratá sa stará jeden ošetrovateľ; okrem suchého krmiva, ktoré je stále k dispozícii, je mačkám mokré krmivo podávané 2x denne na 5 stanovištiach. Čistenie mačacích toaliet prebieha denne podľa potreby; rutinná dezinfekcia priestorov útulku prebieha 1 x za dva dni.

Hodnotenie mačiek

Na základe dostupných vedeckých poznatkov, konzultácií a predbežného skríningu prejavov zhoršeného zdravotného stavu mačiek vo vybranom útulku, bol v spolupráci s pracovníkom útulku, a veterinárnym lekárom špecializujúcim sa na medicínu mačiek vytvorený protokol pozostávajúci z 8 vizuálne hodnotiteľných, zdravotne orientovaných indikátorov welfare, odrážajúcich najčastejšie pozorovateľné príznaky zhoršeného zdravotného stavu mačiek v útulku. Za účelom zaznamenávania i menších odchýlok v stave mačiek v jednotlivých indikátoroch, bol navrhnutý 5-bodový systém, kde skóre 1 reprezentovalo najlepší možný stav, zatiaľ čo skóre 5, závažné zhoršenie stavu. V prípade indikátora hodnotiaceho úroveň telesnej kondície bola použitá 5 bodová hodnotiacia stupnica body condition score (BCS) od Shoveller et al. (2014) s optimálnym skóre 3. Bližšia špecifikácia indikátorov a opis stupňov je zhrnutý v tabuľke č. 1.

Za účelom zistenia zmien vo vybraných indikátoroch i u jedincov nachádzajúcich sa v útulku dlhšie časové obdobie, prebiehal monitoring populácie počas 12-tich kalendárnych mesiacov (zahájenie v marci 2019, ukončenie v marci 2020). Zaznamenávanie dát (vyplňanie protokolu s indikátormi u každého zvieratá), prebiehalo vždy v dvojtýždennom intervale. Známkou udelená v každom z indikátorov predstavovala známku reprezentujúcu stav mačky v danom indikátore v čase monitoringu; hodnota tejto známky nadobúdala vždy hodnotu 1 až 5. Monitorované boli vždy všetky jedince momentálne sa nachádzajúce v útulku, zber dát bol zahájený iba u novo prijatých zvierat (mačky, ktoré sa v útulku nachádzali pred zahájením zberu neboli do štúdie zahrnuté). Počas monitorovacieho obdobia bolo ohodnotených celkom 220 mačiek (všetky mačky boli ohodnotené minimálne 1 krát a to po prijatí do útulku). Maximálny počet hodnotení bol 14, žiadna mačka sa teda v útulku nenachádzala dlhšie ako 26 týždňov. Databáza útulku poskytla ku každej hodnotenej mačke dodatočné informácie týkajúce sa pohlavia, veku, plemena, dátumu prijatia a dátumu ukončenia pobytu v útulku. Monitoring zvierat vykonával pracovník útulku v spolupráci s odborníkom špecializujúcim sa na hodnotenie welfare mačiek (autor tejto štúdie).

Štatistická analýza

Získané dáta boli analyzované pomocou štatistického softwaru Unistat 6.5 for Excel (Unistat Ltd., UK). Za účelom overenia normálnej distribúcie dát bol použitý Shapiro-Wilkov test (zistená bola nepravidelná distribúcia). Rozdiely v počtoch zvierat vo vytvorených kategóriách boli analyzované χ^2 testom (kontingenčnými tabuľkami o formáte 2 x 2). Pri porovnávaní kategórií, kde počet členov presiahol 5 bola použitá Yatesova korekcia. Fisherov test sa použil v prípade, že počet členov v porovnávaných skupinách nepresiahol 5. Štatistická významnosť medzi známkami, ktoré boli mačkám udeľované v jednotlivých

indikátoroch bola testovaná neparametrickým Wilcoxonovým testom. Korelácia medzi dĺžkou pobytu (vypočítaná ako rozdiel medzi dátumom prijatia mačky do útulku a dátumom ukončenia pobytu v útulku v dňoch) a priemernými známkami vypočítanými pre každú mačku zo všetkých udelených známok v rámci pobytu v každom indikátore, bola overovaná Spearmanovým korelačným koeficientom. Tento koeficient bol použitý i v prípade overenia korelácie medzi priemernými známkami mačiek v jednotlivých indikátoroch navzájom. V prípade korelácie priemerných známok indikátora BCS s dĺžkou pobytu a ostatnými indikátormi, bola 5 bodová stupnica BCS prevedená do 3 bodového systému, kde skóre 3 predstavovalo optimálny stav, skóre 2 mierne zhoršený stav (podváha/nadváha) a skóre 1 výrazné zhoršenie stavu (výrazná podváha/obezita). Tento postup bol zvolený nakoľko stupnica BCS štandardne nemá charakter kontinua, kde najvyššia známka predstavuje najlepší alebo najhorší možný stav. Za štatisticky významnú bola považovaná hodnota $P \leq 0,05$.

Tabuľka č. 1. Hodnotiaci protokol – popis známok v jednotlivých indikátoroch.

indikátor	špecifikácia hodnotenia	skóre 1	skóre 2	skóre 3	skóre 4	skóre 5
BCS	množstvo telesného tuku	výrazná podváha	podváha	ideálna váha	nadváha	obezita
viditeľnosť tretieho viečka	intenzita viditeľnosti tretieho viečka	absentujúca	slabá	stredná	výrazná	úplné prekrytie oka tretím viečkom
výtok z oka	intenzita výtoku	bez výtoku	slabý výtok	stredne silný výtok	silný výtok	veľmi silný výtok
iritácia oka	začervenanie, opuch	bez iritácie	slabá iritácia	stredne silná iritácia	silná iritácia	veľmi silná iritácia
výtok z nosa	intenzita výtoku	bez výtoku	slabý výtok	stredne silný výtok	silný výtok	veľmi silný výtok
prítomnosť patologických zvukov	frekvencia výskytu patologických zvukov -kašeľ, kýchanie, chrčanie	bez patologických zvukov	patologické zvuky vyskytujúce sa veľmi zriedkavo	patologické zvuky vyskytujúce sa zriedkavo	patologické zvuky vyskytujúce sa často	patologické zvuky vyskytujúce sa veľmi často
kondícia srsti	kvalita srsti a stav kože	výborná kondícia	dobrá kondícia	uspokojivá kondícia	slabá kondícia	veľmi slabá kondícia
abnormálny postoj a krívanie	ľahkosť pohybu a chôdze	bez abnormálneho postoja a krívania, mačka sa pohybuje s ľahkosťou	vykazuje prítomnosť krívania alebo abnormálneho postoja	mačka vykazuje výraznú prítomnosť krívania alebo abnormálneho postoja	mačka vykazuje veľmi výraznú prítomnosť krívania alebo abnormálneho postoja	mačka je neschopná pohybovať sa v dôsledku krívania alebo abnormálneho postoja

Výsledky

Charakteristika sledovanej populácie

Počas monitoringu bolo spolu ohodnotených 220 mačiek; medián dĺžky pobytu mačiek v útulku bol 40 dní, priemer 58,9 dní. V tabuľke č. 2 je uvedený počet mačiek ohodnotených počas jednotlivých týždňov, tabuľka č. 3 uvádza charakteristiku sledovanej populácie mačiek v útulku.

Tabuľka č. 2. Počet mačiek ohodnotených v útulku počas jednotlivých týždňov hodnotenia.

počet hodnotení = zodpovedajúci počet týždňov, ktorí mačka strávila v útulku	počet mačiek, ktoré strávili v útulku daný počet týždňov	súhrnný počet mačiek, ktoré boli hodnotené minimálny uvedený počet
1 hodnotenie = 0 týždňov v útulku	82	220
2 hodnotenie = 2 týždne v útulku	43	138
3 hodnotenie = 4 týždne v útulku	39	95
4 hodnotenie = 6 týždňov v útulku	23	56
5 hodnotenie = 8 týždňov v útulku	8	33
6 hodnotenie = 10 týždňov v útulku	7	25
7 hodnotenie = 12 týždňov v útulku	5	18
8 hodnotenie = 14 týždňov v útulku	1	13
9 hodnotenie = 16 týždňov v útulku	4	12
10 hodnotenie = 18 týždňov v útulku	2	8
11 hodnotenie = 20 týždňov v útulku	1	6
12 hodnotenie = 22 týždňov v útulku	2	5
13 hodnotenie = 24 týždňov v útulku	0	3
14 hodnotenie = 26 týždňov v útulku	3	3

Tabuľka č. 3. Sledovaná populácia – charakteristika (pohlavie, vek, plemeno).

	n	%
pohlavie		
samce	87	39,5
samice	133	60,5
vek		
≤ 6 mesiacov	112	50,9
6 < x ≤ 12 mesiacov	41	18,6
1 < x ≤ 8 rokov	59	26,8
> 6 rokov	8	3,6
plemenná príslušnosť		
domáca krátkosrstá	188	85,5
domáca dlhosrstá	8	3,6
čistokrvná	24	10,9

Výsledky hodnotenia zdravotného stavu mačiek pri prijatí do útulku

Z celkového počtu 220 mačiek, malo pri prijatí zhoršený stav (známka 2 a horšia, udelená v aspoň jednom z indikátorov, resp. známka 1,2,3,4 u indikátora BCS) 120 zvierat (54,5%), 100 mačiek (45,5%) bolo pri prijatí v optimálnom stave (získalo vo všetkých indikátoroch známku 1, resp. 3 v prípade indikátora BCS).

Tabuľka č. 4 a č. 5 podáva informácie o stave mačiek pri prijatí do útulku v jednotlivých zdravotných indikátoroch. Vo všetkých indikátoroch sa počet mačiek s nezmenenou známkou pri prijatí (známka 1, resp. známka 3 u indikátora BCS) štatisticky

významne líšil ($P = 0,0000$) od počtu mačiek, ktoré mali pri prijatí do útulku zhoršenú známku (známku 2 až 5 resp. známku 1,2,4,5 u indikátora BCS).

Tabuľka č. 4. Počet mačiek so zmenenou a nezmenenou známkou po prijatí do útulku v jednotlivých zdravotných indikátoroch.

indikátor	neoptimálne skóre pri prijatí (%) *	optimálne skóre pri prijatí (%) **
BCS	83 (37.7)	137 (62.3)
viditeľnosť tretieho viečka	11 (5.0)	209 (95.0)
výtok z oka	38 (17.3)	182 (82.7)
iritácia oka	25 (11.4)	195 (88.6)
výtok z nosa	15 (6.8)	205 (93.2)
prítomnosť patologických zvukov	23 (10.5)	197 (89.5)
kondícia srsti	33 (15.0)	187 (85.0)
abnormálny postoj a krívanie	12 (5.5)	208 (94.5)

*neoptimálne skóre=známka 2-5, v prípade indikátora BCS známka 1,2,4,5

**optimálne skóre= známka 1, v prípade indikátora BCS známka 3

Tabuľka č. 5. Počet mačiek, ktoré získali konkrétne známky v jednotlivých indikátoroch pri prijatí do útulku.

indikátor	počet mačiek v individuálnych známkach pri prijatí do útulku				
	skóre 1	skóre 2	skóre 3	skóre 4	skóre 5
BCS	2 (0,9 %)	60 (27,3 %)	137 (62,3 %)	20 (9,1 %)	1 (0,5 %)
viditeľnosť tretieho viečka	209 (95,0 %)	9 (4,1 %)	1 (0,5 %)	0 (0 %)	1 (0,5 %)
výtok z oka	182 (82,7 %)	25 (11,4 %)	7 (3,2 %)	5 (2,3 %)	1 (0,5 %)
iritácia oka	195 (88,6 %)	15 (6,8 %)	6 (2,7 %)	2 (0,9 %)	2 (0,9 %)
výtok z nosa	205 (93,2 %)	10 (4,5 %)	4 (1,8 %)	1 (0,5 %)	0 (0 %)
prítomnosť patologických zvukov	197 (89,5 %)	12 (5,5 %)	10 (4,5 %)	1 (0,5 %)	0 (0 %)
kondícia srsti	187 (85,0 %)	15 (6,8 %)	17 (7,7 %)	1 (0,5 %)	0 (0 %)
abnormálny postoj a krívanie	208 (94,5 %)	4 (1,8 %)	2 (0,9 %)	2 (0,9 %)	4 (1,8 %)

Výsledky hodnotenia vývoja zdravotných indikátorov počas pobytu mačiek v útulku

Zhoršenie známky počas pobytu v útulku v aspoň jednom z indikátorov bolo zaznamenané u 52 (41,6%) zo 125 mačiek (mačky hodnotené minimálne 2 krát a zároveň tie, ktoré ukončili svoj pobyt v útulku v priebehu monitoringu). Naopak u 37 mačiek (29,6%) nedošlo počas pobytu k žiadnej zmene známky vo všetkých indikátoroch oproti známke, ktorá im bola udelená pri prijatí. 33 mačiek z 37 si počas celého pobytu vo všetkých indikátoroch udržalo optimálnu známku (známku 3 v indikátore BCS a známku 1 v ostatných indikátoroch).

Zo 125 mačiek ohodnotených minimálne 2 krát a zároveň tých, ktoré ukončili svoj pobyt v útulku počas monitoringu, bolo pri poslednom hodnotení v ideálnom stave (vo všetkých indikátoroch udelená známka 1, resp. 3 u indikátora BCS) 66 zvierat (52,8%), 59 zvierat (47,2%) získalo známku 2 alebo horšiu (resp. známku 1,2,4,5 v indikátore BCS) v aspoň jednom z indikátorov; významný rozdiel medzi počtom mačiek v optimálnom stave a zhoršenom stave teda nebol zaznamenaný ($P=0,4479$). Rovnako nebol zaznamenaný významný rozdiel ($P=0,1286$) pri porovnaní počtu mačiek, ktoré pri prijíme získali optimálnu známku ($n=53$) a mačiek, ktorých stav bol optimálny pri poslednom hodnotení ($n=66$) a pri porovnaní počtu mačiek, ktorých stav bol zhoršený na začiatku ($n=72$) a na konci pobytu ($n=59$). Počet mačiek, u ktorých sa známka zmenila (zlepšila/zhoršila), resp. nezmenila počas

pobytu v útulku v jednotlivých indikátoroch, sumarizuje tabuľka č. 6. Do hodnotenia boli zahrnuté iba mačky, ktoré boli hodnotené minimálne 2x. Z hodnotenia boli vylúčené mačky, ktoré svoj pobyt v útulku neukončili do momentu ukončenia zberu dát.

Porovnanie známok, ktoré boli mačkám udelené pri prijatí a pri poslednom hodnotení v útulku pred ukončením pobytu v jednotlivých indikátoroch, priemerné začiatkové a posledné známky v jednotlivých indikátoroch a celková priemerná známka sú zhrnuté v tabuľke č. 7.

Tabuľka č. 7. Porovnanie známok udelených mačkám pri prijatí a ukončení pobytu v útulku v jednotlivých indikátoroch.

indikátor	*priemerná známka pri prijatí do útulku ^a	*Priemerná známka pri ukončení pobytu v útulku ^b	P-hodnota ^{ab}
BCS	2,752	2,928	0,0093
viditeľnosť tretieho viečka	1,056	1,032	>0,05
výtok z oka	1,344	1,248	>0,05
iritácia oka	1,280	1,128	>0,05
výtok z nosa	1,128	1,072	>0,05
prítomnosť patologických zvukov	1,216	1,080	>0,05
kondícia srsti	1,288	1,112	0,0451
abnormálny postoj a krívanie	1,168	1,088	>0,05
celková súhrnná známka**	1,404	1,336	>0,05

* vypočítané zo zvierat, ktoré boli hodnotené minimálne 2 krát; vylúčené boli zvieratá hodnotené iba raz a zvieratá, ktoré v útulku zostali

** celková súhrnná známka = vypočítané ako priemerná známka zo známok získaných vo všetkých indikátoroch

S predlžujúcou sa dobou pobytu v útulku dochádzalo k zhoršovaniu stavu mačiek v niektorých indikátoroch; korelácie priemerných známok mačiek vypočítaných zo všetkých hodnotení v jednotlivých indikátoroch a dĺžok pobytu v útulku sú sumarizované v tabuľke č. 8. Korelácie priemerných známok medzi indikátormi sú uvedené v tabuľke č. 9.

Tabuľka č. 8. Korelácie dĺžok pobytu a priemerných známok mačiek v jednotlivých indikátoroch.

indikátor	Spearmanov korelačný koeficient	P-hodnota
BCS	-0,1187	>0,05
viditeľnosť tretieho viečka	0,0767	>0,05
výtok z oka	0,2771	0,0001
iritácia oka	0,3211	0,0000
výtok z nosa	0,1947	0,0053
prítomnosť patologických zvukov	0,2080	0,0028
kondícia srsti	0,1005	>0,05
abnormálny postoj a krívanie	0,2329	0,0008

Tabuľka č. 6. Počet mačiek, ktorým sa známka v jednotlivých indikátoroch zmenila (zhoršila alebo zlepšila; najprv zhoršila a potom zlepšila alebo najprv zlepšila a potom zhoršila) alebo nezmenila kedykoľvek počas pobytu v útulku.

indikátor	* nezmenené skóre (%) ^A	**zmena skóre (%) ^B	<i>P</i> -hodnota ^{AB}	& zlepšenie skóre (%) ^C	#zhoršenie skóre (%) ^D	<i>P</i> -hodnota ^{CD}	^a zlepšenie a následné zhoršenie skóre (%) ^E	^b zhoršenie a následné zlepšenie skóre (%) ^F	<i>P</i> -hodnota ^{EF}
BCS	73 (58,4)	52 (41,6)	0,0114	30 (2,0)	10 (8,0)	0,0010	7 (5,6)	5 (4,0)	>0,05
	2 (4), 3 (63), 4 (6)								
viditeľnosť tretieho viečka	117 (93,6)	8 (6,4)	0,0000	3 (2,4)	2 (1,6)	>0,05	1 (0,8)	2 (1,6)	>0,05
	1 (116), 2 (1)								
výtok z oka	88 (70,4)	37 (29,6)	0,0000	14 (11,2)	6 (4,8)	>0,05	2 (1,6)	15 (12,0)	0,0026
	1 (83), 2 (4), 3 (1)								
iritácia oka	98 (78,4)	27 (21,6)	0,0000	13 (10,4)	4 (3,2)	0,0445	2 (1,6)	8 (6,4)	>0,05
	1 (93), 2 (5)								
výtok z nosa	108 (86,4)	17 (13,6)	0,0000	6 (4,8)	3 (2,4)	>0,05	3 (2,4)	5 (4,0)	>0,05
	1 (106), 2 (2)								
prítomnosť patologických zvukov	102 (81,6)	23 (18,4)	0,0000	11 (8,8)	2 (1,6)	0,0227	3 (2,4)	7 (5,6)	>0,05
	1 (100), 2 (2)								
kondícia srsti	102 (81,6)	23 (18,4)	0,0000	18 (14,4)	4 (3,2)	0,0037	0 (0,0)	1 (0,8)	>0,05
	1 (98), 2 (3), 3 (1)								
abnormálny postoj a krívanie	119 (95,2)	6 (4,8)	0,0000	5 (4,0)	1 (0,8)	>0,05	0 (0,0)	0 (0,0)	>0,05
	1 (117), 2 (1), 5 (1)								

*počet mačiek, ktorým sa známka počas celého pobytu v útulku nezmenila; známka zostala rovnaká počas celého pobytu,

**počet mačiek, ktorým sa známka počas celého pobytu v útulku zmenila kedykoľvek počas pobytu oproti známke pri prijatí,

& počet mačiek, ktorým sa známka počas celého pobytu v útulku zlepšila, # počet mačiek, ktorým sa známka počas celého pobytu v útulku zhoršila,

^a počet mačiek, ktorým sa známka počas celého pobytu v útulku najprv zlepšila a potom zhoršila, ^b počet mačiek, ktorým sa známka počas celého pobytu v útulku najprv zhoršila a potom zlepšila

Tabuľka č. 9. Korelácie priemerných znáмок jednotlivých indikátorov (Spearmanov korelačný koeficient a *P*- hodnoty).

indikátor	viditeľnosť tretieho viečka	výtok z oka	iritácia oka	výtok z nosa	prítomnosť patologických zvukov	kondícia srsti	abnormálny postoj a krívanie
BCS	$r_s = -0,506$ $P > 0,05$	$r_s = -0,0094$ $P > 0,05$	$r_s = 0,0128$ $P > 0,05$	$r_s = -0,0261$ $P > 0,05$	$r_s = 0,0078$ $P > 0,05$	$r_s = -0,2137$ $P = 0,002$ 0	$r_s = 0,0670$ $P > 0,05$
viditeľnosť tretieho viečka	-	$r_s = 0,3609$ $P = 0,0000$	$r_s = 0,3233$ $P = 0,0000$	$r_s = 0,3359$ $P = 0,0000$	$r_s = 0,1018$ $P > 0,05$	$r_s = 0,171$ 2 $P = 0,013$ 7	$r_s = 0,0520$ $P > 0,05$
výtok z oka	-	-	$r_s = 0,6614$ $P = 0,0000$	$r_s = 0,4702$ $P = 0,0000$	$r_s = 0,3733$ $P = 0,0000$	$r_s = 0,208$ 2 $P = 0,002$ 6	$r_s = 0,0955$ $P > 0,05$
iritácia oka	-	-	-	$r_s = 0,3359$ $P = 0,0000$	$r_s = 0,3743$ $P = 0,0000$	$r_s = 0,134$ 4 $P > 0,05$	$r_s = 0,0402$ $P > 0,05$
výtok z nosa	-	-	-	-	$r_s = 0,5326$ $P = 0,0000$	$r_s = 0,044$ 9 $P > 0,05$	$r_s = 0,0817$ $P > 0,05$
prítomnosť patologických zvukov	-	-	-	-	-	$r_s = 0,155$ 1 $P = 0,025$ 7	$r_s = 0,0579$ $P > 0,05$
kondícia srsti	-	-	-	-	-	-	$r_s = 0,0743$ $P > 0,05$
abnormálny postoj a krívanie							

Vývoj priemerných znáмок počas pobytu v útulku, ktoré získali mačky v jednotlivých indikátoroch a počet mačiek, ktoré mali v jednotlivých hodnoteniach zhoršenú známku je sumarizovaný v tabuľke č. 10.

V indikátore BCS boli známky mačiek pri prijatí významne nižšie ako v 14. týždni ($P = 0,0463$), 16. týždni ($P = 0,0487$) a 18. týždni ($P = 0,0409$). V indikátore výtok z oka boli známky v 6. týždni ($P = 0,0450$), v 24. týždni ($P = 0,0429$) a 26. týždni ($P = 0,0429$) významne vyššie ako pri prijatí. Významne vyššie boli známky v 24. a 26. týždni oproti prijatiu ($P = 0,0061$) v indikátore iritácia oka. Znamka v 4. týždni bola významne nižšia ako pri prijatí ($P = 0,0489$) v indikátore kvalita srsti. V indikátore abnormálny postoj a krívanie sa mačkám oproti prijatiu zvýšila známka významne v 18. týždni ($P = 0,0241$), 20. týždni ($P = 0,0053$), 24. týždni ($P = 0,0332$) a 26. týždni ($P = 0,0332$).

Tabuľka č. 10. Zmeny priemerných známok udelených mačkám počas sledovaného obdobia v jednotlivých indikátoroch a počty mačiek, ktoré mali v jednotlivých hodnoteniach zhoršené známky.

	0 týždňov (220 ohodnote ných mačiek)	2 týždne (138 ohodnote ných mačiek)	4 týždne (95 ohodnoten ých mačiek)	6 týždňov (56 ohodnote ných mačiek)	8 týždňov (33 ohodnote ných mačiek)	10 týždňov (25 ohodnote ných mačiek)	12 týždňov (18 ohodnote ných mačiek)	14 týždňov (13 ohodnote ných mačiek)	16 týždňov (12 ohodnote ných mačiek)	18 týždňov (8 ohodnote ných mačiek)	20 týždňov (6 ohodnote ných mačiek)	22 týždňov (5 ohodnote ných mačiek)	24 týždňov (3 ohodnote né mačky)	26 týždňov (3 ohodnote né mačky)
BCS (priemerné skóre)	2,809	2,870	2,905	2,893	2,939	2,880	3,056	3,154	3,167	3,250	3,167	3,200	3,333	3,333
*suboptimálne skóre (%)	83 (37,7)	36 (26,1)	14 (14,7)	11 (19,6)	9 (27,3)	6 (24,0)	3 (16,6)	4 (30,7)	4 (33,3)	2 (25,0)	1 (16,6)	1 (20,0)	1 (33,3)	1 (33,3)
viditeľnosť tretieho viečka (priemerné skóre)	1,068	1,051	1,063	1,036	1,061	1,040	1,056	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
*suboptimálne skóre (%)	11 (5,0)	4 (2,9)	5 (5,2)	2 (3,6)	2 (6,1)	1 (4,0)	1 (5,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
výtok z oka (priemerné skóre)	1,264	1,275	1,232	1,357	1,303	1,200	1,167	1,231	1,333	1,375	1,167	1,400	1,667	1,667
*suboptimálne skóre (%)	38 (17,3)	29 (21,0)	18 (18,9)	17 (30,4)	10 (30,3)	5 (20,0)	3 (16,7)	3 (23,1)	4 (33,3)	2 (25,0)	1 (16,7)	2 (40,0)	2 (66,7)	2 (66,7)
iritácia oka (priemerné skóre)	1,186	1,174	1,147	1,214	1,273	1,280	1,222	1,308	1,167	1,375	1,167	1,400	1,667	1,667
*suboptimálne skóre (%)	25(11,4)	20 (14,5)	13 (13,7)	11 (19,6)	8 (24,2)	6 (24,0)	4 (22,2)	4 (30,8)	2 (16,7)	2 (25,0)	1 (16,7)	2 (40,0)	2 (66,7)	2 (66,7)
výtok z nosa (priemerné skóre)	1,095	1,094	1,095	1,054	1,030	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,333
*suboptimálne skóre (%)	15 (6,8)	11 (8,0)	9 (9,5)	2 (3,6)	1 (3,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (33,3)
prítomnosť patologických zvukov (priemerné skóre)	1,159	1,116	1,137	1,214	1,121	1,080	1,056	1,000	1,000	1,000	1,167	1,000	1,000	1,000

*suboptimálne skóre (%)	23 (10,5)	13 (9,4)	13 (13,7)	8 (14,3)	4 (12,1)	2 (8,0)	1 (5,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
lvalita srsti (priemerné skóre)	1,236	1,181	1,084	1,089	1,030	1,040	1,056	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
*suboptimálne skóre (%)	33 (15,0)	19 (13,8)	7 (7,4)	5 (8,9)	1 (3,0)	1 (4,0)	1 (5,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
abnormálny postoj a krívanie (priemerné skóre)	1,136	1,167	1,221	1,232	1,273	1,320	1,278	1,385	1,417	1,625	1,833	1,800	2,333	2,333
*suboptimálne skóre (%)	12 (5,5)	10 (7,2)	9 (9,5)	6 (10,7)	4 (12,1)	3 (12,0)	2 (11,1)	2 (15,4)	2 (16,7)	2 (25,0)	2 (33,3)	1 (20,0)	1 (33,3)	1 (33,3)

*suboptimálne skóre (%) = počet mačiek, ktoré boli ohodnotené známkou inou ako 1 resp. 3 v prípade BCS

Diskusia

K zhodnoteniu výskytu a intenzity vplyvov, ktoré môžu mať negatívny dopad na welfare zvierat je možné použiť rôzne ukazovatele; hodnotenie sa dnes zväčša orientuje na použitie parametrov fyzického a psychického zdravia (na tzv. animal – based indikátory) (Arhant et al., 2015). Hoci ucelený, validný nástroj pre hodnotenie welfare mačiek v útulku, z ktorého by bolo možné pri zostavení protokolu vychádzať, nie je momentálne k dispozícii (Vojtkovská et al., 2020), bolo použitie rôznych zdravotne orientovaných ukazovateľov (najčastejšie BCS, indikátor kvality srsti a príznakov výskytu horných dýchacích ciest) študované a opísané v publikáciách hodnotiacich kvalitu života mačiek v rôznych kontextoch (Scott et al., 2002; Tanaka et al., 2012; Arhant et al., 2015; German et al., 2017; Gilhofer et al., 2019; Zito et al., 2019). V tejto štúdii sme sa zamerali na zaznamenávanie zmien v 8 zdravotne orientovaných indikátoroch welfare (BCS, viditeľnosť tretieho viečka, výtok z oka, iritácia oka, nose výtok z nosa, prítomnosť patologických zvukov, kvalita srsti, abnormálny postoj a krívanie) u skupinovo ustajnených mačiek v no-kill útulku pomocou 5 bodovej hodnotiacej stupnice.

Z našich výsledkov vyplýva, že viac ako polovica zvierat nebola pri prijatí do útulku v optimálnom stave. Zo všetkých indikátorov, bol najväčší počet mačiek v zhoršenom stave zistený v indikátore BCS – 28,2% prijatých mačiek bolo podvyživených, 9,1% mačiek malo naopak miernu nadváhu. Optimálny BCS malo 62,3% mačiek, čo je podobný výsledok ako ten, ktorý vo svojej štúdii opísali Marston a Bennett (2009) - 70,6 % mačiek prijatých do útulku bolo v optimálnej kondícii. Tanaka et al. (2012) zaznamenali pokles váhy u 62% mačiek v priebehu 2. týždňa v útulku; toto zistenie sa nepotvrdilo v našom prípade – naopak v druhom týždni bolo oproti prijatiu zaznamenané zvýšenie priemernej známky BCS. Presné určovanie telesnej hmotnosti však v našom prípade na rozdiel štúdie od Tanaka et al. (2012), neprebiehala, subtílné zmeny telesnej hmotnosti teda vzhľadom na zvolenú metodiku (5 bodovú hodnotiacu stupnicu BCS) nebolo možné monitorovať. Aby bolo možné zmenu danou stupnicou zaznamenať, muselo u mačiek dôjsť k zmene množstva telesného tuku asi o 7%, keďže približne toto percento reprezentuje rozdiel medzi jednotlivými stupňami (Shoveller et al., 2014). Štatisticky významné zvýšenie bolo zaznamenané pri porovnaní známok, ktoré získali mačky pri prvom a poslednom hodnotení pred ukončením pobytu v útulku, čo naznačuje výrazné zlepšenie fyzickej kondície mačiek. Na druhej strane však v priebehu pobytu došlo k trvalému zhoršeniu telesnej kondície u 8% mačiek, u ďalších 9,6% mačiek došlo k prechodnej zmene telesnej hmotnosti – najprv teda k zlepšeniu a následne k zhoršeniu stavu, alebo naopak. U zvierat ustajnených v skupine môže byť monitoring, či každá mačka prijala dostatočné množstvo potravy problematické; počet zdrojov (v tomto prípade misiek s potravou) sa odporúča prispôbiť počtu mačiek plus poskytnúť jeden navyše (pravidlo $n+1$, kde n predstavuje počet mačiek) (Westropp & Buffington, 2004). V útulku, kde zber dát prebiehal nebolo toto odporúčanie uplatnené. K ďalším faktorom negatívne ovplyvňujúcim príjem potravy môže patriť prítomnosť pasívnej agresivity medzi jedincami, kedy dochádza k situácii, že si zvieratá navzájom bránia v prístupe k zdrojom (Vojtkovská et al. 2020); tie je teda nutné rozmiestniť na rôzne stanovištia v rámci ustajňovacej jednotky. V nami vybranom útulku mali zvieratá k dispozícii 5 miest, na ktorých sa vždy nachádzali misky so suchou potravou, mokrú potravu bola mačkám poskytovaná na ďalších 5 stanovištiach 2 krát denne. V zariadeniach, kde nie je distribúcia rozdielnych typov potravy rovnomerná môže dôjsť k odlišnostiam v stavbe krmenej dávky u zvierat, ktoré sa k zdroju dostanú vždy a u zvierat, ktoré k nemu majú obmedzený alebo žiadny prístup keďže im v ňom bránia iné jedince. Nie iba sociálne konflikty ale stres vo všeobecnosti súvisí so zníženým príjmom potravy u mačiek (Stella et al., 2013). U väčšiny zvierat však dochádza k jeho znižovaniu s predlžujúcim sa pobytom v útulku (mačky sa na prostredie útulku adaptujú zvyčajne v priebehu 2-5 týždňov) (Kessler and Turner, 1999). Domnievame sa, že stres vyvolaný umiestnením do nového prostredia, mohol hrať úlohu u tých zvierat, u ktorých došlo k zhoršeniu fyzickej kondície prvých pár týždňov po prijatí do útulku, pravdepodobne už ale nehral významnú rolu u tých zvierat, u ktorých sa objavilo zhoršenie stavu po týždňoch pobytu (teda zvierat u ktorých sa predpokladá vyšší stupeň adaptácie na prostredie ako u práve prijatých mačiek). Na druhej strane, mačky vnímajú a reagujú na stresujúce stimuly veľmi odlišne (Stella and Croney, 2019); v prípade pôsobenia chronického stresu sa zmena vo fyzickej

kondícii môže prejavíť až po dlhšom čase. Zníženie hmotnosti môže byť okrem stresu a neadekvátnej výživy spôsobené i zdravotnými problémami, napr. výskytom infekcie horných dýchacích ciest (URTD), ktorá predstavuje častý zdravotný problém objavujúci sa u mačiek v útulkoch (Bannasch and Foley, 2005), prejavujúci sa dobre pozorovateľným komplexom príznakov (zvyčajne zahŕňajúcich výtok z oka, z nosa a prítomnosť patologických zvukov spojených s dýchaním). Korelácia medzi priemernými známkami BCS a priemernými známkami v indikátoroch výtok z nosa, iritácia oka, výtok z nosa, prítomnosť patologických zvukov sa ale nepotvrdila, hoci u niektorých zvierat sa zníženie skóre BCS vyskytlo súčasne so zvýšením skóre v zmienených indikátoroch. Tento výsledok sa zhoduje so zisteniami Tanaka et al. (2012); autori zmienujú, že zníženie hmotnosti nebolo priamo spojené s rozvojom URTD, hoci tendencia rozvoja URTD bola u mačiek s vysokou úrovňou stresu, ktorá spôsobila zníženie príjmu potravy, 5,6 krát vyššia ako u mačiek s nízkou úrovňou stresu.

Stres predstavuje rizikový faktor k rozvoju infekcie, pretože môže inhibovať produkciu protilátok slizníc, najmä imunoglobulínu A (S-IgA) (Gourkow et al., 2014). Medzi pôvodcov spôsobujúcich URTD patrí najčastejšie felinný kalicivírus (FCV) a felinný herpesvírus-1 (FHV-1), *Bordetella bronchiseptica*, *Chlamydophila felis* a *Mycoplasma* species sa uplatňujú v menšej miere (kniha útulky). Indikátory výtok z oka, iritácia oka, výtok z nosa, prítomnosť patologických zvukov boli zahrnuté do hodnotiaceho protokolu pretože predstavovali najbežnejšie spozorované príznaky u mačiek v útulku. Spomedzi týchto indikátorov, vykazoval pri prijatí do útulku najväčší počet mačiek výtok z oka (zaznamenaný bol u 17,3% mačiek). Trend zmien priemerných známok v indikátoroch iritácia oka, výtok z nosa, prítomnosť patologických zvukov naznačuje mierne zlepšenie stavu do dvoch týždňov od prijatia, čo mohlo byť spôsobené umiestnením jedincov po prijatí do karantény, kde prebiehala liečba zvierat, ktoré vykazovali príznaky ochorenia. Po absolvovaní karantény boli jedince zaradené do skupiny medzi ostatné mačky. Hoci očkovanie mačiek proti kaliciviróze a herpesvírusu v útulku prebiehalo rutinne, je nutné brať do úvahy, že v prípade herpesvírusu nie je vakcinácia schopná ochrániť mačku pred infekciou virulentného kmeňa vírusu (Day et al., 2016); platí, že vírus prechádza do latentnej formy a môže byť reaktivovaný v období stresu. Reaktivovaný vírus teda môže vyvolať klinické príznaky i u vakcinovaných zvierat alebo byť vylučovaný. Očkovanie proti kaliciviróze nezabráni infekcii, hoci v mnohých prípadoch dokáže zmierniť závažné príznaky. Existencia mnohých kmeňov kalicivírusu bola potvrdená (Radford et al., 1998), s mierne prebiehajúcim ochorením sa preto môžeme stretnúť i u vakcinovaných zvierat. Keďže medzi mačkami v skupine dochádza k priamemu fyzickému kontaktu, zdieľaniu spoločných priestorov, toaliet, misiek na potravu a vodu je prenos infekcií veľmi pravdepodobný. Bolo zistené, že iba 4 % mačiek vylučuje herpesvírus pri príchode do útulku; po týždni sa jeho vylučovanie zistilo až u 52 % mačiek, v prípade kalicivírusu u 15 % mačiek (Pedersen et al., 2004). K zhoršeniu stavu v indikátoroch viažucich sa na URTD došlo v priebehu pobytu v útulku u 8,8 – 18,4 % mačiek v závislosti od indikátora (najväčší počet mačiek, u ktorých došlo k zhoršeniu známky bol zaznamenaný u indikátora výtok z oka, najmenší u indikátora výtok z nosa), čo naznačuje trend vzájomného prenosu a rozvoja infekcie v nami sledovanej populácii.

Viditeľnosť tretieho viečka nie je u mačiek fyziologická; zvyčajne sa objavuje z dôvodu výskytu očného, neurologického alebo systémového ochorenia (Mitchell, 2012); abnormálna protrúzia sa môže prejavíť na oboch alebo iba na jednom oku. Zatiaľ čo očný problém sa zvyčajne vyskytuje na jednom z očí, sa systémové ochorenie zvyčajne prejaví na oboch očiach. Viditeľnosť tretieho viečka môže byť subtílnym ukazovateľom zhoršeného stavu u mačiek - môže sa vyskytnúť napr. v súvislosti so zníženom hmotnosti alebo dehydratáciou (Mitchell, 2012), čo sa však v našom prípade nepotvrdilo (korelácia medzi viditeľnosťou tretieho viečka a BCS nebola zistená). Podobne ako predchádzajúce indikátory, sa však môže i tento príznak viazať k výskytu URTD – tretie viečko môže byť viditeľné z dôvodu zápalu očných spojiviek (Stiles, 2014); korelácia medzi viditeľnosťou tretieho viečka a príznakmi URTD (výtok z oka, iritácia oka a výtok z nosa) sa v našej štúdii potvrdila. Viditeľnosť očného viečka sa objavila u 11 prijatých mačiek do útulku, u 9 mačiek bola spozorovaná mierna viditeľnosť, u 1 mačky stredná viditeľnosť. U 1 mačky bol zaznamenaný úplné prekrytie oka – táto mačka uhynula v dôsledku kalicivirózy. U 1 mačky nebola zaznamenaná zmena skóre v priebehu pobytu v útulku, u 3 mačiek došlo k trvalému zlepšeniu skóre, u 2 mačiek k trvalému zhoršeniu; u 3

mačiek došlo k prechodnému zlepšeniu, resp. zhoršeniu. Zvyšné dve mačky umreli na kalicivírózu krátko pred druhým hodnotením. Príčinou objavenia sa tretieho viečka bola u väčšiny mačiek URTD, u jednej mačky sa spoločne s viditeľnosťou tretieho viečka objavili nešpecifické príznaky ako apatia a zvracanie, u inej bolo príčinou ochorenie oka. Tretie viečko sa tiež objavilo u mačky, ktorej bola diagnostikovaná vlhká forma infekčnej peritonitídy.

Stav srsti môže byť ovplyvnený radom faktorov – kvalitou potravy, chronickým ochorením, výskytom sociálnych konfliktov a zmenami normálneho správania – nedostatočnou alebo naopak prehnanou starostlivosťou o srst' (Little, 2012). Veľkosť skupiny sa zdá byť prepojená s kvalitou srsti mačiek, súvislosť bola naznačená v rámci štúdie v útulku (Arhant et al., 2015) i v kontexte hodnotenia welfare ferálnych mačiek v kolóniách (Gilhofer et al., 2019). Súvislosť dlhšej doby pobytu v útulku so zvýšením percentom mačiek, u ktorých sa objavila zhoršená kvalita srsti, popísali Arhant et al., (2015); v našej štúdiu sa však korelácia medzi kvalitou srsti a dĺžkou pobytu v útulku nepotvrdila. Len 15 % (n=33) zvierat nemalo pri prijatí optimálny stav srsti; viac ako polovici z týchto mačiek bolo udelené skóre 3. Toto percento je nižšie ako bolo zistené v štúdiu od Zito et al. (2019), čo však možno vysvetliť tým, že zmienená štúdia bola zameraná na monitoring ferálnych mačiek, zatiaľ čo do nami vybraného útulku boli prijímané mačky i od súkromných chovateľov. Počet prijatých mačiek od majiteľov je neznámy; ako už bolo zmienené, informácie o pôvode mačiek databáza útulku neobsahovala. U väčšiny mačiek, ktoré boli do útulku prijaté so zníženým skóre sa však kvalita srsti zlepšila, zistený bol významný pokles pri porovnaní známok udelených mačkám na pri prvom a poslednom hodnotení. Toto zistenie môže reflektovať príjem kvalitnej potravy, poukazovať na adekvátnu veterinárnu starostlivosť v útulku (aplikácia antiparazitárnych prípravkov, liečba ďalších problémov súvisiacich so stavom srsti a kože), no i na malý výskyt vážnych sociálnych konfliktov v skupine. Hoci sledovanie interakcií medzi mačkami nebolo predmetom našej štúdie, v priebehu monitoringu neboli v populácii zjavné výrazné konflikty vedúce k priamemu boju, ktorých dôsledkom by bolo poškodenie povrchu kože. K trvalému zhoršeniu kvality srsti z iných príčin ale došlo v priebehu pobytu v útulku u 4 mačiek, k prechodnému zhoršeniu u 1 mačky. U všetkých 5 mačiek sa súčasne so zhoršenou kvalitou srsti vyskytli i iné zdravotné problémy – URTD a nešpecifické príznaky ako hnačka a apatia. Korelácia kvality srsti s výtokom z oka, s prítomnosťou patologických zvukov a s viditeľnosťou tretieho viečka sa potvrdila; podobnú súvislosť naznačuje aj štúdia od Gilhofer et al. (2019), kde sa u polovice mačiek so zhoršenou kvalitou srsti vyskytovali i príznaky URTD.

Abnormálny postoj a krívanie bol ďalším zo sledovaných indikátorov; väčšina mačiek (94,5 %) prijatých do útulku nevykazovala známky zhoršenia pohyblivosti. U takmer všetkých mačiek, ktorých skóre bolo pri prijatí zhoršené (teda iné ako 1) sa stav zlepšil, čo bolo výsledkom nasadenia liečby resp. chirurgického ošetrovania po prijatí (príčinou problémov s pohyblivosťou boli zväčša úrazy). Trvalé zhoršenie stavu bolo zaznamenané iba u jedného zvieratá; šlo o mačku s neurologickými problémami prejavujúcimi sa nekoordinovaným pohybom a abnormálnym postojom. Stav tejto mačky sa v priebehu pobytu v útulku zhoršoval a neskôr uhynula. U dvoch ďalších mačiek sa zhoršený stav pri prijatí, v priebehu pobytu nezmenil - u prvej mačky bol problém s pohyblivosťou spôsobený vrodenou neurologickou vadou, v druhom prípade šlo o ľahké krívanie z dôvodu staršieho zranenia panvovej končatiny. Korelácia medzi indikátorom abnormálny postoj a krívanie a ostatnými indikátormi sa nezistila; podľa TerWee et al. (1997) však existuje súvislosť medzi krívaním a URTD, nakoľko niektoré kmene kalicivírusu môžu u infikovaných mačiek vyvolať bolesťou sprevádzané krívanie. Zistená však bola závislosť medzi abnormálnym postojom a krívaním a dĺžkou pobytu mačky v útulku; mačky so zhoršeným skóre strávili v útulku dlhšiu dobu, čo možno vysvetliť zníženým adopčným potenciálom týchto mačiek. Zdravotný stav zvieratá je jedným z významných faktorov ovplyvňujúcich adopčné preferencie potenciálnych osvojiteľov (Vitulova et al., 2019).

Celkovo došlo v priebehu pobytu v útulku k zhoršeniu stavu v aspoň jednom z indikátorov až u 41,6 % mačiek (n=52); k zmene stavu nedošlo u 29,6 % mačiek (n=37) (mačky, ktoré si od príjmu až po ukončenie pobytu zachovali rovnaké skóre vo všetkých indikátoroch bez ohľadu na to, či bolo optimálne alebo nie), z toho si 33 mačiek zachovalo optimálne známky vo všetkých indikátoroch. Zistený bol kolísavý trend zmien priemerných známok v indikátoroch výtok z oka, iritácia oka, výtok

z nosa, prítomnosť patologických zvukov, ktorý potvrdzuje zlepšovanie a zhoršovanie stavu mačiek v priebehu pobytu v útulku. Pri porovnaní celkovej súhrnnej známky mačiek (priemernej známky zo známok získaných vo všetkých indikátoroch pri prvom a poslednom hodnotení) pri prijatí a pred ukončením pobytu v útulku nebol zistený významný rozdiel, hoci pri porovnaní udelených známok pri prijatí a ukončení pobytu v jednotlivých indikátoroch, bolo významné zlepšenie stavu zaznamenané v indikátore BCS a kvalita srsti. Domnievame sa, že toto zistenie do istej miery odráža skladbu indikátorov, ktoré boli do hodnotiaceho protokolu začlenené – 4 indikátory z 8 sa priamo viazali k príznakom URTD. V týchto indikátoroch neboli zmeny v známkach, udelených mačkám na začiatku a na konci hodnotenia významné, čo sa podpísalo na celkovom hodnotení. Niektoré potenciálne vhodné indikátory, ktoré by mohli doplniť celkový obraz o vývoji zdravotného stavu, ale nebolo možné do protokolu zahrnúť, vzhľadom ku ustajneniu mačiek vo veľkej skupine. Medzi významné indikátory viažuce sa k zhoršeniu zdravotného stavu patria napr. ukazovatele súvisiace s elimináciou (hnačka, príznaky ochorenia dolných močových ciest) (German et al., 2017; Westropp et al., 2006). Zvieratá v skupine spoločne zdieľali toalety, čo znemožňuje identifikáciu konkrétnych jedincov s problémom. Navyše, kontrola vybraného jedinca, u ktorého existuje podozrenie na výskyt problému, môže byť značne náročná, keďže mačky často odmietajú eliminovať, keď sú rušené (McGowan et al., 2017) (napr. ak sú pod stálym dohľadom človeka).

Podstatným výsledkom našej štúdie je zistenie pozitívnej korelácie medzi dĺžkou pobytu mačky v útulku a známkami reprezentujúcimi zdravotný stav mačiek. Tento poznatok potvrdzuje teóriu zvyšujúceho sa rizika narušenia welfare pri dlhodobom pobyte zvieratá v útulku (Turner et al., 2012). Ten je typický v zariadeniach, v ktorých nie je možné (z dôvodu dodržania legislatívy alebo z ideologického dôvodu) nechcené, resp. nadbytočné, no inak zdravé zvieratá utratiť. Úsilie útulkov by preto malo byť v čo najväčšej možnej miere orientované na posilňovanie faktorov, ktoré skrátiť pobyt na minimum s výsledkom úspešnej adopcie resp. vrátenia zvieratá pôvodnému majiteľovi. V prípade, že zariadenie nemá z dôvodu nedostatku priestoru možnosť selektovať zvieratá a vytvárať menšie stabilné celky, čo bol i prípad zariadenia v našej štúdii, je ustajnenie veľkého počtu mačiek v skupine rizikovým faktorom prospievajúcim k rozvoju a šíreniu nákaz (Stavisky & Adams, 2018) i napriek dôslednej karanténizácii prijatých jedincov. V Českej republike nie sú do právnych predpisov týkajúcich sa ochrany zvierat a veterinárnej starostlivosti zahrnuté špecifické požiadavky týkajúce sa vybavenia, usporiadania a chodu útulkov, k dispozícii sú iba odporúčania, ktoré však nie sú právne vymáhateľné. Zariadenia teda môžu byť prevádzkované i v priestoroch, ktoré nie sú z nálezového hľadiska optimálne prispôbené pre chod útulku. V zariadení, v ktorom monitoring populácie prebiehal, napríklad nebola karanténna časť útulku úplne oddelená od ostatných priestorov, do ktorých mali mačky mimo karantény prístup, čím sa jej efektivita značne stráca. Z hľadiska prežívania patogénov sa zdali problematické i ďalšie časti útulku (napr. nevhodne zvolený, neumývateľný povrch vo voliére alebo zložito členený, resp. preplnený vlastný ubytovací priestor, tvorený množstvom úkrytov z rôznych materiálov). Hoci tieto aspekty prostredia naplňujú behaviorálne potreby mačiek a pomáhajú znižovať stres (Van der Leij et al., 2019), na strane druhej, sťažujú sanitáciu a neumožňujú udržiavanie vysokého hygienického štandardu, ktorý je v prípade skupinového ustajnenia veľkého počtu zvierat mimoriadne dôležitý. Patogény sa tak môžu v prostredí vyskytovať dlhodobo napr. v prípade felinného parvovírusu alebo napr. oocýst izospóry aj mesiace až roky (Möstle et al., 2013).

Hoci primárnym cieľom tejto štúdie bolo overiť hypotézu meniaceho sa skóre zdravotného stavu mačiek v útulkoch, počas zberu dát sme mali i možnosť overiť praktickosť 5-bodovej hodnotiacej stupnice. Jej použitie sa v priebehu monitoringu javilo ako výhodné, pretože ňou bolo možné v hodnotení zohľadniť i malé zmeny stavu v danom indikátore. Na druhej strane bol proces rozhodovania sa medzi jednotlivými stupňami občas problematický - to platilo hlavne pre indikátory výtok z oka, iritácia oka a výtok z nosa. Za účelom nastavenia rovnakého počtu stupňov u všetkých indikátorov, bola u hodnotenia BCS namiesto 9–bodovej, zvolená 5 bodová hodnotiaca stupnica, pretože jej použitie je oproti 9 bodovej stupnici praktickejšie. Na druhej strane sú však rozdiely medzi stupňami väčšie, čo neumožňuje monitoring malých zmien. Celkovou nevýhodou hodnotenia animal-based indikátorov je ich subjektivita (Kessler and Turner, 1997); v našej štúdii hodnotili mačky 2

evaluátori, z ktorých jeden bol priamym zamestnancom útulku. Zapojenie osoby, ktorá je priamo zodpovedná za starostlivosť o zvieratá do hodnotenia, je výhodné, pretože táto osoba má o zmenách stavu u zvierat najlepší prehľad. Účasť ďalších (preškolených no neustranných) osôb je ale potrebná, aby nedochádzalo k skresľovaniu výsledkov.

Limitáciou tejto štúdie je skutočnosť, že sledovanie vplyvu dlhodobého pobytu v útulku na zmeny v zdravotných ukazovateľoch mohlo byť ovplyvnené nízkym počtom mačiek zostávajúcich v útulku dlhšie ako 2 týždne – hoci bolo možné pri prijatí ohodnotiť všetky zvieratá, do porovnávacích analýz bolo možné zahrnúť iba mačky, ktoré boli ohodnotenú minimálne 2 krát a viac (teda zvieratá, ktoré strávili v útulku 2 a viac týždňov). Iba 3 mačky zostali v útulku po dobu 26 týždňov (boli ohodnotenú 14 krát, čo bol najvyšší počet hodnotení zaznamenaný v našej štúdií); zber dostatočného počtu dát, ktoré by vypovedali o vplyve dlhodobého umiestnenia mačky v útulku na zmeny v indikátoroch môže byť problematický, keďže väčšina zvierat ukončí svoj pobyt v útulku skôr.

Záver

Mačky prijímané do útulkov často vykazujú rôzne známky zhoršeného stavu, v našej štúdií sa to týkalo viac ako polovice prijatých mačiek. V rozpore s možným očakávaním, že zdravotný stav mačiek sa počas pobytu v útulku vzhľadom na zaistenie ošetrovania, veterinárnej starostlivosti, krmiva, tepelného komfortu bude jednoznačne zlepšovať, došlo naopak v priebehu pobytu v útulku k zhoršeniu stavu v aspoň jednom z indikátorov až u 41% mačiek. Podmienky v útulku môžu byť aj napriek zaisteniu základných potrieb pre mačky stresujúce, čo sa môže premietnuť z dlhodobého hľadiska aj do ich zdravotného stavu. Navyše ustajnenie mačiek v jednej veľkej skupine môže byť problematické z pohľadu zabránenia šíreniu nákaz, hoci pri porovnaní priemernej známky udelenej mačkám na začiatku a na konci hodnotenia v indikátoroch viažucich sa k výskytu URTD sa zmena známky štatisticky neprejavila.

Táto štúdia bola finančne podporená projektom ITA VETUNI (Projekt č. 2021ITA22).

Literatúra

- Amat, M., Camps, T., Manteca, X. 2016. Stress in owned cats: behavioral changes and welfare implications. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 18: 577-586. doi: 10.1177/1098612X15590867
- Arhant, C., Troxler, J. 2017. Is there a relationship between attitudes of shelter staff to cats and the cats' approach behavior? *Applied Animal Behaviour Science* 187: 60-68. doi: 10.1016/j.applanim.2016.11.014
- Arhant, C., Wogritsch, R., Troxler, J. 2015. Assessment of behavior and physical condition of shelter cats as animal-based indicators of welfare. *Journal of Veterinary Behavior* 10:399-406. doi: 10.1016/j.jveb.2015.03.006
- Bannasch, M.J., Foley J.E. 2005. Epidemiologic evaluation of multiple respiratory pathogens in cats in animal shelters. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 7: 109-119. doi: 10.1016/j.jfms.2004.07.004
- Barnard, S., Pedernera, C., Candeloro, L., Ferri, N., Velarde, A., Dalla Villa, P. 2016. Development of a new welfare assessment protocol for practical application in long-term dog shelters. *Veterinary Record* 178: 18. doi:10.1136/vr.103336
- Bennett, D., Zainal Ariffin, S.M.B., Johnston P. 2012. Osteoarthritis in the cat: 1. How common is it and how easy to recognize? *Journal of Feline Medicine and Surgery* 14:65-75. doi: 10.1177/1098612X11432828
- Botreau, R., Veissier I., Butterworth, A., Bracke, B.M.B., Keeling, L.J. 2007. Definition of criteria for overall assessment of animal welfare. *Animal Welfare* 16:225–228.
- Carlstead, K., Brown, J.L., Strawn, W. 1993. Behavioral and physiological correlates of stress in laboratory cats. *Applied Animal Behavior Science* 38: 143-158. doi: 10.1016/0168-1591(93)90062-T
- Day, M.J., Horzinek, M.C., Schult, R.D., Squires, R.A. 2016. WSAVA guidelines for the vaccination of dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice* 57: E1. doi: 10.1111/jsap.2_12431

- Finka, L.R., Ellis, S.L., Stavisky, J.A. 2014. Critically appraised topic (CAT) to compare the effects of single and multi-cat housing on physiological and behavioral measures of stress in domestic cats in confined environments. *BMC Veterinary Research* 10: 1-12. doi: 10.1186/1746-6148-10-73
- Foster, S., Ijichi, C. 2017. The association between infrared thermal imagery of core eye temperature, personality, age and housing in cats. *Applied Animal Behavior Science* 189: 79-84. doi: 10.1016/j.applanim.2017.01.004
- German, A.C., Cunliffe, N.A., Morgan, K.L. 2017. Faecal consistency and risk factors for diarrhea and constipation in cats in UK rehoming shelters. *Journal of Feline Medicine Surgery* 19: 57-65. doi:10.1177/1098612X15610370
- Gilhofer, E.M., Windschnurer, I., Troxler, J., Heizmann, V. 2019. Welfare of feral cats and potential influencing factors. *Journal of Veterinary Behavior* 30: 114-123. doi: 10.1016/j.jveb.2018.12.012
- Gourkow, N., Fraser, D. 2006. The effect of housing and handling practices on the welfare, behavior and selection of domestic cats (*Felis silvestris catus*) by adopters in an animal shelter. *Animal Welfare* 15: 371-377.
- Gourkow, N., LaVoy, A., Dean, G.A., Phillips, C.J. 2014. Associations of behavior with secretory immunoglobulin A and cortisol in domestic cats during their first week in an animal shelter. *Applied Animal Behaviour Science* 150: 55-64. doi: 10.1016/j.applanim.2013.11.006
- Gourkow, N., Lawson, J.H, Hamon, S.C, Phillips, C.J.C. 2013. Descriptive epidemiology of upper respiratory disease and associated risk factors in cats in an animal shelter in coastal western Canada. *Canadian Veterinary Journal* 54: 132-138.
- Gouveia, K., Magalhães, A., De Sousa, L. 2011. The behavior of domestic cats in a shelter: residence time, density and sex ratio. *Applied Animal Behaviour Science* 130: 53-59. doi: 10.1016/j.applanim.2010.12.009
- Kent, M., Platt, S.R., Schatzberg, S.J. 2010. The neurology of balance: function and dysfunction of the vestibular system in dogs and cats. *Veterinary Journal* 185: 247-258. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.10.029
- Kessler, M.R, Turner, D.C. 1999. Socialization and stress in cats (*Felis silvestris catus*) housed singly and in groups in animal shelters. *Animal Welfare* 8:15-26.
- Kessler, M.R, Turner, D.C. 1997. Stress and adaptation of cats (*Felis silvestris catus*) housed singly, in pairs and in groups in boarding catteries. *Animal Welfare* 6: 243-254.
- Kessler, M. R., Turner, D. C. 1999. Effects of density and cage size on stress in domestic cats (*Felis silvestris catus*) housed in animal shelters and boarding catteries. *Animal Welfare*, 8: 259-267.
- Little, S.E. 2012. *The Cat*. Elsevier Saunders. St. Louis.
- Marston, L.C., Bennett, P.C. 2009. Admissions of cats to animal welfare shelters in Melbourne, Australia. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 12: 189-213. doi: 10.1080/10888700902955948
- McGowan, R.T., Ellis, J.J., Bensky, M.K., Martin, F. 2017. The ins and outs of the litter box: A detailed ethogram of cat elimination behavior in two contrasting environments. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 194: 67-78. doi: 10.1016/j.applanim.2017.05.009
- Mitchell, N. 2012. Third eyelid protrusion in dogs and cats. *Veterinary Ireland Journal* 2: 205-209.
- Möstl, K., Egberink, H., Addie, D., Frymus, T., Boucraut-Baralon, C., Truyen, U., Horzinek, M.C. 2013. Prevention of infectious diseases in cat shelters: ABCD guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 15: 546-554. doi: 10.1177/1098612X13489210
- Ottway, D.S., Hawkins, D.M. 2003. Cat housing in rescue shelters: a welfare comparison between communal and discrete-unit housing. *Animal Welfare* 12: 173-189.
- Pedersen, N.C., Sato, R., Foley, J.E., Poland, A.M. 2004. Common virus infections in cats, before and after being placed in shelters, with emphasis on feline enteric coronavirus. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 6: 83-88. doi: 10.1016/j.jfms.2003.08.008
- Pruett, S.B. 2003. Stress and the immune system. *Pathophysiology* 9: 133–153. doi: 10.1016/S0928-4680(03)00003-8
- Radford, A.D., Turner, P.C., Bennett, M., McArdle, F., Dawson, S., Glenn, MA, Williams R.A., Gaskell, R.M. 1998. Quasispecies evolution of hypervariable region of the feline calicivirus capsid

gene in cell culture and in persistently infected cats. *Journal of General Virology* 79: 1-10. doi: 10.1099/0022-1317-79-1-1

Scott, K.C., Levy, J.K., Gorman, S.P., Newell, S.M. 2002. Body condition of feral cats and the effect of neutering. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 5: 203-213. doi: 10.1207/S15327604JAWS0503_04

Shoveller, A.K, DiGennaro, J., Lanman, C., Spangler, D. 2014. Trained vs untrained evaluator assessment of body condition score as a predictor of percent body fat in adult cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 16: 957-965. doi: 10.1177/1098612X14527472

Stavisky, J., Adams, W. 2018. Principles of infectious disease and transmission. In: Dean, R., Roberts, M., Stavisky, J. (Eds.): *BSAVA Manual of Canine and Feline Shelter Medicine. Principles of Health and Welfare in a Multi-animal Environment*, British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, pp. 101-111.

Stella, J., Croney, C., Buffington, T. 2013. Effects of stressors on the behavior and physiology of domestic cats. *Applied Animal Behavior Science* 143: 157-163. doi: 10.1016/j.applanim.2012.10.014

Stella, J., Croney, C., Buffington, T. 2014. Environmental factors that affect the behavior and welfare of domestic cats (*Felis silvestris catus*) housed in cages. *Applied Animal Behaviour Science* 160: 94-105. doi: 10.1016/j.applanim.2014.08.006

Stella, J., Croney, C. 2019. Coping styles in the domestic cat (*Felis silvestris catus*) and implications for cat welfare. *Animals* 9: 370. doi: 10.3390/ani9060370

Stiles, J. 2014. Ocular manifestations of feline viral diseases. *Veterinary Journal* 201: 166-173. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.11.018

Suchak, M., Lamica, J.A. 2018. Comparison of cats (*Felis silvestris catus*) housed in groups and single cages at a shelter: a retrospective matched cohort study. *Animals* 8: 29. doi: 10.3390/ani8020

Tanaka, A., Wagner, D.C., Kass, P.H., Hurley, K.F. 2012. Associations among weight loss, stress, and upper respiratory tract infection in shelter cats. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 240: 570-576. doi: 10.2460/javma.240.5.570

TerWee, J., Lauritzen, A.Y., Sabara, M., Dreier, K.J., Kokjohn, K. 1997. Comparison of the primary signs induced by experimental exposure to either a pneumotrophic or a 'limping' strain of feline calicivirus. *Veterinary Microbiology* 56: 33-45. doi: 10.1016/S0378-1135(96)01344-2

Turner, P., Berry, J., MacDonald, S. 2012. Animal shelters and animal welfare: raising the bar. *Canadian Veterinary Journal* 53: 893-896.

Van Der Leij, W.J.R., Selman, L.D.A.M., Vernooij, J.C.M., Vinke, C.M. 2019. The effect of a hiding box on stress levels and body weight in Dutch shelter cats; a randomized controlled trial. *PloS One* 14: e0223492. doi: 10.1371/journal.pone.0223492

Vitale, K.R, Behnke, A.C., Udell, M.A.R. 2019. Attachment bonds between domestic cats and humans. *Current Biology* 29: R864-R865. doi: 10.1016/j.cub.2019.08.036

Vitulova, S., Voslarova, E., Vecerek, V., Bedanova, I., Volfova, M. 2019. The health of shelter dogs and its impact on their adoption. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 132: 325-333.

Vojtkovská, V., Voslářová, E., Večerek, V. 2020. Methods of assessment of the welfare of shelter cats: a review. *Animals* 10: 1527. doi: 10.3390/ani10091527

Westropp, J.L., Buffington, C.A. 2004. Feline idiopathic cystitis: current understanding of pathophysiology and management. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 34: 1043-1055. doi: 10.1016/j.cvsm.2004.03.002

Westropp, J.L., Kass, P.H., Buffington, C.A.T. 2006. Evaluation of the effects of stress in cats with idiopathic cystitis. *American Journal of Veterinary Research* 67: 731-736. doi:10.2460/ajvr.67.4.731

Zito, S., Walker, J., Gates, M.C., Dale, A. 2019. A preliminary description of companion cat, managed stray cat, and unmanaged stray cat welfare in Auckland, New Zealand using a 5-component assessment scale. *Frontiers in Veterinary Science* 6: 40. doi: 10.3389/fvets.2019.00040

Zmeny sociability mačiek v útulku

Veronika Vojtkovská¹, Eva Voslářová¹, Vladimír Večerek¹, Lenka Tomečková²

¹Ústav ochrany a welfare zvierat a verejného veterinárneho lékařství, FVHE VETUNI, ČR,

²Klinika verejného veterinárneho lékařstva a ochrany zvierat, Univerzita veterinárskeho lékařstva a farmácie v Košiciach, SR

Abstrakt

Táto štúdia bola realizovaná za účelom dlhodobého monitoringu zmien v sociabilite skupinovo ustajnených mačiek voči ošetrovateľovi v súkromnom útulku. Sociabilita sledovanej populácie mačiek bola hodnotená v dvojtýždňovom intervale v priebehu jedného kalendárneho roka. Celkovo 158 zvierat bolo ohodnotených 5 bodovou stupnicou, ktorej jednotlivé stupne predstavovali úroveň sociability (1-veľmi priateľská mačka až 5-veľmi nepriateľská mačka). Hodnotenie prebiehalo vizuálnym sledovaním reakcie mačiek na priblíženie a kontakt človeka. Pri prvom hodnotení vykazovala viac ako tri štvrtina mačiek (81%) veľmi priateľské (skóre 1) alebo priateľské správanie (skóre 2). Z 88 mačiek, ktoré boli ohodnotenú minimálne dvakrát a zároveň ukončili svoj pobyt v útulku počas monitorovacieho obdobia, nedošlo u 56 mačiek (63,6%) počas pobytu v útulku k žiadnej zmene skóre (k zhoršeniu ani k zlepšeniu). Medzi mačkami, u ktorých bola zaznamenaná zmena, došlo u významne vyššieho počtu mačiek ($P < 0,001$) počas pobytu v útulku k trvalému zlepšeniu skóre ako k jeho trvalému zhoršeniu (26 (29,5%) a 3 (3,4%)). K prechodnému zlepšeniu resp. zhoršeniu skóre došlo u 3 mačiek (3,4%). Zlepšenie skóre sociability počas pobytu v útulku sa týkalo predovšetkým mačiek, ktorých správanie bolo pri prvom hodnotení označené za neutrálne (skóre 3), nepriateľské (skóre 4) alebo veľmi nepriateľské (skóre 5). Dĺžka pobytu v útulku (LOS) korelovala s mierou sociability mačiek pri prvom ($r_{\text{tau}} = 0,72$, $P < 0,001$) i poslednom hodnotení ($r_{\text{tau}} = 0,23$, $P = 0,007$), LOS ale sama nepredikovala mieru sociability ($P > 0,05$). Bolo zistené, že miera sociability pri prvom hodnotení bola prediktorom pre mieru sociability pri poslednom hodnotení ($P < 0,001$). Výsledky našej štúdie naznačujú, že v priebehu pobytu v útulku dochádza u mačiek k zlepšovaniu sociability voči známej osobe. Hoci sa ukazuje, že mačky s nižšou úrovňou sociability zostávajú v útulku dlhšiu dobu, vplyvom zlepšovania môže dochádzať k zvyšovaniu ich adopčného potenciálu. Podpora programov pre zvyšovanie sociability mačiek je potrebná a je vhodné jej venovať pozornosť v ďalšom výskume.

Úvod

Hodnotenie welfare v útulkoch, obzvlášť v tých, kde môžu byť zvieratá vplyvom národných právnych predpisov (napr. v Českej republike, Rakúsku, Taliansku) držané i dlhšie časové obdobie je témou, ktorá priťahuje pozornosť (Arhant et al., 2015). V týchto krajinách nie je možné zvieratá utraťiť z dôvodu preplnenia útulku. Zvieratá, ktoré nie sú z útulkov adoptované v krátkom čase, v nich teda môžu zotrvať rôzne dlhú dobu. V rakúskych útulkoch bol medián doby pobytu mačiek v útulku 2 mesiace (Arhant et al., 2011), podobne dlhú dobu strávia v útulku do adopcie i mačky v Českej republike (medián 69 dní) (Kubesová et al., 2017). Bolo však zistené, že až štvrtina mačiek v rakúskych útulkoch zostáva v útulku dlhšie ako jeden rok (Arhant et al., 2011). Dlhší pobyt v útulku sa týka najmä zvierat so zníženým adopčným potenciálom, medzi ktoré možno zaradiť i staršie zvieratá; v Českej republike bol medián dĺžky pobytu mačiek nad 6 rokov až 296 dní (Vojtkovská et al., 2019). Bez ohľadu na dĺžku pobytu, je zvieratám umiestneným v útulku, nevyhnutné zabezpečiť zázemie, v ktorom by negatívne faktory, napr. stres, mali byť minimalizované.

Množstvo predchádzajúcich prác zdokumentovalo súvislosť medzi stresom a umiestnením mačky do útulku (napr. Stella et al., 2011; Tanaka et al., 2012; Vinke et al., 2014). Jedným zo spôsobov ako odhaliť prebiehajúcu stresovú reakciu je stanovenie hladiny špecifických produktov, ktoré sú v organizme prítomné v dôsledku narušenia rovnováhy vnútorného prostredia. Stres je však okrem zmien v hladinách týchto látok zväčša manifestovaný i v behaviorálnej rovine (Stella et al., 2013). Okrem inhibície normálneho správania, ktoré sa zvyčajne prejavuje znížením frekvencie

explorácie prostredia, hravého správania, eliminácie, snahami o útek a ukrytie sa, odmietaním potravy a nedostatočnou starostlivosťou o srst', môže byť indikátorom stresu i absencia alebo negatívna odpoveď na interakciu iniciovanú človekom (Casey and Bradshaw, 2005). U mačiek je dokumentovaná široká variabilita v behaviorálnych prejavoch indikujúcich stres. Odpoveď na stres sa okrem prostredia odvíja i od temperamentu mačky, ktorý je ovplyvnený genetikou, prostredím (Réale and Dingemans, 2012) a rannými skúsenosťami (Amat et al., 2016). Vysoká úroveň stresu môže viesť k nesprávnemu označeniu vystrašenej mačky v útulku, ktorá by za normálnych okolností bola priateľská k neznámym ľuďom, za ferálnu (Slater et al., 2010), v dôsledku čoho môže dôjsť k jej vypusteniu do pôvodného prostredia alebo k eutanázii (v krajinách, kde sú mačky s nízkou šancou na adopciu utrácané).

K testovaniu ochoty kontaktu mačky s človekom sa v súčasnosti uplatňuje viacero prístupov zväčša založených na sledovaní a následnom hodnotení reakcie mačky na človeka na škálach, kde jednotlivé stupne reprezentujú mieru ochoty kontaktu (Kessler and Turner, 1999; Kry and Casey, 2007; Marston and Bennett, 2009; Stella et al., 2014; Arhant and Troxler, 2017). Nakoľko bolo zistené, že u väčšiny mačiek dochádza s predlžujúcim sa pobytom v útulku k redukcii stresu a k navyknutiu si na nové prostredie v priebehu 2 až 5 týždňov (Rochlitz et al., 1998) bol cieľom našej štúdie dlhodobý monitoring zmien v ochote kontaktu s človekom u skupinovo ustajnených mačiek. Je známe, že k výraznej redukcii stresu u mačiek dochádza najmä v prvých dňoch po prijatí do útulku, to znamená v čase, kedy sú zvieratá umiestnené v karanténe. Zaujímalo nás, aký stupeň sociability ale budú zvieratá vykazovať k ošetrovateľovi po čase strávenom v karanténe, počas ktorej si mali možnosť aspoň čiastočne navyknúť na manipuláciu človekom a po zaradení do skupiny medzi ostatné zvieratá a či a do akej miery bude zmena v sociabilite mačiek pokračovať počas ďalšieho časového obdobia stráveného v útulku.

Materiál a metodika

Charakteristika útulku

Za účelom realizácie štúdie a zberu dát bola nadviazaná spolupráca so súkromným útulkom v Českej republike. Zvieratá boli v tomto zariadení ustajnené skupinovo. Kapacita útulku je 25 mačiek – nakoľko zariadenie nedisponuje možnosťou predelenia priestoru a vytvárania menších skupín mačiek, sú všetky zvieratá ustajnené spoločne v 1 veľkej skupine. Výnimku tvoria mačky s mačatami a mačky vo vysokom štádiu gravidity, pre ktoré má útulok vyhradené samostatné priestory. Vybrané zariadenie uplatňuje politiku, ktorá neumožňuje utraťiť zvieratá z iných ako zdravotných dôvodov (toto nastavenie vyplýva z národných právnych predpisov na ochranu zvierat v Českej republike). Po prijatí do útulku sú zvieratá umiestnené do karanténnych boxov o veľkosti 40x80x60 cm, v ktorých majú k dispozícii misku na potravu a vodu, pelech a toaletu s podstielkou. Počas trvania karantény sú mačky prehliadnuté zmluvným veterinárnym lekárom a ak to dovoľuje ich vek a zdravotný stav, ošetrované (zaočkované, ošetrované proti vnútorným a vonkajším parazitom a vykastované). Dĺžka karantény je individuálna u každej mačky, priemerná dĺžka karantény mačiek, zahrnutých do štúdie bola 14 dní. Po skončení karantény sú mačky umiestnené do skupiny k ostatným zvieratám; k vlastnému ustajneniu slúži podlahová plocha o celkovej rozlohe 53 m². Útulok tvoria 2 navzájom prepojené miestnosti; v prvej miestnosti sú umiestnené karanténne boxy, druhá miestnosť je mačacím priechodom prepojená s vonkajšou voliérou. Obe miestnosti a voliéra sú vybavené miskami na potravu a vodu, mačacími toaletami, úkrytmi a stromami na šplhanie. O zvieratá sa stará 1 ošetrovateľ. V čase zberu dát nepoužíval útulok u novo prijatých zvierat žiaden formálny hodnotiaci protokol, ktorý by slúžil k diskriminácii socializovaných od nesocializovaných mačiek.

Hodnotenie mačiek

K hodnoteniu vývoja miery ochoty kontaktu k pozorovateľovi počas pobytu mačky v útulku bola použitá modifikovaná 5 bodová škála vychádzajúca zo stupnice Kesslera and Turnera (1997), kde stupeň 1 predstavoval najlepší možný stav (priateľská mačka) a stupeň 5 najhorší možný stav (nepriateľská mačka). Bližšia špecifikácia jednotlivých stupňov je uvedená v tabuľke č. 1.

Tabuľka č. 1. Opis hodnotiacej stupnice, ktorá bola použitá pri hodnotení mačiek (Kessler and Turner, 1997, modifikované).

Skóre	Špecifikácia skóre
1 – mačka je veľmi priateľská	Mačka aktívne iniciuje kontakt s človekom v prípade priblíženia sa.
2 – mačka je priateľská	Mačka reaguje neutrálne v prípade priblíženia sa ale v prípade kontaktu reaguje priateľsky pradením/ otieraním sa / olizovaním.
3 – mačka reaguje neutrálne – ani priateľsky ani nepriateľsky	Mačka reaguje neutrálne (ani pozitívne ani negatívne) keď je človek nablízku i v prípade snahy o fyzický kontakt.
4 – mačka reaguje nepriateľsky	Mačka reaguje neutrálne (ani pozitívne ani negatívne) keď je človek nablízku, v prípade snahy o fyzický kontakt reaguje negatívne syčaním/vrčaním/pokusmi o uhryznutie.
5 - mačka reaguje veľmi nepriateľsky	Mačka reaguje negatívne (vyhnutím sa kontaktu a snahou o útek) v prípade že je človek nablízku.

Pravidelné hodnotenie mačiek vykonával 1 vyškolený pozorovateľ, ktorý bol s mačkami v opakovanom kontakte i počas dní, kedy boli mačky umiestnené v karanténe. Aby bolo možné zhodnotiť vývoj ochoty kontaktu mačiek k pozorovateľovi z dlhodobého hľadiska, bolo hodnotenie mačiek realizované v dvojtýždennom intervale. Hodnotenie prebiehalo vždy v rovnakom čase v rámci kontroly zvierat (ráno (9:00) a večer (19:00) – známky oboch pozorovaní boli spriemerované a zaokrúhlené tak aby bolo výsledkom celé číslo) a zároveň mimo návštevných hodín útulku, keďže prítomnosť ďalších osôb by mohla ovplyvniť správanie zvierat. Zvieratá neboli v čase hodnotenia kŕmené alebo inak vyrušované (napr. asanáciou prostredia alebo záujemcami o adopciu). Zber dát prebiehal 12 kalendárnych mesiacov a bol zahájený len u novo prijatých mačiek (maximálny počet hodnotení bol 14, žiadna mačka nebola hodnotená viac ako 14 krát). Ohodnotených bolo spolu 158 mačiek; do hodnotenia neboli zahrnuté mačky mladšie ako 12 týždňov. Prvé hodnotenie prebiehalo nasledujúci deň po skončení karantény (medzi ukončením karantény a prvým hodnotením bol vždy rozstup o dĺžke minimálne 12 hodín). Procedúra hodnotenia mačiek zahŕňala priblíženie sa k mačke pomalým, plynulým pohybom na vzdialenosť asi 1 meter a natiahnutie ruky smerom k hlave mačky. Dodatočné informácie týkajúce sa pohlavia, veku, plemena, dĺžky pobytu mačiek v útulku a spôsobu ukončenia pobytu boli získané z online databázy útulku, ktorý súhlasil s poskytnutím týchto údajov.

Štatistická analýza

χ^2 test, Wilcoxonov test

χ^2 test a Wilcoxonov test boli prevedené v štatistickom programe Unistat 6.5 for Excel (Unistat Ltd., UK). Najprv bola otestovaná normalita získaných dát Shapiro-Wilkovým testom. χ^2 test (kontingenčné tabuľky o formáte 2 x 2 a k x m) bol použitý k analýze rozdielov v počte zvierat vo vytvorených skupinách mačiek podľa získaného skóre (1-5) v rámci prvého hodnotenia. Tento test bol tiež použitý v prípade porovnania počtu mačiek, u ktorých v priebehu pobytu došlo a nedošlo k zmene skóre a pri porovnaní počtu mačiek, ktorým sa skóre v priebehu pobytu v útulku zhoršilo a zlepšilo. Štatistická významnosť medzi známkami, ktoré boli mačkám udelené pri prvom a poslednom hodnotení bola testovaná neparametrickým Wilcoxonovým testom. Za štatisticky významnú bola považovaná hodnota $P \leq 0.05$.

Korelačná analýza, logistická regresia

Korelačná analýza a logistická regresia boli vykonané v štatistickom programe Jamovi (verzia 1.6, Sydney, Austrália). Vzhľadom na charakter dát (5 bodová stupnica) a na absenciu normality boli použité neparametrické analýzy. Neparametrický korelačný koeficient Tau Kendall bol zvolený k overeniu vzťahu medzi vybranými premennými (pohlavie, vek, stupeň sociability pri prvom a poslednom hodnotení, dĺžka pobytu v útulku – vypočítaná v dňoch ako rozdiel medzi dátumom

príjmu a ukončenia pobytu v útulku). Logistická regresia bola zvolená k overeniu dĺžky pobytu v útulku ako prediktora úrovne sociability pri poslednom hodnotení. P hodnota $\leq 0,05$ bola považovaná za ukazovateľ štatistickej významnosti.

Výsledky

Charakteristika sledovanej populácie

Do útulku bolo počas celého kalendárneho roka prijatých 220 zvierat, 62 zvierat bolo z hodnotenia vyradených z dôvodu nízkeho veku (menej ako 3 mesiace) a z dôvodu ukončenia pobytu v útulku ešte pred zaradením do skupiny medzi ostatné mačky. Minimálne raz bolo ohodnotených všetkých 158 mačiek, minimálne dvakrát bolo ohodnotených 101 mačiek. Medián dĺžky pobytu mačiek v útulku (bez ohľadu na spôsob ukončenia pobytu v útulku) bol 37 dní, priemerne strávili zvieratá v útulku 60 dní. Charakteristika sledovanej populácie mačiek (n=158) je uvedená v tabuľke č. 2.

Tabuľka č. 2. Charakteristika sledovanej populácie (pohlavie, vek, osud, plemeno).

	n	%
pohlavie		
samec	58	36,7
samica	100	63,3
vek		
$3 < x \leq 6$ mesiacov	61	38,6
$6 < x \leq 12$ mesiacov	38	24,1
$1 < x \leq 8$ rokov	52	32,9
> 8 rokov	7	4,4
spôsob ukončenia pobytu v útulku		
adopcia	123	77,8
úhyn/eutanázia	20	12,7
vypustenie do lokality odchyty	1	0,6
vrátenie majiteľovi	1	0,6
zostalo v útulku	13	8,2
plemenná príslušnosť		
domáca krátkosrstá	133	84,2
domáca dlhosrstá	6	3,8
čistokrvná	19	12,0

Hodnotenie úrovne sociability mačiek pri prvom hodnotení a v priebehu pobytu v útulku

χ^2 test, Wilcoxonov test

Zo všetkých zvierat, ktoré boli ohodnotenú aspoň raz (n=158), bolo pri prvom hodnotení známku veľmi priateľská mačka (skóre 1) ohodnotených 88 mačiek (55,7%), priateľských mačiek (skóre 2) bolo 40 (25,3%), 16 mačiek (10,1%) reagovalo na človeka neutrálne (ani pozitívne, ani negatívne), 12 mačiek (7,6%) bolo označených za nepriateľské (skóre 4). Iba s dvoma mačkami (1,3 %) nebol kontakt vôbec možný, preto boli označené za veľmi nepriateľské (skóre 5). Pri prvom hodnotení bolo zaznamenaných významne viac ($P < 0,001$) mačiek priateľských a veľmi priateľských ako mačiek, ktoré na človeka reagovali neutrálne, nepriateľsky alebo veľmi nepriateľsky.

Z 88 mačiek, ktoré boli ohodnotenú minimálne dvakrát a zároveň ukončili svoj pobyt v útulku počas monitorovacieho obdobia, nedošlo u 56 mačiek (63,6%) počas pobytu v útulku k žiadnej zmene skóre (k zhoršeniu ani k zlepšeniu). 41 mačiek (73,2%) si zachovalo počas celého pobytu v útulku skóre 1, 11 mačiek (19,6%) skóre 2, 2 mačiek (3,6%) skóre 3, 2 mačky (3,6%) skóre 4. Ani jedna mačka si počas celého pobytu v útulku nezachovala známku 5.

K zmene skóre kedykoľvek počas pobytu v útulku došlo u 32 mačiek (36,4%). U významne vyššieho počtu mačiek teda počas pobytu v útulku k zmene skóre nedošlo ($P < 0,001$). Medzi

mačkami, u ktorých bola zaznamenaná zmena, došlo u významne vyššieho počtu mačiek ($P < 0,001$) počas pobytu v útulku k trvalému zlepšeniu skóre ako k jeho trvalému zhoršeniu (26 (29,5%) a 3 (3,4%)). Väčšinu z mačiek (17 z 26 mačiek), u ktorých došlo počas pobytu v útulku k trvalému zlepšeniu skóre tvorili zvieratá správajúce sa k človeku pri prvom hodnotení neutrálne (skóre 3), nepriateľsky (skóre 4) alebo veľmi nepriateľsky (skóre 5). Trvalé zlepšenie skóre bolo u 20 mačiek z 26 zaznamenané v rámci druhého hodnotenia, u 6 mačiek došlo k zlepšeniu skóre neskôr (u 3 mačiek bolo zlepšenie zaznamenané v rámci 3 hodnotenia, u 1 mačky v rámci 4, u ďalšej v rámci 5 hodnotenia a u jednej až v rámci 6 hodnotenia). K prechodnému zlepšeniu resp. zhoršeniu skóre došlo u 3 mačiek (3,4%).

Priemerné skóre, ktoré mačky získali pri prvom hodnotení bolo vyššie ako priemerné skóre pri poslednom hodnotení (1.898 a 1.568), rozdiel známok prvého a posledného hodnotenia bol významný ($P < 0,001$). Znamky prvého a posledného hodnotenia, ktoré získali iba nepriateľské mačky (skóre 3, 4 alebo 5 pri prvom hodnotení) sa líšili významne ($P < 0,001$), avšak rozdiel medzi známkami prvého a posledného hodnotenia priateľských mačiek (skóre 1 alebo 2 pri prvom hodnotení) nebol významný ($P > 0,05$).

Korelačná analýza

Výsledky korelačnej analýzy sú uvedené v tabuľke č. 3. Úroveň sociability mačiek pri poslednom hodnotení súvisela s dĺžkou pobytu v útulku ($r_{\text{tau}} = 0,23$, $P = 0,007$) a s úrovňou sociability pri prvom hodnotení ($r_{\text{tau}} = 0,72$, $P < 0,001$). Úroveň sociability nesúvisela s vekom ($r_{\text{tau}} = 0,01$, $P > 0,05$) ani s pohlavím ($r_{\text{tau}} = 0,09$, $P > 0,05$). Čím vyššia bola úroveň sociability pri prvom hodnotení, tým vyššia bola jej úroveň pri poslednom hodnotení a naopak. Čím dlhší bol pobyt mačky v útulku, tým vyššia bola úroveň sociability pri poslednom hodnotení a naopak.

Tabuľka č. 3. Výsledky korelačnej analýzy.

	Sociabilita (posledné hodnotenie)	Sociabilita (prvé hodnotenie)	Dĺžka pobytu	Vek	Pohlavie
Sociabilita (posledné hodnotenie)	-				
Sociabilita (prvé hodnotenie)	0.72***	--			
Dĺžka pobytu	0.23**	0.26**	-		
Vek	0.01	0.01	-0.11	-	
Pohlavie	0.09	0.16	0.10	-	-
				0.17	

pozn.: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

Regresná analýza

Keďže vzťah medzi úrovňou sociability a dĺžkou pobytu mohol byť ovplyvnený úrovňou sociability mačiek pri prvom hodnotení alebo charakterom sledovanej populácie, rozhodli sme sa zohľadniť tieto premenné prostredníctvom komplexnejšieho modelu logistickej regresie. Do prvého bloku sme zahrnuli skóre sociability mačiek prvého hodnotenia, vek a pohlavie mačky. Do druhého bloku bola zahrnutá aj dĺžka pobytu.

Vo výsledkoch bolo zaznamenané významné zlepšenie oproti nulovému modelu, keď bola zahrnutá úroveň sociability mačiek v prvom hodnotení, vek a pohlavie. Tento model predstavoval 43 % rozptylu premennej ($R^2N=0,43$; odchýlka = 104,30; $AIC=116,30$). Úroveň sociability mačiek pri prvom hodnotení ($p < 0,001$) predpovedala sociabilitu pri poslednom hodnotení na rozdiel od veku alebo pohlavia ($P > 0,05$) (tabuľka 4).

Tabuľka č. 4. Koeficienty prvého bloku.

prediktor	odhad	95% Interval spoľahlivosti		SE	Z	P	miera pravdepodobnosti
		dolný	horný				
vek	-0,13	-0,71	0,43	0,29	-0,46	0,645	0,88
pohlavie 1 – 0	-0,35	-1,61	0,92	0,64	-0,54	0,586	0,71
úroveň sociability pri prvom hodnotení	2,08	1,46	2,84	0,35	5,98	<0,001	8,04

Podobne došlo k výraznému zlepšeniu zhody oproti nule, keď bola dĺžka pobytu zahrnutá do druhého bloku [$\chi^2(4)=63,16$, $P < 0,001$] (tabuľka č. 5). Model predstavoval 44 % rozptylu premennej ($R^2_N = 0,44$; odchýlka = 103,48; AIC = 117,48). Rozdiely medzi prvým a druhým blokom boli zanedbateľné a štatisticky nevýznamné ($\chi^2(1)=0,83$, $P=0,264$). Rozhodujúce je, že pri kontrole úrovne sociability pri prvom hodnotení, veku a pohlavia, nebola dĺžka pobytu štatisticky významným prediktorom. V súlade s predchádzajúcou analýzou, čím vyššie bolo skóre na škále sociability v prvom hodnotení, tým vyššie bolo skóre na škále sociability v poslednom hodnotení.

Tabuľka č. 5. Koeficienty druhého bloku.

prediktor	odhad	95% Interval spoľahlivosti		SE	Z	P	miera pravdepodobnosti
		dolný	horný				
vek	-0,13	-0,71	0,43	0,29	-0,47	0,641	0,87
pohlavie 1 – 0	-0,35	-1,61	0,93	0,64	-0,54	0,587	0,71
úroveň sociability pri prvom hodnotení	2,21	1,52	3,05	0,39	5,73	<0,001	9,14
dĺžka pobytu v útulku	-0,00	-0,01	0,00	0,00	-0,88	0,380	1,00

Diskusia

Cieľom tejto štúdie bolo preskúmať vývoj sociability mačiek v priebehu pobytu v útulku vo vzťahu k ošetrovateľovi a vzhľadom na skutočnosť, že pred začiatkom sledovania už zvieratá v útulku strávili určitý čas v karanténe počas ktorej sa mali možnosť adaptovať na prítomnosť a manipuláciu človekom. Výsledky poukazujú na skutočnosť, že napriek tomu, že zvieratá absolvovali v útulku aklimatizačné obdobie v podobe karantény, ktorá trvala v priemere 14 dní, dochádzalo vplyvom ich ďalšieho pobytu k zvyšovaniu úrovne sociability. Tento jav sa ukázal ako platný hlavne v prípade mačiek, ktoré pri prvom hodnotení vykazovali k hodnotiacej osobe neutrálne, nepriateľské alebo veľmi nepriateľské správanie. Počet týchto zvierat bol významne nižší (19 % zo všetkých zvierat, ktoré boli ohodnotené aspoň 1 krát) ako počet mačiek, ktoré sa pri prvom hodnotení javili ako priateľské alebo veľmi priateľské, no zároveň zhodný ako v prípade austrálskej štúdie od Marston and Bennett (2009), ktorí uvádzajú 18.7 % do útulku prijatých nepriateľských mačiek k ľuďom. Hoci sú výsledky tejto a našej štúdie takmer identické, je na nich nutné nahliadať opatrne nakoľko boli zvieratá v našej štúdii hodnotené prvýkrát až po absolvovaní karantény, zatiaľ čo austrálska štúdia

dokumentuje výsledky úrovne sociability mačiek 24 hodín po prijatí do útulku. Každopádne je pri interpretácii výsledkov získaných v tejto štúdií možné brať do úvahy viaceré faktory.

Jedným z týchto faktorov je, ako už bolo uvedené, absolvovanie karantény pred prvým hodnotením, počas ktorej mohlo dôjsť k návyku na ošetrovateľa a na zníženie stresu spôsobeného prijatím do útulku vo všeobecnosti. Predchádzajúce výskumné aktivity zamerané na zostavenie protokolu, ktorého cieľom bolo diskriminovať medzi socializovanými a nesocializovanými mačkami (Slater et al., 2013) brali do úvahy iba trojdňovú periódu, počas ktorej boli zvieratá sledované a počas ktorých sa očakávalo, že ak bola mačka predtým priateľská k ľuďom, sa táto črta prejaví v dôsledku zníženia intenzity stresu z prijatia do útulku a čiastočného návyku na nové prostredie. 3 dňové sledovanie bolo zvolené na základe prieskumnej štúdie, ktorá ukázala, že polovica (prevažne amerických) útulkov drží zvieratá vo svojich zariadeniach aspoň 3 dni (Slater et al., 2010). Hoci bola v štúdií od Slater et al. (2013) brané do úvahy iba pomerne krátke sledovacie obdobie, neznamená to, že v priebehu ďalších dní k znižovaniu stresu nedochádza. Kessler and Turner (1997) študovali zmeny správania 140 mačiek počas dvoch týždňov pomocou hodnotiacej stupnice Cat Stress Score. Z výsledkov vyplynulo, že hoci bolo významné zníženie úrovne stresu mačiek zaznamenané už po prvých štyroch dňoch, dve tretiny mačiek sa prispôbili do dvoch týždňov strávených v útulku. Až 5 týždňové adaptačné obdobie mačiek umiestnených v karanténe bolo dokumentované v štúdií od Rochlitz et al. (1998). Reakcia mačky na človeka a schopnosť adaptácie úzko súvisí i s jej individuálnym temperamentom (v literatúre sa možno stretnúť i s inými pojmami – napr. osobnosť alebo copingový štýl (Travnik et al., 2020); rôzne pojmy však označujú rovnaký koncept, ktorý možno definovať ako prítomnosť individuálnych rozdielov v správaní, ktoré sú stabilné v čase a v odlišných kontextoch (Stamps and Groothuis, 2010; Hudson et al., 2015)), ktorého vývoj závisí na genetike a vplyvoch prostredia (Travnik et al., 2020) kam možno zaradiť aj socializáciu voči človeku. Socializačné obdobie mačiat je viazané na konkrétne senzitivné obdobie; mláďatá ktoré prešli procesom socializácie medzi druhým až dvanástym týždňom života sa k ľuďom správali priateľskejšie na rozdiel od mláďat, ktoré socializované neboli (McCune, 1995). Veľké percento priateľských mačiek pri prvom hodnotení zistených v našej štúdií teda mohlo byť potenciálne spôsobené i prijatím veľkého počtu predtým socializovaných zvierat do útulku. V rámci tejto štúdie sme však nemali k dispozícii dáta, ktoré by odkazovali na pôvod mačiek; okolnosti prijatia do útulku by však mohli pomôcť pri interpretácii výsledku, nakoľko sa javí podstatné, či sa mačka dostala do útulku po tom, čo ju tam umiestnil jej pôvodný majiteľ alebo bola odchytená v pôvodnom prostredí napr. v rámci realizácie kastrovacieho programu (Marston and Bennett, 2009).

Je pravdepodobné (hoci to nebolo predmetom tejto štúdie a ďalší výskum v tejto oblasti je potrebný), že reakcie mačiek k pozorovateľovi mohli do významnej miery odrážať skúsenosti s touto osobou nadobudnuté počas karantény. Zdravotný stav mačiek (napr. vnímanie bolesti) môže vyvolať negatívnu reakciu voči človeku (Mills et al., 2020), rovnako opakované podstupovanie liečebných procedúr vnímajú mačky negatívne (Mariti et al., 2016) a to najmä ak sú spojené s fixáciou a bolesťou, čo môže narušiť vzťah s danou osobou. Bolo zistené, že zvieratá sú pravdepodobne schopné zapamätať si osobu, ktorá im spôsobila utrpenie (Marzluff et al., 2010).

V priebehu pobytu v útulku nedošlo u viac ako polovice mačiek k žiadnej zmene skóre; najviac mačiek sa počas celého pobytu v útulku správalo veľmi priateľsky (skóre 1) alebo priateľsky (skóre 2). Len 2 mačky sa správali počas celého pobytu v útulku k ošetrovateľovi neutrálne, a 2 mačky zostali nepriateľské (skóre 4). Obe tieto mačky však boli ohodnotené iba dva krát, pretože krátko po druhom hodnotení uhynuli v dôsledku kalicivirózy. Vzhľadom ku krátkej dobe pobytu týchto mačiek v útulku nie je možné s určitosťou odhadnúť, či boli nepriateľské reakcie mačiek spôsobené nízkym stupňom socializácie, pretrvávajúcim stresom z nového prostredia alebo zdravotným stavom. Hoci sa predpokladá, že u socializovaných mačiek dôjde v priebehu pobytu v útulku k postupnej úprave reakcií voči človeku v dôsledku postupného znižovania stresu ako už bolo zmienené, mačky reagujú na stresové situácie rozdielnymi spôsobmi (Stella and Croney, 2019). U niektorých zvierat teda môže navykanie na nové prostredie trvať dlhšiu dobu. Rozlíšenie vystresovaných no socializovaných mačiek od zvierat, ktorých kontakt s človekom bol minimálny alebo úplne chýbal, je problematické, keďže ako sa zmiňuje v štúdií od Slater et al. (2013), strach vykazovaný oboma skupinami zvierat

nebolo možné od seba odlíšiť. Socializované, no vystrašené mačky môžu byť teda mylne označené za nesocializované a to hlavne v prípade, že im nie je poskytnutý žiaden čas pre aklimatizáciu. Opačným problémom je ale i situácia, kedy je skutočne nesocializované zviera držané v útulku dlhšiu dobu s domnienkou, že sa na nové podmienky adaptuje. V nami vybranom zariadení, v ktorom dochádzalo k hodnoteniu mačiek, nebol žiaden formálny protokol k diskriminácii mačiek využívaný. Povinnosť použitia hodnotiacich nástrojov nie je v Českej republike stanovená právnymi predpismi, zmienka o týchto nástrojoch sa nenachádza ani v odporúčaní týkajúci sa prevádzkovania útulkov. Rozhodnutie nasledovať už vytvorené postupy k diskriminácii zvierat, vytvoriť si vlastný metodický postup resp. zvieratá nerozlišovať vôbec teda závisí od konkrétneho zariadenia. V priebehu monitorovacieho obdobia bola po ošetrení v útulku do pôvodnej lokality vypustená iba jedna mačka. Rozhodnutie bolo učené na základe správania mačky v útulku a okolností odchyty. Zdá sa, že zvolená stratégia útulku bola efektívna, nakoľko v ňom nedochádzalo k držaniu nepriateľsky reagujúcich mačiek, ktorých stav by sa v priebehu pobytu nezlepšoval alebo zhoršil. Z pohľadu welfare sa držanie nesocializovaných zvierat v útulku dlhšiu dobu než je nevyhnutné považuje za nevhodné, preto sa odporúča ich eutanázia alebo vypustenie späť do miesta odchyty ak je to možné (Sparkes et al., 2013). K zmene skóre počas pobytu v útulku došlo u 32 mačiek, pričom u väčšiny z týchto zvierat (n=26) došlo k trvalému zlepšeniu skóre sociability. Zvyšovanie sociability bolo zaznamenané hlavne u zvierat, ktorých správanie bolo pri prvom hodnotení označené za neutrálne (skóre 3), nepriateľské (skóre 4) alebo veľmi nepriateľské (skóre 5).

U žiadnej mačky nedošlo v priebehu pobytu v útulku k zlepšeniu skóre o viac ako 3 stupne; najväčší progres bol zaznamenaný u mačky, ktorej bolo pri prvom hodnotení udelené skóre 5, zatiaľ čo pri poslednom skóre 2. Zlepšovanie ale bolo postupné (zmena nastala v priebehu 10 hodnotení čo pri dvojtýždennom intervale hodnotenia zodpovedá 20 týždňom v útulku). Rozhodnutie ponechať toto zviera v útulku vyplynulo z pomalého zlepšovania reakcie na človeka, hoci sa prvé zlepšenie dostavilo až po druhom hodnotení a teda 4 týždňoch strávených v útulku. U väčšiny mačiek (20 z 26) bolo však zlepšenie skóre zaznamenané skôr, a to už pri druhom hodnotení. Nakoľko zvieratá neboli počas karantény hodnotené, nemožno vylúčiť že prechod z karanténneho boxu do skupiny medzi ostatné mačky nemohol ovplyvniť správanie mačiek k človeku, preto by vplyv ustajnenia na reakcie mačiek voči človeku mal byť predmetom ďalšieho štúdia. Prechod z karantény do skupiny mohol mačkám, ktoré sa k človeku správali priateľsky kým boli v karanténe, potenciálne spôsobiť stres manifestujúci sa nepriateľským správaním voči človeku pri prvom hodnotení. Rovnako potenciálne mohlo byť nepriateľské správanie mačiek k človeku spôsobené špecifickými podmienkami karantény (nie iba stresom z prijatia do útulku vo všeobecnosti), kde sa zvieratá môžu cítiť ohrozené, keďže sú umiestnené v obmedzenom a relatívne malom priestore, nemajú tak možnosť úniku a dostatočnú kontrolu nad prostredím; vypustenie z karantény mohlo mať vplyv na zníženie stresu a zvýšenie úrovne sociability. Domnievame sa, že prvý načrtnutý scenár je menej pravdepodobný (hoci ho nemožno úplne vylúčiť) vzhľadom na to, že v útulku, v ktorom zber dát prebiehal nebola miestnosť, kde boli mačky umiestnené v karanténnych boxoch, úplne izolovaná od zvyšných priestorov útulku. V praxi to znamenalo, že mačky mimo karantény mali prístup do miestnosti, kde boli zvieratá umiestnené v karanténnych boxoch; tie teda boli počas trvania karantény s voľne ustajnenými mačkami vo vizuálnom, olfaktorickom i akustickom kontakte.

Dlhšia doba strávená v útulku môže dávať zvieraťu priestor k postupnému vybudovaniu návyku na človeka za predpokladu, že bolo predtým aspoň do istej miery socializované na človeka. Na socializáciu je nutné nazerať ako na kontinuum stupňov; správanie voči človeku odráža stupeň socializácie (Sparkes et al., 2013). Dosiahnutie maximálnej adaptačnej kapacity vzhľadom ku stupňu socializácie bol pravdepodobne prípad jedného zo zvierat, ktoré bolo predmetom sledovania. U tejto mačky došlo v priebehu prvých dvoch týždňov v útulku k zlepšeniu skóre zo 4 na 3, no toto skóre zostalo nemenné ďalších 13 hodnotení (teda 26 týždňov). Tento vývoj však mohol odrážať i schopnosť adaptácie mačky na pobyt v útulku vo všeobecnosti, ktorý sa manifestoval v reakcii na človeka, nemusel teda nutne súvisieť so stupňom socializácie. Ako sme už zmienili, reakcie mačiek na nové prostredie sa môžu líšiť a adaptácia môže u rôznych zvierat trvať rôzne dlhú dobu. Práve tento fakt je problematický pri určení hranice doby, ktorá by mala byť zvieraťu poskytnutá predtým

ako padne o jeho ďalšom osude definitívne rozhodnutie. Domnievame sa, že každý jedinec by mal byť posudzovaný individuálne na základe jeho správania a predošlej histórie, ak je známa.

K trvalému zhoršeniu skóre sociability došlo počas pobytu v útulku len u 3 zvierat (u dvoch zvierat došlo k zmene zo skóre 1 na skóre 2, u 1 mačky sa skóre zmenilo zo skóre 2 na skóre 3). Prechodné zlepšenie resp. zhoršenie známky bolo v priebehu pobytu zaznamenané u 3 mačiek, pričom zmeny známok u týchto mačiek neboli výrazné ale vždy kolísali medzi dvoma stupňami.

Skóre mačiek, ktoré pri prvom hodnotení vykazovali neutrálne, nepriateľské alebo veľmi nepriateľské správanie boli pri prvom hodnotení významne vyššie ako známky pri poslednom hodnotení. Naopak, vzhľadom k tomu, že v priebehu pobytu v útulku došlo k zhoršeniu skóre iba u troch mačiek, je zrejmé, že známky mačiek, ktoré boli pri prvom hodnotení označené za priateľské alebo veľmi priateľské zostali prakticky nemenné počas celého pobytu v útulku, čo spôsobilo, že rozdiel medzi známkami prvého a posledného hodnotenia týchto mačiek bol nevýznamný. Nakoľko predmetom štúdie bolo sledovanie populácie mačiek v útulku, u ktorej nie je možné regulovať dĺžku pobytu tak, aby bola rovnaká u všetkých zvierat keďže každé zviera ukončí svoj pobyt v útulku v inom čase, bolo pochopiteľne nutné nazerať na vývoj sociability mačiek i v kontexte rôznych dĺžok pobytu jednotlivých zvierat. Hoci korelačná analýza ukázala, že dĺžka pobytu v útulku súvisí so stupňom sociability, podľa výsledkov regresnej analýzy však nie je prediktorom pre výsledný stupeň sociability. Vo vzťahu k úrovni sociability počas posledného hodnotenia sa ako jediný zo sledovaných prediktorov (pohlavie, vek, dĺžka pobytu a stupeň sociability počas prvého hodnotenia) ukázal ako významný stupeň sociability počas prvého hodnotenia. Prvé hodnotenie predikovalo výsledný stupeň sociability, čím vyššie teda bolo skóre pri prvom hodnotení, tým vyššie skóre bolo zaznamenané počas posledného hodnotenia a opačne. Tento výsledok je zřejmý, nakoľko veľký počet mačiek sa počas prvého hodnotenia správalo priateľsky alebo veľmi priateľsky a tento stav zostal u takmer všetkých zvierat nemenný; u mačiek, ktoré sa počas prvého hodnotenia správali neutrálne, nepriateľsky alebo veľmi nepriateľsky bola síce zmena známok zaznamenaná, no zvyčajne sa jednalo o pokles iba o jeden stupeň.

Hoci sme zistili, že dĺžka pobytu nepredikuje výsledný stupeň sociability, nájdenie súvislosti medzi týmito dvoma premennými potvrdzuje zistenia predošlej štúdie, ktorá zaznamenala predĺženie doby pobytu v útulku u mačiek správajúcich sa k ľuďom nepriateľsky; mačky iniciujúce kontakt s ľuďmi, pobudli v útulku až tri krát kratšiu dobu ako mačky, s ktorými nebol kontakt možný (Brown and Stephan, 2020). Podobne ďalšie štúdie zmieňujú zvýšenú mieru adopcie mačiek reagujúcich pozitívne pri kontakte s človekom (Gourkow and Fraser, 2006; Weiss et al., 2012; Dybdall and Strasser, 2014; Southland et al., 2019). Správanie mačky a jej vzhľad sú významnými faktormi ovplyvňujúcimi preferencie potenciálneho osvojiteľa (Fantuzzi et al., 2010). Naša štúdia naznačuje, že z pohľadu negatívneho dopadu na sociabilitu mačiek, sa dlhšia doba pobytu v útulku nejaví ako problematická. V priebehu pobytu v útulku nedochádzalo k zníženiu sociability mačiek, ktorá by mohla negatívne ovplyvniť ich adopčný potenciál, čo je v kontraste so zisteniami dokumentovanými napr. u útlkových psov. Predĺžená doba pobytu v útulku bola u psov spojená so znížením sociability (Raudies et al., 2021) resp. dávala priestor pre rozvoj atribútov správania, ktoré môžu byť potenciálnymi ovojiteľmi považované za neatraktívne (Wells et al., 2002).

Medzi limitácie tejto štúdie možno zaradiť niekoľko skutočností. Prvou z nich je fakt, že zvolenie dvojtýždňového intervalu zberu dát síce umožňovalo monitorovanie vývoja sociability z dlhodobého hľadiska, na druhej strane ale neumožňovalo zachytenie zmien, ktoré sa mohli udiať medzi jednotlivými hodnoteniami. Druhou podstatnou skutočnosťou je, že zvieratá boli hodnotené iba jedným pozorovateľom, nakoľko voči tejto osobe boli reakcie mačiek sledované. Hoci prešiel daný pozorovateľ pred zberom dát tréningom, ktorý bol zameraný na spôsob hodnotenia zvierat s prihliadaním na to, aby boli jednotlivé hodnotenia realizované správne a postupovalo sa pri nich rovnako, hodnotenie zvierat pozorovaním je vždy do určitej miery subjektívne a odvíja sa od individuálnych atribútov hodnotiteľa. Je tiež otáznou do akej miery možno výsledky tejto štúdie interpretovať v súvislosti s úrovňou sociability mačiek voči neznámym osobám. Mačky sú schopné rozlišovať známe od neznámych osôb a často vykazujú preferencie k známej osobe (Galvan and Vonk, 2016), štúdia od Vitale and Udell (2019) ale zmieňuje, že skutočnosť, či bola osoba mačke

známa alebo neznáma nemala vplyv na jej správanie súvisiace so sociabilitou. Štúdia však rovnako zmieňuje, že medzi mačkami existuje významná miera individuálnej variability v preferenci k známej alebo neznámej osobe. Limitácia tejto štúdie môže súvisieť aj s počtom hodnotených zvierat; hoci bolo do útulku počas monitorovacieho obdobia prijatých celkom 220 zvierat, až 62 z nich muselo byť zo sledovania vyradených z dôvodu nízkeho veku (menej ako 3 mesiace) keďže štúdie naznačujú, že vývoj osobnosti mačky nie je plne ukončený do konca tretieho mesiaca veku (Lowe and Bradshaw, 2001). Zaradenie týchto zvierat do hodnotenia by mohlo ovplyvniť výsledky vo významnej miere. Problematickým sa tiež javí získanie dostatočného množstva dát vo všeobecnosti, nakoľko veľký počet zvierat ukončí svoj pobyt v útulku počas karantény alebo tesne po nej, preto nie je opakovanie zberu dát v prípade týchto jedincov možné. Bez ohľadu na túto skutočnosť by však v záujme zachovávanía dobrých životných podmienok zvierat mala byť doba strávená v útulku skrátená na minimum a podpora aktivít smerujúcich k tomuto cieľu je potrebná.

Záver

Výsledky tejto štúdie naznačujú, že v priebehu pobytu v útulku dochádza u mačiek k zvyšovaniu sociability, čo môže prispieť k zvýšeniu ich adopčného potenciálu. Dĺžka pobytu nebola v našej štúdii prediktorom výslednej sociability; predĺžená doba pobytu v útulku bola pravdepodobne dôsledkom počiatočnej nízkej úrovne sociability mačiek, čo je v súlade so zisteniami iných autorov. Aplikácii postupov vedúcich k socializácii mačiek a k znižovaniu stresu v útulkoch by mala byť venovaná pozornosť, nakoľko môžu prispieť k skráteniu pobytu zvierat a v zariadení a tým zlepšiť jeho životné podmienky.

Táto štúdia bola finančne podporená projektom ITA VETUNI (Projekt č. 2021ITA22).

Literatúra

- Amat, M., Camps, T., Manteca, X., 2016. Stress in owned cats: Behavioural changes and welfare implications. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 18: 577-586.
- Arhant, C., Binder, R., Kadlik, S., Wogritsch, R., Konicek, C., Troxler, J., 2011. Beurteilung von Tierheimen in Österreich. Report to project BMG-70420/0320-I/15/2009.
- Arhant, C., Troxler, J., 2017. Is there a relationship between attitudes of shelter staff to cats and the cats' approach behaviour? *Applied Animal Behaviour Science* 187: 60-68.
- Arhant, C., Wogritsch, R., Troxler, J., 2015. Assessment of behavior and physical condition of shelter cats as animal-based indicators of welfare *Journal of Veterinary Behavior* 10: 399-406.
- Brown, W.P., Stephan, V.L., 2020. The influence of degree of socialization and age on length of stay of shelter cats. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 24: 238-245.
- Casey, R.A., Bradshaw, J.W.S., 2005. The assessment of welfare. In: Rochlitz, I. (Eds): *The Welfare of Cats*, Springer, Dordrecht, pp. 23-46.
- Dybdall, K., Strasser, R., 2014. Is there a bias against stray cats in shelters? People's perception of shelter cats and how it influences adoption time. *Anthrozoös* 27: 603-614.
- Fantuzzi, J.M., Miller, K.A., Weiss, E., 2010. Factors relevant to adoption of cats in an animal shelter. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 13: 174-179.
- Galvan, M., Vonk, J., 2016. Man's other best friend: domestic cats (*F. silvestris catus*) and their discrimination of human emotion cues. *Animal Cognition* 19: 193-205.
- Gourkow, N., Fraser, D., 2006. The effect of housing and handling practices on the welfare, behaviour and selection of domestic cats (*Felis silvestris catus*) by adopters in an animal shelter. *Animal Welfare* 15: 371-377.
- Hudson, R., Rangassamy, M., Saldana, A., Banszegi, O., Rodel, H.G., 2015. Stable individual differences in separation calls during early development in cats and mice. *Frontiers in Zoology* 12: 12.
- Kessler, M.R., Turner, D.C., 1997. Stress and adaptation of cats (*Felis silvestris catus*) housed singly, in pairs and in groups in boarding catteries. *Animal Welfare* 6: 243-254.
- Kessler, M.R., Turner, D.C., 1999. Socialization and stress in cats (*Felis silvestris catus*) housed singly and in groups in animal shelters. *Animal Welfare* 8: 15-16.

- Kry, K., Casey, R., 2007. The effect of hiding enrichment on stress levels and behaviour of domestic cats (*Felis sylvestris catus*) in a shelter setting and the implications for adoption potential. *Animal Welfare* 16: 375-383.
- Kubesova, K., Voslarova, E., Vecerek, V., Vucinic, M., 2017. Investigating some of the factors that affect the selection of shelter cats by adopters in the Czech Republic. *Anthrozoös* 30: 623-633.
- Lowe, S.E., Bradshaw, J. W., 2001. Ontogeny of individuality in the domestic cat in the home environment. *Animal Behaviour* 61: 231-237.
- Mariti, C., Bowen, J.E., Campa, S., Grebe, G., Sighieri, C., Gazzano, A., 2016. Guardians' perceptions of cats' welfare and behavior regarding visiting veterinary clinics. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 19: 375-384.
- Marston, L.C., Bennett, P.C., 2009. Admissions of cats to animal welfare shelters in Melbourne, Australia. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 12: 189-213.
- Marzluff, J.M., Walls, J., Cornell, H.N., Withey, J.C., Craig, D.P., 2010. Lasting recognition of threatening people by wild American crows. *Animal Behaviour* 79: 699-707.
- McCune, S., 1995. The impact of paternity and early socialization on the development of cats behavior to people and novel objects. *Applied Animal Behavior Science* 45: 109-124.
- Mills, D.S., Demontigny-Bédard, I., Gruen, M., Klinck, M.P., McPeake, K.J., Barcelos, A.M., Hewison, L., Van Haevermaet, H., Denenberg, S., Hauser, H., Koch, C., 2020. Pain and problem behavior in cats and dogs. *Animals* 10: 318.
- Raudies, C., Waiblinger, S., Arhant, C., 2021. Characteristics and Welfare of Long-Term Shelter Dogs. *Animals* 11: 194.
- Réale, D., Dingemanse, N.J., 2012. *Animal Personality*. Els, John Wiley & Sons. Chichester, UK.
- Rochlitz, I., Podberscek, A.L., Broom, D.M., 1998. Welfare of cats in a quarantine cattery. *Veterinary Record* 143. 35-39.
- Slater, M.R., Miller, K.A., Weiss, E., Makolinski, K.V., Weisbrot, L.A., 2010. A survey of the methods used in shelter and rescue programs to identify feral and frightened pet cats *Journal of Feline Medicine and Surgery* 12: 592-600.
- Slater, M.R., Garrison, L., Miller, K.A., Weiss, E., Drain, N., Makolinski, K., 2013. Physical and behavioral measures that predict cats' socialization in an animal shelter environment during a three day period. *Animals* 3: 1215-1228.
- Southland, A., Dowling-Guyer, S., McCobb, E., 2019. Effect of visitor perspective on adoption decisions at one animal shelter. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 22: 1-12.
- Sparkes, A.H., Bessant, C., Cope, K., Ellis, S.L., Finka, L., Halls, V., Hiestand, K., Horsford, K., Laurence, C., MacFarlane, I., Neville, P.F., 2013. ISFM guidelines on population management and welfare of unowned domestic cats (*Felis catus*). *Journal of Feline Medicine and Surgery* 15: 811-817.
- Stamps, J., Groothuis, T. G. G., 2010. The development of animal personality: Relevance, concepts and perspectives. *Biological Reviews* 85: 301-325.
- Stella, J., Croney, C., 2019. Coping styles in the domestic cat (*Felis silvestris catus*) and implications for cat welfare. *Animals* 9: 370.
- Stella, J.L., Lord, L.K., Buffington, C.T., 2011. Sickness behaviors in response to unusual external events in healthy cats and cats with feline interstitial cystitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 238: 67-73.
- Stella, J.L., Croney, C., Buffington, T., 2013. Effects of stressors on the behavior and physiology of domestic cats. *Applied Animal Behavior Science* 143: 157-163.
- Stella, J., Croney, C., Buffington, T., 2014. Environmental factors that affect the behavior and welfare of domestic cats (*Felis silvestris catus*) housed in cages. *Applied Animal Behavior Science* 160: 94-105.
- Tanaka, A., Wagner, D.C., Kass, P.H., Hurley, K.F., 2012. Associations among weight loss, stress, and upper respiratory tract infection in shelter cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 240: 570-576.

- Travnik, I.D.C., Machado, D.D.S., Gonçalves, L.D.S., Ceballos, M.C., Sant'Anna, A.C., 2020. Temperament in domestic cats: a review of proximate mechanisms, methods of assessment, its effects on human—cat relationships, and one welfare. *Animals* 10: 1516.
- Vinke, C.M., Godijn, L.M., van der Leij, W.J.R., 2014. Will a hiding box provide stress reduction for shelter cats? *Applied Animal Behavior Science* 160: 86-93.
- Vitale, K.R., Udell, M.A., 2019. The quality of being sociable: The influence of human attentional state, population, and human familiarity on domestic cat sociability. *Behavioural Processes* 158: 11-17.
- Vojtkovská, V., Voslářová, E., Večerek, V., 2019. Comparison of Outcome Data for Shelter Dogs and Cats in the Czech Republic. *Animals* 9: 595.
- Weiss, E., Miller, K., Mohan-Gibbons, H., Vela, C., 2012. Why did you choose this pet?: Adopters and pet selection preferences in five animal shelters in the United States. *Animals* 2: 144-159.
- Wells, D.L., Graham, L., Hepper, P.G., 2002. The influence of length of time in a rescue shelter on the behaviour of kennelled dogs. *Animal Welfare* 11: 317-325.

Analýza obchodu s CITES exempláři za období let 1975 až 2018

Martina Volfová, Gabriela Lukešová, Eva Voslášková, Vladimír Večerek

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

Abstrakt

Obchod s ohroženými druhy je jedním z nejvýnosnějších byznysů na celosvětové úrovni. Dle dostupných informací z databáze CITES se obchoduje se všemi živočišnými komoditami z tříd savců, ptáků, plazů, obojživelníků a dalších. Cílem této studie bylo zhodnotit obchod s ohroženými druhy zvířat na celosvětové úrovni z dat dostupných z CITES Trade Database za 43 let, od roku 1975 do roku 2018. Z výsledků vyplývá, že nejvíce bylo obchodováno s exempláři z třídy plazů, poté savci, ptáci a nejméně s obojživelníky. U všech sledovaných tříd bylo ve větší míře obchodováno s neživými exempláři či s produkty z nich, nežli se živými zvířaty. Například u plazů, jako nejvíce obchodované skupiny, se jednalo o přepravu 496 979 631 exemplářů neživých vs. 51 129 325 exemplářů živých. Dále bylo zjištěno, že u plazů byl trend v počtu obchodovaných jedinců vzrůstající. U savců byl pozorován za sledované období stabilní vývoj v počtu přepravovaných exemplářů, jednalo se v průměru o přepravu 5 603 880 jedinců ročně. Trend v obchodování s jedinci z třídy ptáci a obojživelníci byl za sledované období vzrůstající. Zjištěné výsledky informují o rozsahu obchodu s ohroženými druhy živočichů, který je všemi smluvními zeměmi úmluvy CITES zaznamenáván do zmíněné databáze.

Úvod

Velikost populace volně žijících zvířat ovlivňuje ve světě mnoho faktorů, přičemž nejčastěji je uváděn jako hlavní faktor ohrožení člověkem a jeho činností. Dle Červeného listu IUCN je nyní ohroženo vyhynutím více jak 35 500 druhů z celého světa (IUCN, 2021). Uvádí se, že vinou člověka došlo k drastickému poklesu biodiverzity, což vyústilo v šesté masové vymírání (Ceballos et al., 2015). Pro zpomalení a zvrácení tohoto ubývání je nutné důsledně zmonitorovat příčiny ohrožení a dále pak účinnost dosavadně nastavených záchranných programů (Leu et al., 2019).

Jednou z příčin úbytku řady živočišných druhů ve volné přírodě je jejich odlov za účelem obchodu. Nelegální obchod s volně žijícími zvířaty je dokonce uváděn společně s obchodováním se zbraněmi a pašováním drog v top 3 největších byznysech na světě (WWF, 2021). Dle Sas-Rolfes et al. (2019) je ilegální obchod s volně žijícími živočichy celosvětovým politickým problémem. Nezákonný obchod se netýká pouze třídy savců, ale všech taxonomických skupin, například ptáků, plazů a obojživelníků (Sas-Rolfes, 2019). Jak doplňují Bush et al. (2014) a Zhou et al. (2014a), celosvětový ilegální obchod s volně žijícími živočichy a produkty z nich představuje jednu z nejzávažnějších hrozeb pro celosvětové populace živočichů. Za oblasti s nejvyšší mírou nelegálního obchodu s ohroženými živočichy a produkty z nich jsou považovány USA, Japonsko a Evropská unie (Knapp and Affre, 2007). V Evropské unii zřejmě sehrála roli eliminace kontrol na jejích vnitřních hranicích. Počáteční problém je však potřeba hledat spíše v rozvojových zemích, kde se vyskytuje mnoho diverzních živočichů, kteří jsou v rámci obchodu vysoce žádaní (Robinson et al., 2018).

V současné době regulaci obchodu zajišťuje velkou měrou úmluva CITES, jejíž signatáři jsou zavázáni ji dodržovat, a dále pak právní předpisy jednotlivých zemí, které více či méně přísně postihují nelegální odchyt živočichů. Významnou formou kontroly obchodu s ohroženými druhy je systém vývozních a dovozních povolení, tzv. permity CITES (Cruze and Macdonald, 2016). Jinými slovy to znamená, že u některých vybraných druhů živočichů je nutné vyplňovat tyto permity, které opravňují chovatele tyto živočichy převážet a obchodovat s nimi. Retrospektivní analýzou obchodu s CITES exempláři za 43 let (tedy od roku 1975, kdy nabyla úmluva CITES platnosti, do roku 2018) je možno zhodnotit pohyb konkrétních taxonů po světě a určit dosavadně nejčastěji obchodované exempláře.

Cílem této práce tedy bylo zhodnotit dle databáze CITES počty obchodovaných ohrožených druhů zvířat ve třídách savci, ptáci, plazi a obojživelníci, a zhodnotit vývojový trend za pozorované období, tedy zda narůstá nebo naopak klesá obchodovatelnost s určitým taxonem během sledovaného období.

Materiál a metodika

Údaje o exportovaných exemplářích byly získány z oficiální databáze CITES, která je volně dostupná na internetových stránkách (CITES Trade Database, 2021). Evidence zahrnuje data od roku 1975 do roku 2018 a obsahuje informace týkající se počtu exportovaných živých i neživých exemplářů, jejich příslušnost k třídě živočichů a jejich počty exportované i importované do příslušných zemí každý rok.

Do hodnocení byly zahrnuty všechny živé a neživé exempláře, které byly v rozmezí let 1975 až 2018 exportovány. Jednotky (ks, g, kg atd.) byly jednotně zahrnuty jako počty exemplářů. Pro statistické zhodnocení byla data rozdělena dle počtu exportovaných savců, ptáků, plazů a obojživelníků a dále byly v každé skupině vyhodnoceny počty živých a neživých exemplářů. Jako živé byly myšleny veškeré exempláře označené jako „live“, ostatní byly zahrnuty mezi neživé exempláře. Neživé exempláře zahrnovaly například kosti, kůže, rohy apod.

K vyhodnocení dat byl použit statistický program UNISTAT 6.5 for Excel (Unistat Ltd., London, UK). Vývoj počtů exportovaných exemplářů v letech 1975 až 2018 v rámci jednotlivých tříd byl posouzen pomocí Spearmanova koeficientu se stanovením koeficientu pořadové korelace. Pro statistické zhodnocení rozdílů v počtech exemplářů v rámci jednotlivých skupin s počty jedinců > 5 byl použit chí-kvadrát test s Yatesovou korekcí v rámci metodiky 2x2 kontingenčních tabulek. V případě obou použitých testů byla hodnota $p < 0,05$ stanovena jako statisticky významná.

Výsledky

Za období let 1975 až 2018 bylo celkově v rámci CITES exportováno 875 572 163 exemplářů. Tabulka č. 1. uvádí počty exemplářů ve třídách savci, ptáci, plazi a obojživelníci. Mezi všemi porovnávanými skupinami byl statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) v počtu exportovaných exemplářů.

Tabulka č. 1. Počet savců, ptáků, plazů a obojživelníků exportovaných v období let 1975 až 2018.

Třída	Počet
Savci	246 570 719 ^a
Ptáci	64 068 335 ^b
Plazi	548 108 956 ^c
Obojživelníci	16 824 153 ^d
Celkem	875 572 163

^{a-d} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

Dále byly vyhodnocovány trendy v počtech přepravovaných exemplářů z jednotlivých sledovaných tříd, tj. zda za sledované období docházelo k nárůstu či poklesu v počtech obchodovaných exemplářů nebo byl pozorován stabilní obchod s určitým taxonem.

Vývoj v počtu exportovaných exemplářů spadajících do třídy plazi, která byla nejvíce obchodovanou skupinou, za období let 1975 až 2018 znázorňuje graf č. 1.

Graf č. 1. Vývoj počtu exportovaných exemplářů ze třídy plazí za období let 1975 až 2018.



V případě exportu s exempláři plazů byl zjištěn statisticky významný nárůst v období let 1975 až 2018 ($r_{Sp} = 0,4237$, $p < 0,05$). Nejvíce exemplářů bylo exportováno v roce 1990 (23 774 549 exemplářů) a i přes mírný pokles v následujících letech je každoročně exportováno okolo 10-16 milionů exemplářů plazů ročně.

Počet živých a neživých exemplářů plazů exportovaných v letech 1975 až 2018 zobrazuje tabulka č. 2.

Tabulka č. 2. Počet živých a neživých exemplářů plazů exportovaných za období let 1975 až 2018.

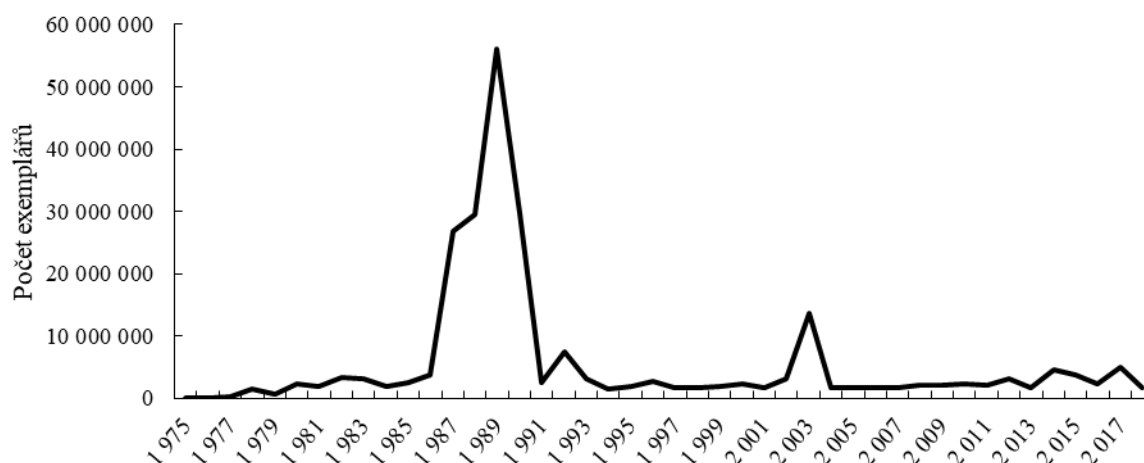
Plazi	
živý	neživý
51 129 325 ^e	496 979 631 ^f

^{e,f} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

V případě exemplářů plazů dochází k výraznému zvýšení jejich exportu za sledované období. U živých exemplářů byl potvrzen vzrůstající trend ($r_{Sp} = 0,8382$ $p < 0,05$) stejně jako u neživých ($r_{Sp} = 0,3559$ $p < 0,05$). Zatímco u neživých exemplářů je pozorován především od roku 1997 poměrně konstantní počet exportovaných exemplářů, u živých se postupně zvyšuje každým rokem ve sledovaném období s maximem v roce 2018, kdy se jednalo o 2 370 743 exportovaných živých exemplářů plazů.

Dále byl vyhodnocen trend v počtech přepravovaných exemplářů savců, a to za sledované období let 1975 až 2018. Vývoj v počtu exportovaných exemplářů spadajících do třídy savci za období let 1975 až 2018 znázorňuje Graf č. 2.

Graf č. 2. Vývoj počtu exportovaných exemplářů ze třídy savců za období let 1975 až 2018.



Za období let 1975 až 2018 došlo ke dvěma navýšením v počtu exportovaných exemplářů savců a to v období let 1987-1991 a v období let 2003-2005, jak lze vidět na grafu č. 1, celkově však nebyl prokázán vzestupný trend v počtu exportovaných exemplářů během sledovaného období ($r_{Sp} = 0,1440$, $p > 0,05$). Nejvyšší počet exportovaných exemplářů savců byl zaznamenán v roce 1989, konkrétně se jednalo o 56 152 667 exemplářů.

Počet živých a neživých exemplářů savců exportovaných v letech 1975 až 2018 uvádí tabulka č. 3.

Tabulka č. 3. Počet živých a neživých exemplářů savců exportovaných za období let 1975 až 2018.

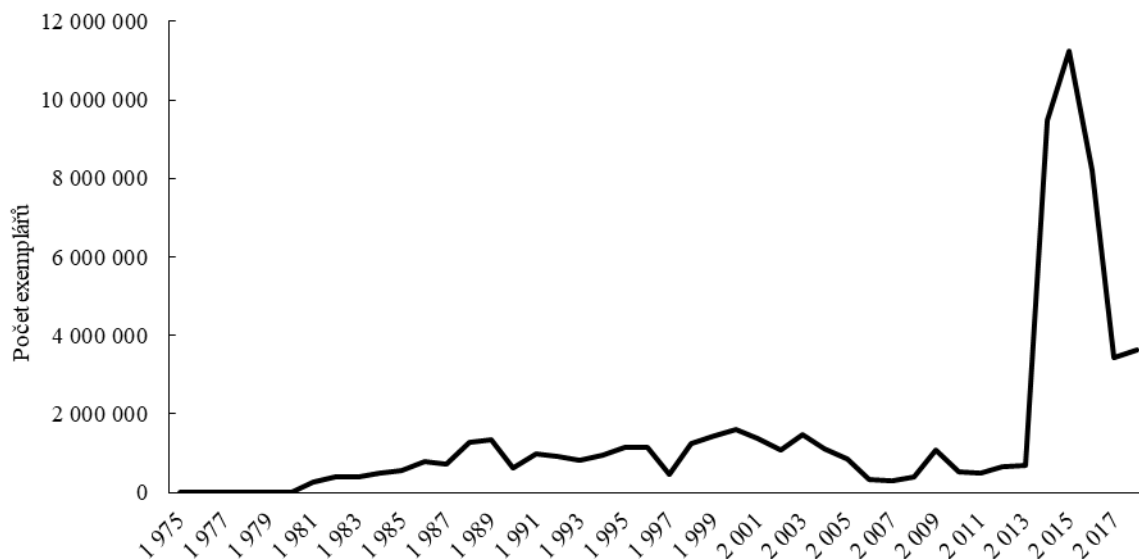
Savci	
živý	neživý
3 394 914 ^a	243 175 805 ^b

^{a,b} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

Za sledované období bylo významně více exportovaných neživých exemplářů savců. Export živých exemplářů savců obvykle nepřesahoval 50 000 exemplářů ročně s výjimkou roku 2003 (1 647 966), 2016 (57 196), 2017 (61 565) a 2018 (64 444). Za sledované období byl v případě živých exemplářů savců sledován vzestupný trend v jejich exportech ($r_{Sp} = 0,7872$, $p < 0,05$), naopak v případě neživých exemplářů nebyl vzestupný trend prokázán ($r_{Sp} = 0,1388$, $p > 0,05$).

Vývoj v počtu exportovaných exemplářů spadajících do třídy ptáci za období let 1975 až 2018 znázorňuje graf č. 3.

Graf č. 3. Vývoj počtu exportovaných exemplářů ze třídy ptáci za období let 1975 až 2018.



Výrazný nárůst počtu exportovaných exemplářů ptáků byl sledován především od roku 2013. Do roku 2013 nepřesáhl roční počet exportovaných exemplářů 2 miliony jedinců, ale například v roce 2014 se jednalo už o 9 486 292 exemplářů a v roce 2015 o 11 250 959 exemplářů, což byl také nejvyšší zaznamenaný počet exportovaných ptáků za sledované období. Během období let 1975 až 2018 byl zjištěn vzrůstající trend v počtu exportovaných exemplářů ptáků ($r_{Sp} = 0,6027$, $p < 0,05$).

Počet živých a neživých exemplářů ptáků exportovaných v letech 1975 až 2018 zobrazuje tabulka č. 4.

Tabulka č. 4. Počet živých a neživých exemplářů ptáků exportovaných za období let 1975 až 2018.

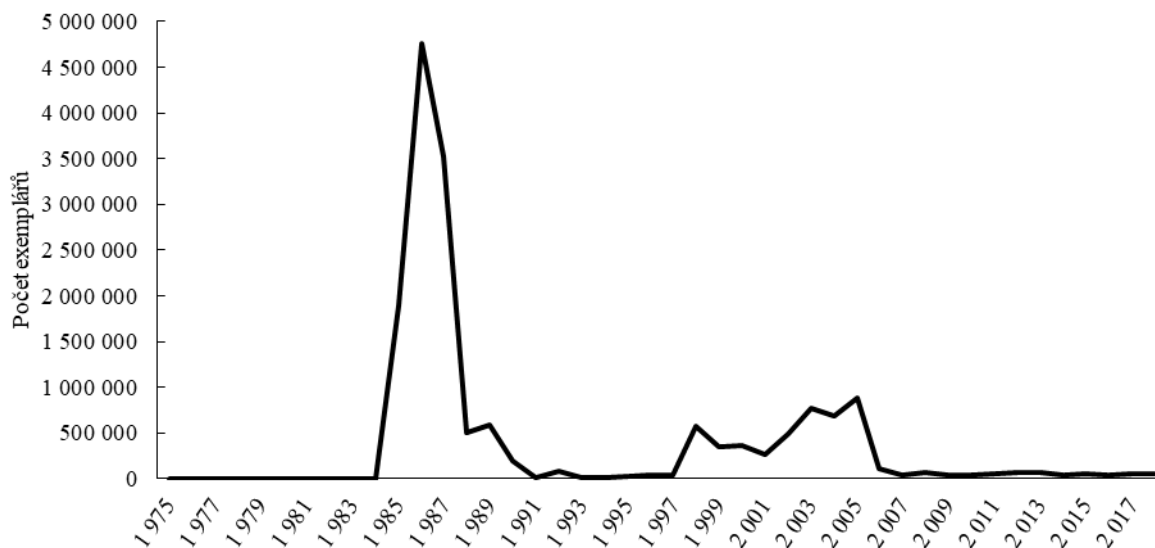
Ptáci	
živý	neživý
27 896 754 ^c	36 171 581 ^d

^{c,d} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

V případě neživých ptačích exemplářů exportovaných od roku 1975 do roku 2018 byl sledován vzrůstající trend v počtu exportovaných exemplářů ($r_{Sp} = 0,8251$, $p < 0,05$), kdy především od roku 2014 došlo k výraznému navýšení v počtech exportů. U živých exemplářů nebyl potvrzen vzrůstající trend ($r_{Sp} = 0,2764$, $p > 0,05$) za sledované období.

Vývoj počtu exportovaných exemplářů spadajících do třídy obojživelníci za období let 1975 až 2018 znázorňuje graf č. 4.

Graf č. 4. Vývoj počtu exportovaných exemplářů ze třídy obojživelníků za období let 1975 až 2018.



Exempláře obojživelníků byly nejvíce exportovány v letech 1983-1987 (s maximem v roce 1986 s počtem 4 753 512 exemplářů) a poté byl sledován mírný nárůst v období 1997-2006. Od roku 2007 nepřesahuje počet exportovaných exemplářů obojživelníků 100 000 exemplářů ročně, i přes to byl zjištěn statisticky vzrůstající trend v počtu exportovaných exemplářů obojživelníků ($r_{Sp} = 0,3774$, $p < 0,05$).

Počet živých a neživých exemplářů obojživelníků exportovaných v letech 1975 až 2018 zobrazuje tabulka č. 5.

Tabulka č. 5. Počet živých a neživých exemplářů obojživelníků exportovaných za období let 1975 až 2018.

Obojživelníci	
živý	neživý
1 272 190 ^g	15 551 963 ^h

^{g,h} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

Neživé exempláře obojživelníků jsou v rámci exportu evidovány až od roku 1980, zatímco živé exempláře byly přepravovány již od roku 1975. Nejvyšší počty exportovaných neživých exemplářů byly sledovány v období let 1983 až 1988 s maximálním počtem 4 744 842 exemplářů v roce 1986. V posledních letech jejich počet spíše klesal a v roce 2018 se jednalo o 47 680 exportovaných neživých exemplářů obojživelníků. V případě živých exemplářů byl pozorován vzrůstající trend v počtu exportovaných exemplářů během sledovaného období ($r_{Sp} = 0,8710$, $p < 0,05$), zatímco u neživých exemplářů nebyl vzrůstající trend potvrzen ($r_{Sp} = 0,2513$ $p > 0,05$).

Diskuze

Od roku 1975 do roku 2018 bylo nejčastěji obchodováno s živočichy z třídy plazi, kterých bylo přepraveno za sledované období 43 let celkem 548 108 956, jak vyplývá z databáze CITES. Dle Bush et al. (2014) bylo za období od roku 2006 do roku 2012 nejčastěji celosvětově obchodováno s ptáky, poté s plazy, nejméně často se savci. Dle našich výsledků se však za takto dlouhé období na druhém místě nejčastěji obchodovalo právě se savci. Cruze and Macdonald (2016) zase zjišťovali mezinárodní obchod s CITES druhy za období let 2010 až 2014 a zjistili, že nejčastěji bylo obchodováno s třídou plazi, přičemž se mezi nejčastěji zadržované taxonomické skupiny řadili ještěři, želvy, hadi a krokodýli. Druhou nejčastěji obchodovanou skupinou byli ptáci, zde nejčastěji papoušci, sokoli a sovy. U savců bylo nejčastěji obchodováno s primáty a šelmami a celkově se mezinárodní obchod s nimi v průběhu čtyř sledovaných let pohyboval na třetím místě. Nejméně bylo obchodováno

s obojživelníky, především s žábami (Cruze and Macdonald, 2016), což vyplývá i z naší studie, kde bylo za 43 let přepraveno 16 824 153 jedinců. Maron (2019) uvádí, že na celosvětovém trhu s volně žijícími živočichy a planě rostoucími rostlinami se zřejmě obchoduje s více než 8 000 volně žijících druhů. Jednalo by se tedy o téměř 30 % všech druhů savců, ptáků, obojživelníků a plazů.

Obchod s ohroženými druhy a jeho míra se řídí především poptávkou ze strany spotřebitelů. Dle Baker et al. (2013) je častá poptávka po exotických zvířatech pro účely zájmového chovu, pro veřejná vystoupení, pro pracovní účely nebo pouze pro vyjádření určité společenské úrovně chovatele. Neobchoduje se však pouze s živými exempláři, ale i s neživými, tedy s různými částmi těl či produkty získanými z ohrožených druhů. Tyto jsou velmi často využívány pro tradiční medicínu, pro náboženské účely, jsou využívány jako trofeje, ozdobné předměty či suvenýry.

Dle naší studie bylo u všech sledovaných tříd významně častěji obchodováno s neživými exempláři než s živými zvířaty. U plazů se jedná často o obchod pro účely módního průmyslu. Například aligátor, kajman, krajta, krokodýl a varan pokrývají 84 % obchodovaných položek za účelem zisku kůží, jak vyplývá ze studie Marshall et al. (2020) z let 2004-2019. Méně často byli obchodováni plazi živí (8-9 %), nebo pro účely potravinářského průmyslu (6 %), jako dekorace (1 %) a pro léčebné účely (1 %). Více než 35 % druhů plazů je obchodováno online a přibližně 90 % obchodovaných druhů plazů je odchycena z volné přírody (Marshall et al., 2020). Dle Rosen a Smith (2010) se v letech 1996 až 2008 nejčastěji obchodovalo s následujícími produkty ze savců: celá těla, žluč, žlučník, rohy, deriváty z rohů a další exempláře (32 %), kůže a kožešiny (27 %), sloní produkty (25 %), maso, části těl, orgány, kosti a zuby (16 %). Významnou položkou světového obchodu s CITES exempláři je slonovina. Ze studie Rosen and Smith (2010) vyplývá, že záchyty slonoviny tvořily 25 % všech výrobků ze savců. Pro zajímavost za posledních 12 let (od roku 1998 – 2010) bylo zabaveno více než 42 401,38 kg slonoviny. Za předpokladu průměrné hmotnosti klu 3,95 kg (Milliken et al., 2004) to představuje více než 5367 slonů (Rosen and Smith, 2010). Animal Welfare Institute (2021) informuje, že jsou miliony volně žijících ptáků stále nelegálně pašovány a obchodovány na černém trhu pro uspokojení poptávky obchodu se zvířaty, sběratelů a ptačích zápasů. Papoušci a další ptáci chovaní pro účely zájmového chovu představují největší skupinu volně žijících zvířat chovaných v zajetí ve Spojených státech a jsou čtvrtým nejoblíbenějším zvířetem chovaným jako domácí mazlíček - hned po psech, kočkách a rybách.

Nárůst v obchodování určitého taxonu může být podnícen i nechtěnou popularizací určitého druhu. Například byla zaznamenána zvýšená poptávka po sovách a následně vzrostl i obchod s nimi, zřejmě z důvodu popularizace v knihách o kouzelníkovi Potterovi (Hansen et al., 2012).

Dohled nad obchodem s volně žijícími živočichy je velmi důležitý i z hlediska možného monitoringu šíření nálezů se zoonotickým potenciálem. Je totiž prokázáno, že obchod s některými druhy živočichů významně usnadňuje přenos některých onemocnění (Travis et al., 2011). Jones et al. (2008) zjistili, že většina nově se objevujících infekčních onemocnění je způsobena zoonotickými patogeny a že více než 70 % z nich pochází z volně žijících zvířat. Příkladem takovýchto nálezů plynoucích z obchodu s volně žijícími zvířaty mohly být opičí neštovice, které byly v roce 2003 zavlečeny do USA, kdy byly infikované krysy obrovské (*Cricetomys gambianus*) přepravovány s domácími psouny preriovními (*Cynomys ludovicianus*), kteří poté přenesli nemoc na lidi (Guarner et al., 2004). Vyskytly se ale i další případy zoonóz, mezi něž patří vzteklna od savců, těžký akutní respirační syndrom (SARS) od malých masožravců, vysoce patogenní ptačí chřipka od ptačích druhů a chytridiomykóza od obojživelníků (Bell et al., 2004; Weldon et al., 2004; Karesh et al., 2005).

Závěr

Databáze CITES nabízí jedinečnou příležitost zhodnotit celkový obchod se savci, plazy, ptáky a obojživelníky zařazenými na seznam úmluvy CITES a určit trendy v objemu obchodu za sledované období. Ze zjištěných výsledků vyplývá, že rozsah obchodu s ohroženými druhy, který je legální a schválený dotčenými orgány, a posléze zaznamenaný v CITES Trade Database, je opravdu ohromný. Od roku 1975 do roku 2018 bylo celkem přepraveno 875 572 163 exemplářů, z toho nejvíce savců, poté plazů, ptáků a nejméně obojživelníků. Z celkového počtu exemplářů jich bylo nejvíce neživých, ty zahrnovaly exempláře jako kosti, kůže, kožešiny, vzorky apod. Trend v obchodu s ohroženými

druhy se v průběhu 43 let u savců výrazně neměnil. U plazů byl zjištěn vzrůstající trend v počtu obchodovaných jedinců, také trend v obchodování s jedinci z třídy ptáci a obojživelníci byl během sledovaného období vzrůstající. Cílem další práce bude zhodnotit důvody obchodu s jednotlivými taxony za stejné období, jejich původ a oblasti, kde jsou obchodovány. Vzhledem k rozsahu celého legálního obchodu s ohroženými druhy je v první řadě významné zpřísnit, popřípadě zcela zakázat obchod s konkrétním významně ohroženým taxonem a především zasadit se o dodržování a účinné vymáhání práva souvisejícím s regulací obchodu s ohroženými druhy ve smluvních zemích CITES.

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

Literatura

- Baker, S.E., Cain, R., van Kesteren, F., Zommers, Z.A., D'Cruze, N., Macdonald, D.W. 2013. Rough Trade: Animal Welfare in the Global Wildlife Trade. *BioScience* 63: 928-938.
- Bell, D., Robertson, S., Hunter, P.R. 2004. Animal origins of SARS coronavirus: possible links with the international trade in small carnivores. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 359: 1107-1114.
- Bush, E.R., Baker, S.E., Macdonald, D.W. 2014. Global Trade in Exotic Pets 2006–2012. *Conservation Biology* 28: 663-676.
- Ceballos, G., Ehrlich, P.R., Barnosky, A.D., García, A., Pringle, R.M., Palmer, T.M. 2015. Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Science Advances* 1: e1400253.
- CITES Trade Database. 2021. [online]. [cit. 2021-10-25]. Dostupné z: <https://trade.cites.org/>
- Cruze, N.D., Macdonald, D.W. 2016. A Review of Global Trends in CITES Live Wildlife Confiscations. *Nature Conservation* 15: 47-63.
- Dinerstein, E., Louks, C., Wikramanayake, E., Ginsberg, J., Sanderson, E., Seidensticker, J. et al. The fate of wild tigers. *BioScience* 57: 508-514.
- Guarner, J., Johnson, B.J., Paddock, C.D., Shieh, W.J., Goldsmith, C.S., et al. 2004. Monkeypox transmission and pathogenesis in prairie dogs. *Emerging Infectious Diseases* 10: 426-431.
- Hansen, A.L.S., Li, A., Joly, D., Mekaru, S., Brownstein, J.S. 2012. Digital Surveillance: A Novel Approach to Monitoring the Illegal Wildlife Trade. *Plos One* 7: e51156.
- IUCN. 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. [online]. [cit. 2021-01-11]. Dostupné z: <https://www.iucnredlist.org/>
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., et al. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451: 990-993.
- Karesh, W.B., Cook, R.A., Bennett, E.L., Newcomb, J. 2005. Wildlife trade and global disease emergence. *Emerging Infectious Diseases* 11: 1000-1002.
- Kasterine, A., Arbeid, R., Caillabet, O., Natusch, D. 2012. The trade in South-East Asian python skins. *International Trade Centre*: 1-55.
- Knapp, A., Affre, A. 2007. A Briefing Paper on Marking Techniques Used in the Control of Wildlife in the Europe Union. Brusel: Evropská Komise. ISBN 978-2-930490-01-4.
- Lawson, K., Vines, A. 2014. Global Impacts of the Illegal Wildlife Trade: The Costs of Crime, Insecurity and Institutional Erosion. London: The Royal Institute of International Affairs. ISBN 978-1-78413-004-6.
- Leu, M., Haines, A.M., Check, C.E., Costante, D.M., Evans, J.C., Hollingsworth, M.A., et al. 2019. Temporal analysis of threats causing species endangerment in the United States. *Conservation Science and Practice* 1: 1-11.
- Lyons, J.A., Natusch, D.J.D. 2011. Wildlife laundering through breeding farms: illegal harvest, population declines and a means of regulating the trade of green pythons (*Morelia viridis*) from Indonesia. *Biological Conservation* 144: 3073-3081.
- Maron, D.F. 2019. More species than you think are part of wildlife trade. These may be next. [online]. [cit. 2021-01-11]. Dostupné z: <https://www.nationalgeographic.com/animals/article/wildlife-trade-species>

- Animal Welfare Institute. 2021. Bird Trade. [online]. [cit. 2021-01-11]. Dostupné z: <https://awionline.org/content/bird-trade>
- Marshall, B.M., Strine, C., Hughes, A.C. 2020. Thousands of reptile species threatened by under-regulated global trade. *Nature Communications* 11: 1-12.
- McCusker, R. Transnational crime in the Pacific Islands: real or apparent danger. *Trends & Issues in Crime and Criminal Justice* 308:1-6.
- Milliken, T., Burn, R.W., Underwood, F., Sangalakula, L. 2004. The Elephant Trade Information System (ETIS) and the illicit trade in ivory: a report to the 13th meeting of the Conference of the Parties. CoP13 Doc. 29.2, Annex. CITES Secretariat, Geneva, Switzerland
- Robinson, J.E., Griffiths, R.A., Fraser, I.M., Raharimalala, J. 2018. Supplying the Wildlife Trade as a Livelihood Strategy in Biodiversity Hotspot. *Ecology and Society* 23: 1-21.
- Rosen, G.E., Smith, K.F. 2010. Summarizing the Evidence on International Trade in Illegal Wildlife. *EcoHealth* 7: 24-32.
- Sas-Rolfes, M., Challender, D.W.S., Hinsley, A., Verissimo, D., Zhou, X.H., Wan, X.T., Jin, Y.H., Zhang, W. 2016. Concept of Scientific Wildlife Conservation and Its Dissemination. *Zoological Research* 37: 270-274.
- Travis, D.A., Watson, R.P., Tauer, A. 2011. The spread of pathogens through trade in wildlife. *Revue scientifique et technique* 30: 219-239.
- Williams, V.L., Newton, D.J., Loveridge, A.J., Macdonald, D.W. 2015. Bones of contention: an assessment of the South African trade in African lion *Panthera leo* bones and other body parts. TRAFFIC, Cambridge, UK and WildCRU, Oxford, UK.
- Weldon, C., du Preez, L.H., Hyatt, A.D., Muller, R., Spears, R. 2004. Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases* 10: 2100-2105.
- WWF. 2021. Illegal wildlife trade. [online]. [cit. 2021-01-11]. Dostupné z: <https://www.worldwildlife.org/threats/illegal-wildlife-trade>
- Zhou, Z.M., Zhou, Y., Newman, C., Macdonald, D.W. 2014a, Scaling up pangolin protection in China. *Frontiers in Ecology and the Environment* 12: 97-98.
- Zhou, Z.M., Zhou, Y., Newman, C., Macdonald, D.W. 2014b. Synthetic ivory fails to stop illegal trade. *Nature* 507: 40.

Analýza obchodu s CITES exempláři v České republice za období let 1992 až 2018

Martina Volfová, Gabriela Lukešová, Eva Voslášková, Vladimír Večerek

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

Abstrakt

CITES Trade Database umožňuje posuzovat obchod s ohroženými druhy chráněnými úmluvou CITES o regulaci obchodu s nimi. Cílem této studie bylo analyzovat obchod s exempláři CITES na území ČR za 27 let, tedy od roku 1992 do roku 2018. Konkrétně byly určeny počty obchodovaných exemplářů (živých i neživých), byly vyhodnoceny vývojové trendy v počtech přepravovaných exemplářů za sledované období, a zhodnocena místa exportu a importu. Bylo zjištěno, že nejvíce obchodovanou třídou živočichů na území ČR jsou plazi, poté ptáci, obojživelníci a nejméně často je obchodováno se savci. U plazů byl prokázán vzestupný trend v počtech obchodovaných exemplářů jak u importu, tak i exportu. U ptáků, jako druhé nejčastěji obchodované třídy v ČR, byl prokázán vzestupný trend pouze u exportů. U obojživelníků došlo za pozorované období naopak k nárůstu počtu importů, především v posledních letech. Poslední, nejméně obchodovanou skupinou, byli savci, u kterých byl během 27 let pozorován stabilní trend v počtech přepravovaných jedinců. Celkem se častěji jednalo o vývoz exemplářů z ČR (636 059 exemplářů) než o jejich dovoz do ČR (497 820). Exempláře byly nejčastěji vyváženy do Asie, importovány do ČR byly v největší míře ze Severní Ameriky.

Úvod

V roce 1992 se stala Česká republika, tehdy ještě jako Československo, signatářem úmluvy CITES, která zavazuje všechny smluvní země regulovat obchod s ohroženými druhy zvířat a mimo jiné evidovat legální obchod s ohroženými druhy do celosvětové databáze CITES. Hlavním kontrolním úřadem ve věci regulace obchodu s ohroženými druhy je v České republice Česká inspekce životního prostředí, která společně s celními úřady dozoruje dodržování úmluvy CITES implementované do evropské (především Nařízení Rady (ES) č. 338/97 ze dne 9. prosince 1996 o ochraně druhů volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin regulováním obchodu s nimi) a národní legislativy (zákon č. 100/2004 Sb.).

Česká republika je považována za světovou velmoc v obchodování s ohroženými druhy zvířat. Důvodem není pouze velká obliba Čechů v chovu zájmových zvířat obecně, ať už těch běžných domácích druhů nebo exotických často ohrožených druhů, ale velkou roli bude hrát i poloha České republiky, která je jako střed Evropy velmi výhodnou tranzitní zemí (ČIŽP, 2008). Bohužel je známo, že Česká republika se často podílí na ilegálním obchodu s ohroženými druhy zvířat (ČIŽP, 2008). Například největší počet pašovaných zvířat registrovaných Interpolem byl nalezen právě u českých občanů (ČIŽP, 2008). Velikost legálního obchodu je na základě dostupných dat tedy poměrně lehce zjištěitelná, míra nelegálního obchodu se však dá pouze odhadovat (Hansen et al., 2012).

Cílem této studie bylo určit počty obchodovaných exemplářů (živých i neživých) za 27 let (od roku 1992 do roku 2018) na území ČR, vyhodnotit vývojové trendy v počtech přepravovaných exemplářů za sledované období, a zhodnotit místa exportu (tedy oblasti, do kterých byly exempláře z ČR vyvezeny) a importu (oblasti, odkud byly exempláře do ČR dovezeny).

Materiál a metodika

Údaje o pohybu exemplářů na území ČR byly získány z oficiální databáze CITES, která je volně přístupná na internetových stránkách (CITES Trade Database, 2021). Evidence zahrnuje data od roku 1992 (kdy se stala Česká republika signatářem Úmluvy CITES) do roku 2018 a informuje o počtech exportovaných a importovaných živých i neživých exemplářích ze tříd savců, ptáků, plazů a obojživelníků obchodovaných na našem území.

Získaná data byla rozdělena dle počtu exportovaných savců, ptáků, plazů a obojživelníků a dále byly v každé skupině vyhodnoceny počty živých a neživých exemplářů. Jako živé byly myšleny veškeré exempláře označené jako „live“, ostatní byly zahrnuty mezi neživé exempláře. Neživé exempláře zahrnovaly například kosti, kůže, rohy apod. Jednotky (ks, g, kg atd.) byly jednotně zahrnuty jako počty exemplářů.

Pro vyhodnocení míst exportu (tedy zemí, do kterých byly exempláře z ČR vyvezeny) a importu (zemí, odkud byly exempláře do ČR dovezeny), byly sledované země rozděleny do skupin: Afrika, Severní Amerika, Jižní Amerika, Evropa, Asie, Rusko, Austrálie a neznámé (v databázi nebyla uvedena konkrétní země).

Ke statistickému vyhodnocení dat byl použit program UNISTAT 6.5 for Excel (Unistat Ltd., London, UK). Pro statistické zhodnocení rozdílů v počtech exemplářů v rámci jednotlivých skupin s počty jedinců > 5 byl použit chí-kvadrát test s Yatesovou korekcí v rámci metodiky 2x2 kontingenčních tabulek. Vývoj v počtech exportovaných nebo importovaných exemplářů v letech 1992 až 2018 v rámci jednotlivých tříd na území ČR byl posouzen pomocí Spearmanova koeficientu se stanovením koeficientu pořadové korelace. V případě obou použitých testů byla hodnota $p < 0,05$ stanovena jako statisticky významná.

Výsledky

Za období let 1992 až 2018 bylo z České republiky exportováno celkem 636 059 exemplářů. Tabulka č. 1. uvádí počty exemplářů náležících k jednotlivým třídám, mezi kterými byl statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) v počtu exportovaných exemplářů. Tabulka č. 2. uvádí počty exemplářů z České republiky importovaných, kde byl rovněž mezi jednotlivými třídami pozorován statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) v počtu importovaných exemplářů dle jednotlivých tříd. Celkově bylo za 27 let z ČR importováno 497 820 exemplářů.

Tabulka č. 1. Počet savců, ptáků, plazů a obojživelníků exportovaných z České republiky v období let 1992 až 2018.

Třída	Počet
Savci	10 598 ^a
Ptáci	410 323 ^b
Plazi	192 921 ^c
Obojživelníci	22 217 ^d
Celkem	636 059

^{a-d} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

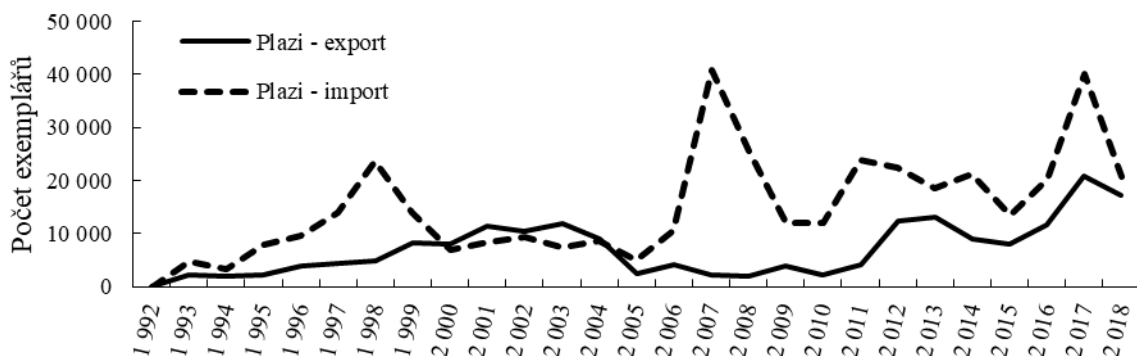
Tabulka č. 2. Počet savců, ptáků, plazů a obojživelníků importovaných do České republiky v období let 1992 až 2018.

Třída	Počet
Savci	8 772 ^a
Ptáci	79 817 ^b
Plazi	404 660 ^c
Obojživelníci	4 571 ^d
Celkem	497 820

^{a-d} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

Nejvíce obchodovanou třídou v období let 1992 až 2018 byli na území ČR plazi. Významně více ($p < 0,01$) bylo zaznamenáno importů (68 %) než exportů, jak lze vidět v průběhu sledovaného období i na grafu č. 1.

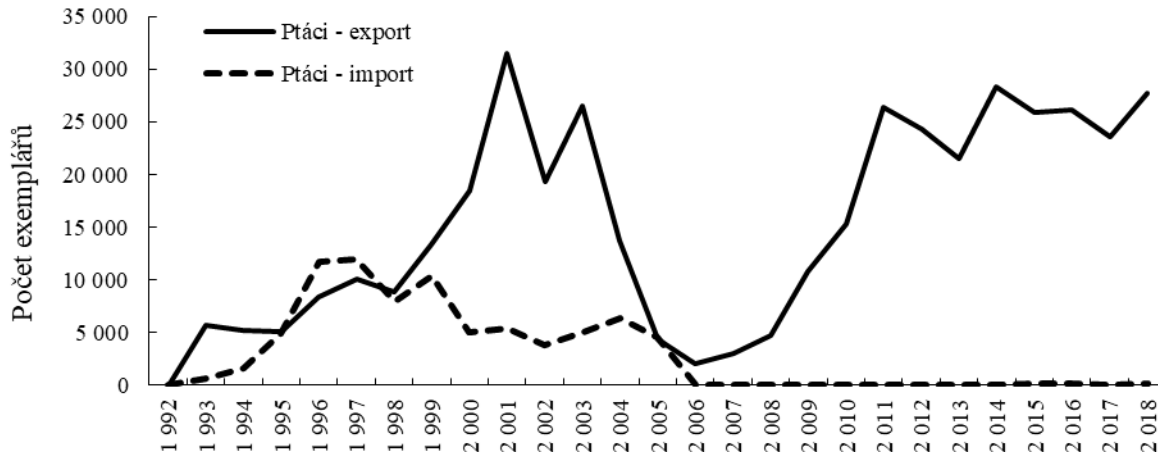
Graf č. 1. Vývoj v počtech exportovaných a importovaných exemplářů ze třídy plazi v rámci České republiky za období let 1992 až 2018



Při importu byl prokázán vzestupný trend ($r_{Sp} = 0,6624$, $p < 0,05$) v počtech plazů přivezených do ČR, nejvyšší počty importovaných exemplářů plazů byly zaznamenány v roce 2007 (40 841 exemplářů) a v roce 2017 (40 208 exemplářů). U exportů bylo maximum zaznamenáno v roce 2017 (20 890 exemplářů). I zde byl prokázán vzestupný trend v počtu exportovaných exemplářů plazů během sledovaného období ($r_{Sp} = 0,5812$, $p < 0,05$).

Druhou hojně obchodovanou skupinou v ČR byli ptáci. Těch bylo za sledované období importováno nebo exportováno celkem 490 140. U ptáků bylo mnohem více jedinců exportováno z ČR (84 %). Během sledovaného období byl pozorován významný nárůst ($r_{Sp} = 0,5757$, $p < 0,05$) v počtu exemplářů ptáků exportovaných z České republiky do jiných zemí, jak zobrazuje graf č. 2.

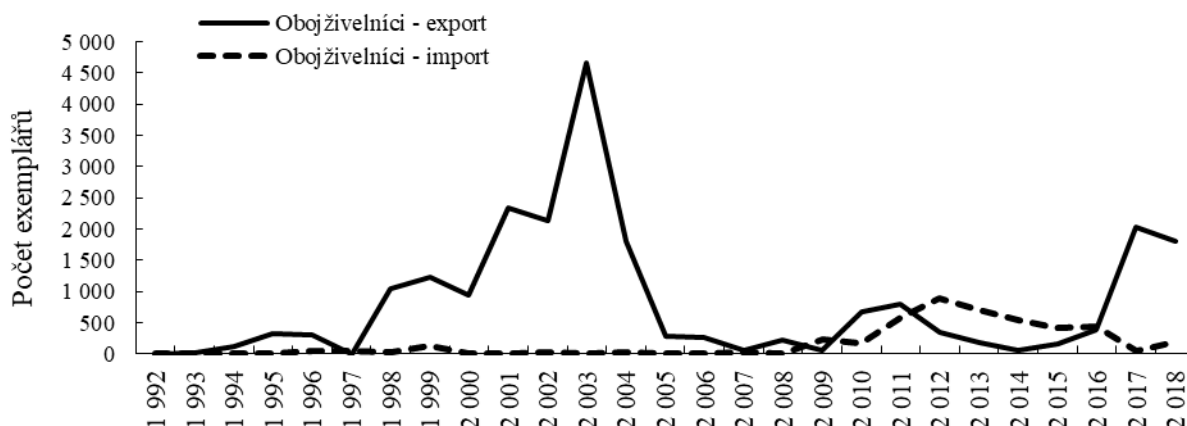
Graf č. 2. Vývoj počtu exportovaných a importovaných exemplářů ptáků v rámci České republiky za období let 1992 až 2018.



K vývozu těchto exemplářů došlo výrazněji více v letech 1999 až 2004, s maximem v roce 2001 (31 498 exemplářů) a po následném poklesu v počtu vyvážených exemplářů ptáků došlo opět k nárůstu od roku 2009 s maximálním počtem exportů v roce 2014 (28 381 exportovaných ptačích exemplářů). V případě importovaných ptáků do České republiky byly zaznamenány vyšší počty v období let 1993 až 2005, s maximem v roce 1996 (11 712 exemplářů) a v roce 1997 (11 983 exemplářů), poté došlo k výraznému poklesu v počtu importovaných ptáků, který byl také statisticky prokázán ($r_{Sp} = -0,5049$, $p < 0,05$). Nejméně evidovaných importovaných exemplářů ptáků bylo v roce 2006 (4 exempláře) a v roce 2014 (5 exemplářů).

Za sledované období bylo celkem obchodováno s 26 788 obojživelníky. Ve velké většině případů (83 %) byly exempláře obojživelníků exportovány z ČR. Počty exportů a importů obojživelníků a jejich vývoj během sledovaného období zobrazuje graf č. 3.

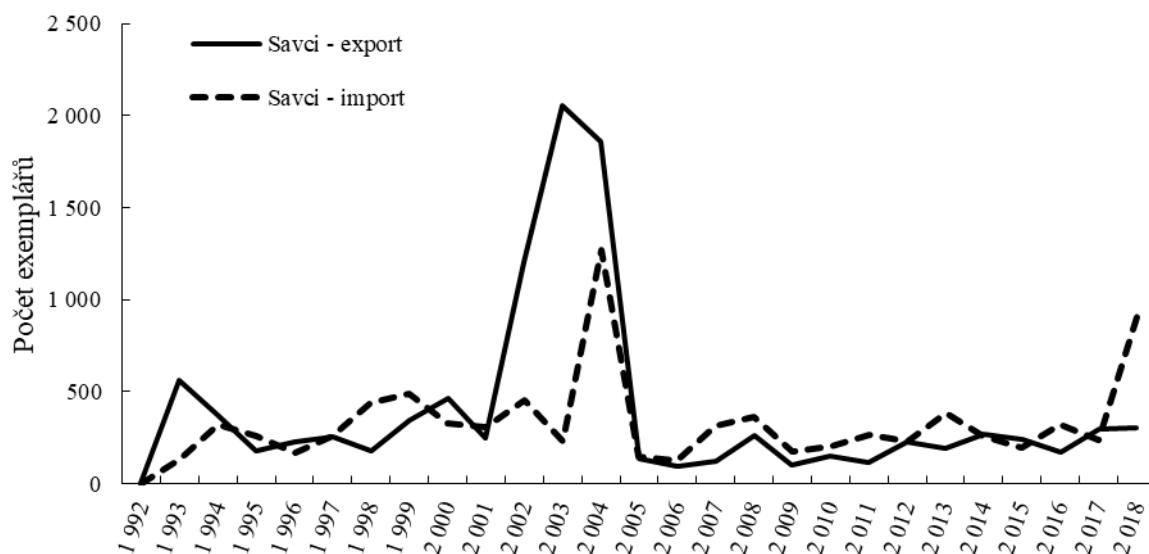
Graf č. 3. Vývoj počtu exportovaných a importovaných exemplářů ze třídy obojživelníků v rámci České republiky za období let 1992 až 2018.



Exempláře obojživelníků byly ve výrazně vyšším počtu z České republiky exportovány než importovány, avšak za celé sledované období nebyl prokázán vzrůstající trend v počtu exportovaných obojživelníků ($r_{Sp} = 0,1801$, $p > 0,05$). Naopak u importovaných exemplářů byl prokázán nárůst především ke konci sledovaného období ($r_{Sp} = 0,7001$, $p < 0,05$). Nejvyšší počet exportovaných exemplářů byl sledován v roce 2003 (4 650 exemplářů), naopak importovaných bylo nejvíce v roce 2012, kdy se jednalo o 894 exemplářů obojživelníků.

V případě exemplářů savců byl jak v případě importu, tak i exportu, pozorován stabilní trend v počtech přepravovaných exemplářů za sledované období (import: $r_{Sp} = 0,1420$, $p > 0,05$; export: $r_{Sp} = -0,1343$, $p > 0,05$). Nejvíce savců bylo do ČR importováno v roce 2004 (1 269 exemplářů), v roce 2003 pak bylo zaznamenáno nejvíce exemplářů savců exportovaných z České republiky do jiných zemí (2 055). Počty exportovaných a importovaných exemplářů savců v průběhu hodnoceného období jsou zobrazeny na grafu č. 4.

Graf č. 4. Vývoj počtu exportovaných a importovaných exemplářů ze třídy savců v rámci České republiky za období let 1992 až 2018.



Exempláře všech čtyř hodnocených tříd byly exportovány nebo importovány do oblastí Asie, Evropa, Rusko, Severní a Jižní Amerika, Afrika a Austrálie. V databázi se objevovaly i záznamy přeprav a oblast byla označena jako neznámá, proto je tato kategorie pro úplnost také ve výsledcích

uvedena, byť se jedná o minimální počty exemplářů z celkového počtu. Konkrétní počty přepravovaných exemplářů do jednotlivých oblastí uvádí tabulka č. 3 (pro exporty) a tabulka č. 4 (pro importy).

Tabulka č. 3. Počet exemplářů exportovaných z České republiky do jednotlivých oblastí za období let 1992 až 2018.

Oblast	Počet
Asie	426 618 ^a
Evropa	181 179 ^b
Rusko	10 531 ^d
Severní Amerika	67 745 ^c
Jižní Amerika	629 ^f
Afrika	1 027 ^e
Austrálie	12 ^h
Neznámé	71 ^g

^{a-h} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

Tabulka č. 4. Počet exemplářů importovaných do České republiky z jednotlivých oblastí za období let 1992 až 2018

Oblast	Počet
Asie	63 780 ^c
Evropa	45 628 ^d
Rusko	11 694 ^f
Severní Amerika	254 792 ^a
Jižní Amerika	20 134 ^e
Afrika	123 492 ^b
Austrálie	1 264 ^g
Neznámé	366 ^h

^{a-h} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

Jak dokládají výsledky, nejvíce exemplářů bylo z České republiky exportováno do Asie, naopak nejméně do Austrálie. Nejčastěji se exempláře do České republiky dovážely ze Severní Ameriky, v nejmenším počtu byly dováženy z Austrálie.

Diskuze

Dle zjištěných výsledků bylo za 27 sledovaných let obchodováno na území České republiky s velkým množstvím exemplářů, konkrétně se jednalo o 1 133 879 exemplářů. Především se jednalo o exempláře z třídy plazi a ptáci. Tento výsledek dokládají také některé zahraniční studie, např. Bush et al. (2014) uvádějí, že bylo během let 2006 – 2012 nejčastěji celosvětově obchodováno s ptáky, poté s plazy. Ke stejným výsledkům došli i Cruze and Macdonald (2016), kteří zjišťovali mezinárodní obchod s CITES exempláři za období let 2010 až 2014.

Česká republika je považována za světovou velmoc v chovu zájmových zvířat a také v jejich pašování. Stala se totiž velmi významnou tranzitní i cílovou zemí pro obchod s ohroženými druhy živočichů (ČIŽP, 2008). Situace se výrazně změnila po roce 1997, kdy došlo zpřísněním legislativy k výraznému poklesu počtu nelegálně držených zvířat, a to díky přísnějším kontrolám na hranicích, povinným registracím exemplářů a pravidelné kontrole na místních trzích a při prodeji. Jak potvrzuje Česká inspekce životního prostředí (2008), největší počet pašovaných zvířat registrovaných

Interpolem byl nalezen na českém území. Pro představu, Polsko s rozlohou 312 685 km² zaznamenalo v roce 2000 celkem 1097 živých a 491 neživých exemplářů obchodovaných na jejich území ilegálně, Slovensko s rozlohou 48 845 km² celkem 131 živých exemplářů a žádný neživý a Česká republika za stejný rok evidovala 31 653 živých a 1588 neživých ilegálně pašovaných exemplářů, přitom má rozlohu 78 866 km². Například Litva, podobně velký stat jako ČR (rozloha 65 200 km²) zaznamenala v roce 2004 pouze 4 živé ilegálně obchodované jedince a do 30 kg kaviáru. Data z roku 2000 bohužel nejsou známa (Kecse-Nagy et al., 2006).

Jak uvádějí Kecse-Nagy et al. (2006), Česká republika a Malta byly zdaleka nejdůležitějšími importéry živých ptáků zařazených na seznam CITES ze zemí EU, konkrétně se jednalo o 60 000 a 78 000 živých ptáků zařazených na seznam CITES dovezených během osmi let. Česká republika byla také největším vývozcem živých ptáků zařazených na seznam CITES. Kromě toho byla Česká republika také největším vývozcem živých plazů zařazených na seznam CITES. Konkrétně bylo z ČR vyvezeno více než 10 000 exemplářů plazů a dovezeno více než 85 000 živých plazů zařazených na seznam CITES a vyvezla (včetně reexportů) více než 61 000 živých plazů. Dalšími významnými vývozci živých plazů zařazených na seznam CITES byly Slovensko a Slovinsko s přibližně 24 000 a 17 700 živými plazy v letech 1996-2003.

Dle dat z let 1992 až 2018 bylo zjištěno, že exempláře jsou nejčastěji exportovány z ČR do Asie a poté v rámci Evropy, na třetím místě je uvedena Severní Amerika. Naopak nejčastěji byly exempláře importovány do ČR ze Severní Ameriky, Afriky a Asie. Ve vědeckých studiích se významná role připisuje také Blízkému východu a Jižní Americe (Cruze and Macdonald, 2016).

Sinclair et al. (2021) uvádějí ve své studii 5 největších dovozců a vývozců exemplářů savců, ptáků, plazů, obojživelníků a ryb během let 1999 až 2013. Česká republika je zde zmíněna jako třetí největší importující nebo exportující země přepravující savce, po Guyaně a Kanadě.

Závěr

Analýza obchodu s CITES exempláři na území ČR za 27 let nabízí jedinečnou příležitost posoudit obchod s jednotlivými třídami živočichů zařazenými na seznam CITES. Bylo zjištěno, že nejvíce obchodovanou třídou živočichů na území ČR jsou plazi, poté ptáci, obojživelníci a nejméně bylo zaznamenáno přeprav savců. Častěji se jednalo o export zvířat, než o jejich import. Exempláře byly nejčastěji vyváženy do Asie, importovány do ČR byly v největší míře ze Severní Ameriky. Jak bylo řečeno, Česká republika se řadí v obchodu s ohroženými druhy na přední příčky, zpřísnování legislativy souvisejícím s držením ohrožených druhů a především co nejjednodušší aplikace práva do praxe v oblasti kontroly a monitoringu ilegálních aktivit povede jednoznačně ke zlepšení dané situace.

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

Literatura

- Bush, E.R., Baker, S.E., Macdonald, D.W. 2014. Global Trade in Exotic Pets 2006–2012. *Conservation Biology* 28: 663-676.
- CITES Trade database. 2021. [online]. [cit. 2021-10-25]. Dostupné z: <https://trade.cites.org/>
- Cruze, N.D., Macdonald, D.W. 2016. A Review of Global Trends in CITES Live Wildlife Confiscations. *Nature Conservation* 15: 47-63.
- ČIŽP. 2008. Smuggled pleasure: The Czech Republic: a smuggling world power? [online]. [cit. 2021-11-11]. Dostupné z: <https://www.cizp.cz/file/PR2/011346.pdf>
- Hansen, A.L.S., Li, A., Joly, D., Mekaru, S., Brownstein, J.S. 2012. Digital Surveillance: A Novel Approach to Monitoring the Illegal Wildlife Trade. *Plos One* 7: e51156.
- Kecse-Nagy, K., Papp, D., Knapp, A., von Meibom, S. 2006. Wildlife trade in Central and Eastern Europe. A review of CITES implementation in 15 countries. TRAFFIC Europe report, Budapest, Hungary.
- Nařízení Rady (ES) č. 338/97 ze dne 9. prosince 1996 o ochraně druhů volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin regulováním obchodu s nimi.

Sinclair, J.S., Stringham, O.C., Udell, B., Mandrak, N.E., Leung, B., Romagosa, CH.M., Lockwood, J. 2021. The International Vertebrate Pet Trade Network and Insights from US Imports of Exotic Pets, *BioScience* 71: 977-990.

WWF. 2021. Illegal wildlife trade. [online]. [cit. 2021-01-11]. Dostupné z: <https://www.worldwildlife.org/threats/illegal-wildlife-trade>

Zákon č. 100/2004 Sb., o ochraně druhů volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin regulováním obchodu s nimi a dalších opatřeních k ochraně těchto druhů a o změně některých zákonů (zákon o obchodování s ohroženými druhy). [online]. [cit. 2021-11-11]. Dostupné z: <https://obchod.wolterskluwer.cz/cz/zakon-o-obchodovani-s-ohrozenymi-druhy-100-2004-sb-komentar.p5609.html>

Posouzení dopadu kontaminace vodního prostředí rtutí na zdraví živočichů vázaných na vodu na základě hodnocení obsahu rtuti u kormorána velkého

Kamila Novotná¹, Zuzana Široká¹, Tomáš Král¹, Piotr Gomulka², Anna Spodniewska³ Zdeňka Svobodová¹

¹Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, ČR, ²Ústav Ichtyologie a akvakultury, Fakulta bioinženýringu zvířat, Univerzita Warmia a Mazury v Olsztyně, Polsko, ³Ústav farmakologie a toxikologie, Fakulta veterinární medicíny, Univerzita Warmia a Mazury v Olsztyně, Polsko

Abstrakt

Práce se zabývá hodnocením rtuti v orgánech kormoránů pocházejících ze dvou lokalit v Polsku. Ve třech orgánech (játra, ledviny a svalovina) u celkem 45 dospělých jedinců byl stanoven obsah celkové rtuti metodou AAS. Na lokalitě Krogulna (rybářská farma) průměrný obsah rtuti klesal následovně: ledviny>játra>svalovina ($1,39\pm 1,55$ mk.kg⁻¹; $1,33\pm 1,06$ mk.kg⁻¹; $0,58\pm 0,38$ mk.kg⁻¹) a na lokalitě Nysa Kłodzka ve stejném pořadí byly průměrné hodnoty následovně: $3,12\pm 1,51$ mk.kg⁻¹; $2,28\pm 0,87$ mk.kg⁻¹; $1,09\pm 0,4$ mk.kg⁻¹). Průměrný obsah rtuti u kormoránů z lokality Krogulna je vysoce významně nižší ve všech orgánech oproti lokalitě Nysa Kłodzka a to i přesto, že obě lokality jsou považovány za rtutí nezátížené. Rozdílné hodnoty obsahu rtuti jsou tak dány odlišnou stravou, kdy na lokalitě Krogulna je převážně rybí obsádka tvořena kaprem obecným, kdežto na lokalitě Nysa Kłodzka je obsádka různých druhů ryb, a to jak dravých, nedravých i všežravých.

Úvod

Podle Agentury pro toxické látky a onemocnění (ATSDR) a taktéž podle Světové zdravotnické organizace (WHO) patří rtuť mezi deset nejvýznamnějších toxických látek, které se vyskytují v životním prostředí a které jsou nebezpečné pro zdraví (Wang, 2012). Jde o přirozeně se vyskytující prvek, který je uvolňován ze zemské kůry do prostředí v důsledku mnoha činností, např. těžba zlata, spalování fosilních paliv, produkce chemických látek, vulkanická činnost aj. (EEA report, 2018).

Přestože jsou všechny formy rtuti toxické, přesný účinek na organismus člověka a zvířat záleží na konkrétní chemické formě a sloučenině, dávce a místu vstupu do organismu. Absorpce je možná inhalací či požitím a hlavními zdroji rtuti jsou pro člověka a zvířata voda a potrava. Vstřebávání kůží je z hlediska toxicity nepodstatné. Vdechování rtuti také není pro obyvatele a zvířata v Evropě podstatnou cestou vstupu, ovšem kontaminace půdy, vodního prostředí a následně i potravního řetězce je úzce spojena se znečištěním ovzduší rtutí, přičemž více než 50 % této rtuti, která se ročně uloží v Evropě, pochází ze zemí mimo Evropu a přichází dálkovým transportem, tzv. globálním cyklem rtuti (EEA report, 2018). Na druhé straně, zvířata jako např. ptáci, kteří migrují na velké vzdálenosti, tráví dlouhé dny a týdny v těchto vzdušných masách a tak jsou exponováni rtuti i v této podobě, což má pravděpodobně vliv na jejich zdraví.

Rtuť nacházená jako důsledek přirozené a antropogenní kontaminace v řekách, jezerech a oceánech představuje velké riziko pro mnoho organismů včetně dravých a rybožravých ptáků. Elementární rtuť a její anorganické sloučeniny se stále používají v průmyslu a v podobě odpadních vod kontaminují vodní prostředí. Zde jsou přeměněny mikroorganismy sedimentů na vysoce toxickou sloučeninu organického charakteru, na tzv. metylrtuť. Její produkce je ovlivněna mnoha faktory, jako je např. teplota vody, která ovlivňuje metabolickou aktivitu mikroorganismů, a tak se liší mezi jednotlivými lokalitami (Kaler et al. 2014). Methylrtuť je výrazně lipofilní a je velmi snadno absorbována do planktonu i vyšších organismů a takto rychle inkorporována do potravního řetězce, kde dochází k její kumulaci v průběhu věku konzumenta, a u predátorů dokonce i k její biomagnifikaci (Klapstein and O'Driscoll, 2018).

Jak akutní, tak chronická expozice rtuti a jejím sloučeninám vyústí v poškození zdraví. Mezi nejtypičtější postižení patří změny v nervovém systému, poškození ledvin, kardiomyopatie a arytmie. Velmi citlivá jsou mláďata a embrya a jejich expozice je spojována s teratogenitou a vznikem

vývojových vad (Harari et al., 2012; Karagas et al., 2012). U ptáků jsou popisovány efekty jako snížená reprodukční schopnost (Burger and Gochfeld, 1997; Evers et al., 2008), změny v teritoriálním chování a migraci či poruchy inkubace (Furness et al., 1986; Evers et al., 2008) a u orlů bělohavých i poškození CNS a nervové příznaky (Rutkiewicz et al., 2011).

Jak již bylo uvedeno, hlavním rezervoárem rtuti jsou ryby a další vodní živočichové. Rybožraví ptáci, kteří mají ryby a vodní organismy jako hlavní zdroj potravy jsou tak vysoce ohroženi akumulací až biomagnifikací rtuti a jejím zdravotním následkům (Dong-Ha et al., 2005). Obsah rtuti v rybách je variabilní a reflektuje kontaminaci daného vodního zdroje. Tím pádem i rybožraví ptáci mohou být kontaminováni podle lokality, kde nejčastěji získávají svou potravu. Navíc mnoho z nich patří i mezi migrující druhy, a tak se mohou obsahy rtuti v jejich tkáních měnit podle ročního období a místa pobytu. Jako predátoři a vrcholové články potravního řetězce pak mohou sloužit jako vhodné bioindikátorové organismy pro posouzení kontaminace rtutí v čase a prostoru pro jednotlivé ekosystémy a lokality, a koncentrace rtuti v jejich tkáních také odkazuje na zdravotní stav a welfare těchto ptáků (Furtado et al., 2019).

Cílem této studie bylo stanovit obsah celkové rtuti ve svalovině, játrech a ledvinách kormoránů odlovených na dvou lokalitách v Polsku a zjistit, zda je rozdíl v obsahu rtuti u kormoránů mezi sledovanými lokalitami. Dílčím cílem bylo i zhodnotit obsah rtuti mezi jednotlivými orgány v rámci jedné lokality a tedy distribuci rtuti v organismu.

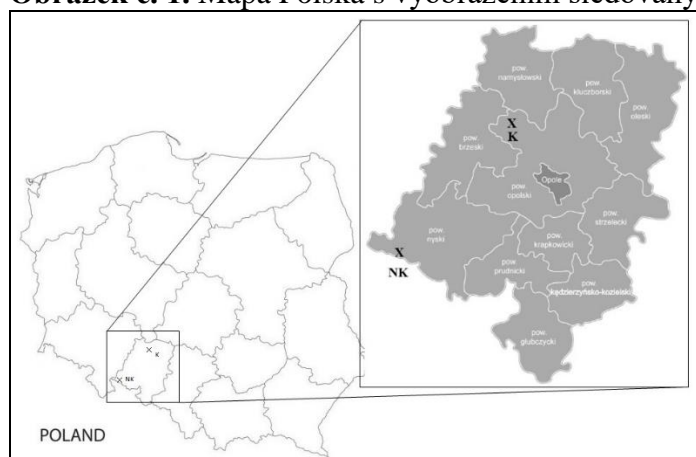
Materiál a metodika

Sledované lokality

V této studii byly sledovány dvě lokality, a to Krogulna a Nysa Kłodzka v Polsku, jejichž poloha je vyznačena na obr. 1. První lokalitou je Krogulna (K), jedná se o soubor rybníků pro chov kaprů a je situován ve stejnojmenné vesnici Krogulna, která leží 40 km od Opole a 17 km od města Namysłów. Farma patří pod organizaci *Regionalna Dyrekcja Lasów Państwowych in Katowice*. Hlavní aktivitou farmy je chov sladkovodních ryb, zejména kaprů. Rybníky jsou součástí lesního ekosystému v oblasti Krogulna (www.krogulna.pl). Druhou lokalitou je řeka Nysa Kłodzka (NK), která je situována na severozápadě Polska, jedná se o levý přítok řeky Odry. Odběrové místo bylo lokalizováno pod nádrží Nysa. Přehrada je spravována organizací *Polish Angling Association*.

Obě lokality jsou považovány za rtutí nezatížené lokality, žádný zdroj rtuti zde není znám ani z továren ani z jiné lidské činnosti. Obě lokality jsou od sebe vzdálené cca 65 km vzdušnou čarou.

Obrázek č. 1. Mapa Polska s vyobrazením sledovaných lokalit



K= Krogulna; NK= Nysa Kłodzka

Kormoráni (*Phalacrocorax carbo*)

Celkem 45 dospělých (2-3 roky) kormoránů (20 z Krogulny a 25 z řeky Nysa Kłodzka) bylo odstřeleno rybáři z *Regionalna Dyrekcja Ochrony Środowiska* s příslušným povolením polské policie. Z každého kormorána byly během pitvy odebrány tři tkáně: játra, ledviny a svalovina. Celkem 135

vzorků bylo označeno a vloženo do polyethylenových sáčků a zmrazeno a uchováváno při -22 °C až do analýzy celkové rtuti.

Analýza celkové rtuti (THg)

Celková rtuť byla stanovena metodou atomové absorpční spektrometrie na přístroji AMA 254 (Altec Ltd. Dvůr Králové nad Labem, Česká republika). Při samotné analýze byly jednotlivé vzorky bez předchozí přípravy po rozmrazení naváženy a vloženy do spalovací lodičky přístroje AMA 254 k analýze. Limit detekce přístroje je 1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Přesnost měření byla validována za pomoci referenčního materiálu NIST- 2976 (Mussle Tissues). Obsah celkové rtuti je vyjádřen v mg.kg^{-1} čerstvé tkáně.

Data a statistická analýza

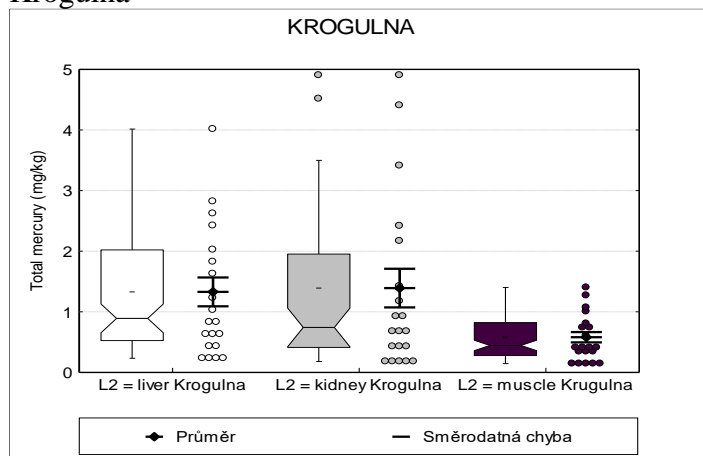
Zjištěná data byla zpracována do tabulek za pomoci programu Microsoft Word a Microsoft Excel (MS Office 365) a statistická analýza byla provedena v programu Unistat for Excel 6.5. Nejdříve byla data jednotlivých skupin podrobena testu normality (Shapiro-Wilkův test). Jednalo se o data s nenormálním rozdělením, tudíž byly použity neparametrické testy. Pro hodnocení obsahu rtuti mezi lokalitami byl použit Mann-Whitneův test a pro hodnocení obsahu rtuti v jednotlivých orgánech mezi sebou v rámci jedné lokality byla použita Kruskal Wallis jednofaktorová ANOVA-Tukey HSD test.

Výsledky

Krogulna

Obsah celkové rtuti u jednotlivých vzorků tkání kormoránů je zobrazen v grafu č. 1. Průměrný obsah pro jednotlivé tkáně kormoránů odchycených na lokalitě Krogulna je zobrazen v tabulce č. 1. Průměrný obsah je nejnižší ve svalovině ($0,58\pm 0,38 \text{ mg.kg}^{-1}$), dále v játrech ($1,33\pm 1,063 \text{ mg.kg}^{-1}$) a nejvyšší v ledvinách ($1,39\pm 1,42 \text{ mg.kg}^{-1}$). Nejvyšší nalezená hodnota rtuti byla v ledvinách a to 4,9 mg.kg^{-1} , naopak nejnižší pak ve svalovině 0,145 mg.kg^{-1} .

Graf č. 1. Obsah celkové rtuti v jednotlivých vzorcích ve třech tkáních kormorána velkého v lokalitě Krogulna



Liver=játra; kidney=ledviny; muscle=svalovina

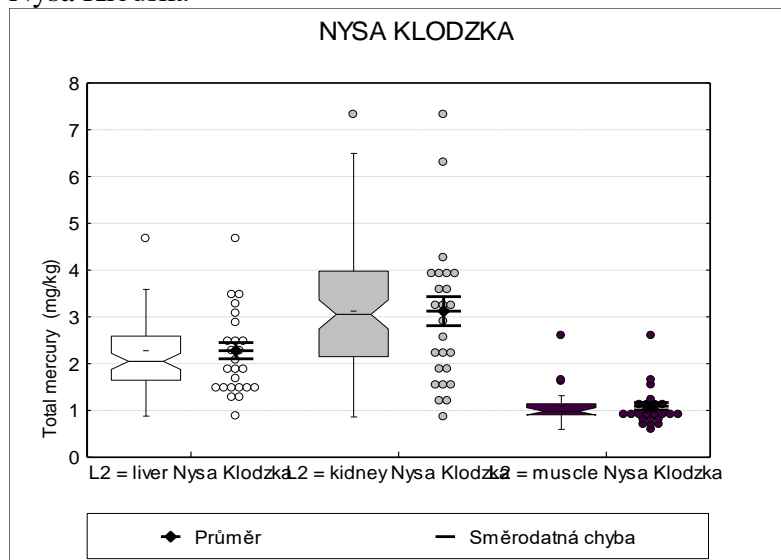
Podle zjištěných výsledků se rtuť akumuluje v orgánech kormorána nejvíce v játrech a ledvinách, což jsou hlavní detoxikační orgány. Obsah rtuti mezi ledvinami a játry se významně neliší ($p=0,8932$). Při porovnání obsahu rtuti v játrech a svalovině je významně vyšší obsah rtuti v játrech ($p=0,0376$). V případě porovnání obsahu rtuti ve svalovině a ledvinách nenajdeme významný rozdíl ($p=0,112$).

Nysa Kłodzka

V lokalitě Nysa Kłodzka bylo analyzováno celkem 25 kormoránů a jednotlivé výsledky analýz obsahu rtuti jsou uvedeny v grafu č. 2. Nejnižší průměrné hodnoty byly zjištěny ve svalovině kormoránů $1,09\pm 0,4 \text{ mg.kg}^{-1}$, dále v játrech $2,28\pm 0,867 \text{ mg.kg}^{-1}$ a nejvyšší v ledvinách $3,12\pm 1,55 \text{ mg.kg}^{-1}$. Zatímco obsah rtuti v játrech a ledvinách není mezi sebou statisticky významně rozdílný

($p=0,330$), tak obsah rtuti ve svalovině je významně nižší než v ledvinách ($p=0,000$) i v játrech ($p=0,000$). Nejvyšší nalezená hodnota rtuti byla v ledvinách a to $7,32 \text{ mg.kg}^{-1}$, naopak nejnižší ve svalovině $0,59 \text{ mg.kg}^{-1}$.

Graf č. 2. Obsah celkové rtuti v jednotlivých vzorcích ve třech tkáních kormorána velkého z lokality Nysa Kłodzka



Liver=játra; kidney=ledviny; muscle=svalovina

Porovnání lokalit

Souhrnné výsledky pro obsah rtuti v jednotlivých sledovaných orgánech pro obě lokality jsou uvedeny v tabulce č. 1. Zcela nejvyšší hodnota rtuti byla zjištěna v ledvinách kormorána z lokality Nysa Kłodzka ($7,32 \text{ mg.kg}^{-1}$). Při porovnání obsahu rtuti v jednotlivých orgánech z obou lokalit mezi sebou bylo zjištěno, že se obsah rtuti v obou lokalitách vysoce významně liší (tab. č. 2). Rozdíly mezi sledovanými lokalitami jsou vyobrazeny v grafu č. 3.

Tab. č. 1. Souhrnné charakteristiky obsahu THg ve tkáních kormorána velkého ze sledovaných lokalit

	játra K	játra NK	ledviny K	ledviny NK	svalovina K	svalovina NK
Průměr	1,33	2,28	1,39	3,12	0,58	1,09
Medián	0,89	2,05	0,74	3,05	0,44	0,98
Rozptyl	1,13	0,75	2,03	2,41	0,15	0,16
Směrodatná odchylka	1,063	0,867	1,426	1,551	0,382	0,400
Směrodatná chyba	0,238	0,173	0,319	0,310	0,085	0,080
Variační koeficient	0,801	0,381	1,025	0,497	0,658	0,366
Minimum	0,233	0,879	0,180	0,861	0,145	0,594
Maximum	4,015	4,670	4,903	7,322	1,401	2,598

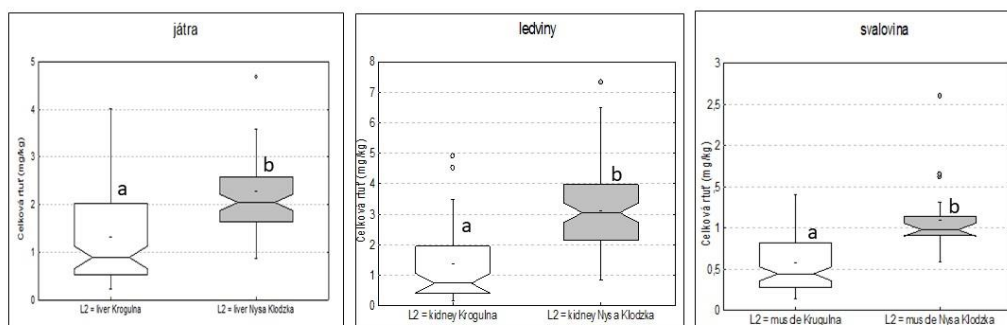
K: Krogulna; NK: Nysa Kłodzka

Tab. č. 2. Výsledek Mann-Whitney testu pro porovnání obsahu rtuti ve tkáních mezi sledovanými lokalitami

orgán	p (Mann-Whitney test)
játra	0,0018
svalovina	0,0002
ledviny	0,0002

p=hladina pravděpodobnosti

Graf č. 3. Porovnání průměrného obsahu celkové rtuti v jednotlivých orgánech mezi dvěma sledovanými lokalitami.



Diskuze

Vysoké hodnoty celkové rtuti v játrech a ledvinách jsou publikovány u rybožravých ptáků jako jsou kormoráni (Houserová, et al., 2007; Misztal-Skudlińska et al., 2011). Na lokalitě Krogulna byly zjištěny podobné hodnoty rtuti v játrech jako v práci Krále et al. (2017) u kormoránů pocházejících z třeboňských rybníků v České republice ($2,12 \pm 0,22 \text{ mg.kg}^{-1}$), které jsou také považovány za nezatížené rtutí. U kormoránů z třeboňských rybníků zjistili také signifikantní rozdíl mezi obsahem THg v játrech a svalovinou. Král et al. (2017) dále uvádí, že kormorán má potenciál akumulovat rtuť v orgánech, přičemž ve svalovině se jedná až o 35krát vyšší obsah v porovnání obsahu rtuti ve svalovině kapra obecného. Obsah rtuti ve svalovině kormorána velkého z lokality Nysa Kłodzka je shodný s výsledky obsahu rtuti ve svalovině kormoránů odlovených v Maďarsku (Lehel et al., 2021). Obsah rtuti v kormoránech ze dvou sledovaných lokalit v Polsku se snižuje následovně: ledviny > játra > svalovina. Ke stejným závěrům došli i Misztal-Skudlińska et al. (2011), kteří ve své práci doplňují, že není rozdíl v obsahu rtuti mezi pohlavími. Vysoké obsahy rtuti jsou dále nalézány v peří kormoránů (Misztal-Skudlińska et al., 2000). Průměrný obsah rtuti v peří byl $7,14 \pm 3,99 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1} \text{ d.w.}$ u kormoránů pocházejících z jezera Vistula v Polsku.

V lokalitě Krogulna je obsah rtuti v játrech, ledvinách i svalovině kormoránů vysoce významně nižší, než je tomu v lokalitě Nysa Kłodzka (graf č. 3). Z práce Martyniaka et al. (2013) vyplývá, že kormoráni v této lokalitě mají poměrně jednotvárnou a stálou potravu. Jedná se převážně o kapry obecné z rybářské farmy. Na této lokalitě dochází k tomu, že kormoráni lovíci zde jsou vystavováni pravidelně velmi nízkému obsahu rtuti, neboť v kaprech nedochází k její přílišné akumulaci. To je způsobeno postavením kapra v potravinovém řetězci a jeho potravinovými zvyky, kdy kapr se živí zejména planktonem a nedochází k akumulaci rtuti v jeho těle. Naproti tomu na lokalitě Nysa Kłodzka mají kormoráni možnost pestré stravy. Martyniak et al. (2013) uvádí, že v trávicím traktu kormoránů z této lokality byla zjištěna pestrá škála ulovených druhů ryb. Mezi obsádku řeky Nysa patří běžně dravci jako štika a okoun, ale i plotice či ježdík. Kormoráni tak mohou lovit jak dravé, tak nedravé ryby. Kormoráni na této lokalitě jsou tak vystavováni různým hladinám rtuti v rybách, kterými se živí. Není zde proto možné jednoznačné říci, jaké je složení jejich potravy z pohledu rtuti. Ackerman et al. (2016) uvádí, že koncentrace rtuti v krvi ptáků se liší mezi druhy s rozličnou potravou, a ptáci, kteří se živí rybami na vyšších trofických úrovních mají vyšší koncentrace rtuti v důsledku biomagnifikace

rtuti v potravních řetězcích, což je v souladu s našimi výsledky. Klapstein and O'Driscoll (2018) potvrzuje také biomagnifikaci v závislosti na věku ptáků. Ačkoliv jsou obě sledované lokality považovány za rtutí nezatíženou, byl zjištěn vysoce významný rozdíl v obsahu rtuti mezi jednotlivými sledovanými orgány. To je v souladu se závěry Misztal-Szkudlińska et al., 2011, že dochází k biomagnifikaci rtuti v kormoránech ve vztahu k jejich kořisti. Rybožraví ptáci se jeví jako vhodným bioindikátorem zatížení vodního prostředí rtutí.

Závěr

Obsah celkové rtuti v kormoránech klesá následovně: ledviny > játra > svalovina a to na obou sledovaných lokalitách. Množství rtuti v jednotlivých orgánech mezi lokalitami se významně liší a to i přesto, že obě lokality jsou považovány za rtutí nezatížené. Akumulace rtuti je tedy závislá na rozdílné obsádce ryb na lokalitách, a tedy i odlišné potravě, čímž dochází k odlišné akumulaci rtuti v organismech kormoránů.

Tato práce byla financovaná grantem 2021/ITA/22 VETUNI.

Literatura

- Ackerman, J.T., Eagles-Smith, C.A., Perzog, M., Hartman, C.A., Peterson, S.H., Evers, D.C., Jackson, A.K., Elliott J.E., Vander pol, S.S., Bryan C.E. 2016. Avian mercury exposure and toxicological risk across western North America: A synthesis. *Science of The Total Environment* 568: 749–769.
- Lehel, J., Grúz, A., Bartha, A., Pintér, I., Major, L., Menyhárt, L., Szabó R., Budai P. 2021. Comparison of meta burden in different muscle tissue of Great cormorant (*Phalacrocorax carbo*). *Environmental Science and Pollution Research*. Published online, 09 August 2021.
- Misztal-Szkudlińska, M., Szefer, P., Konieczka, P., Mamieśnik, J. 2012. Mercury in different feather types from great cormorants (*Phalacrocorax carbo*) inhabiting the Vistula Lagoon ecosystem in Poland. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 89: 841–844.
- Burger, J., Gochfeld, M. 1997. Risk, mercury levels, and birds: Relating adverse laboratory effects to field biomonitoring. *Environmental Research* 75: 160–172.
- EEA report 11/2018(2018) ISBN: 978-92-9213-984-1, ISSN: 1977-8449, doi: 10.2800/558803
- Evers, D.C., Savoy, L.J., DeSorbo, C.R., Yates, D.E., Hanson, W., Taylor, K.M., Siegel, L.S., Cooley Jr., J.H., Bank, M.S., Major, A., Munney, K., Mower, B.F., Vogel, H.S., Schoch, N., Pokras, M., Goodale, M.W., Fair, J. 2008. Adverse effects from environmental mercury loads on breeding common loons. *Ecotoxicology* 17: 69–81.
- Houserová, P., Hedvábny, J., Matejcek, D., Kracmar, S., Sitko S., Kuban V. 2005. Determination of total mercury in muscle, intestines, liver and kidney tissues of cormorant (*Phalacrocorax carbo*), great crested grebe (*Podiceps cristatus*) and Eurasian buzzard (*Buteo bueto*). *Veterinary Medicine-Czech* 50: 61–68.
- Furness, R.W., Muirhead, S.J., Woodburn, M. 1986. Using bird feathers to measure mercury in the environment: Relationships between mercury content and moult. *Marine Pollution Bulletin* 17: 27–30.
- Furtado, R., Pereira, M.E., Granadeiro, J.P., Catry, P. 2019. Body feather mercury and arsenic concentrations in five species of seabirds from the Falkland Islands. *Marine Pollution Bulletin* 149: 110574.
- Harari, R., Harrari, F., Gerhardsson, L., Lundh, T., Skerfving, S., Broberg, K. 2012. Exposure and toxic effects of elemental mercury in gold-mining activities in Ecuador. *Toxicology Letters* 213: 75–82.
- Kaler, R.S.A., Kenney, L.A., Bond, A.L., Eagles-Smith, C.A. 2014. Mercury concentrations in breast feathers of three upper trophic level marine predators from the western Aleutian Islands, Alaska. *Marine Pollution Bulletin* 82: 189–193.
- Karagas, M.R., Choi, A.L., Oken, E., Horvat, M., Schoeny, R., Kamai, E., Cowell, W., Grandjean, P., Korrick, S. 2012. Evidence on the human health effects of low-level methylmercury exposure. *Environmental Health Perspectives* 120: 799–806.

- Klapstein, S.J., O'Driscoll, N.J. 2018. Methylmercury biogeochemistry in freshwater ecosystems: a review focusing on DOM and photodemethylation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 100: 14–25.
- Martyniak, P.H., Szymańska, U., Stańczak, K., Gomulka, P., Król, J. 2013. Próba oszacowania presji kormorana czarnego *Phalacrocorax carbo* (L. 1758) na ichofaunę wód na terenie Stowarzyszenia Lokalna Grupa Rybacka „Opolszczyzna” oraz Stowarzyszenia Lokalna Grupa Rybacka „Żabi Kraj”. ISBN 978-83-939958-0-6
- Rutkiewicz, J., Nam, D.H., Cooley, T., Neumann, K., Bueno Padilla, I., Route, W., Strom, S., Basu, N. 2011. Mercury exposure and neurochemical impacts in bald eagles across several Great Lakes states. *Ecotoxicology* 20: 1669–1676.
- Wang, W.X. 2012. Biodynamic understanding of mercury accumulation in marine and freshwater fish. *Advances in Environmental Research* 1: 15–35.

Posouzení dopadu kontaminace vodního prostředí rtuťí na zdraví živočichů vázaných na vodu na základě hodnocení obsahu rtuťí u kapra obecného

Kamila Novotná, Zuzana Šíroková, Zdeňka Svobodová

Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI

Abstrakt

Rtuť je přirozeně se vyskytující prvek pocházející ze zemské kůry, který se uvolňuje do životního prostředí, hlavně vodních zdrojů. Expozicí z vnějšího prostředí a přes potravní řetězec se dostává rtuť do živých organismů. Cílem této studie bylo zhodnotit celkový obsah rtuťí ve tkáních (svalovina, slezina, ledvina, játra, šupiny, gonády) kapra obecného (*Cyprinus carpio*) ulovených ve třech rybnících (Jaroslavický, Strachotínský, Vrkoč) nacházejících se v povodí řeky Moravy v České republice. Celková rtuť byla stanovena metodou atomové absorpční spektrometrie na přístroji AMA 254. Nejvyšší průměrný obsah rtuťí v rybníku Jaroslavický byl zjištěn ve svalovině, naopak nejnižší v mozku. Obsah rtuťí mezi jednotlivými orgány ryb ze stejné lokality vykazoval statisticky významný rozdíl. Nejvyšší průměrné hodnoty rtuťí v případě rybníka Vrkoč byly zjištěny ve svalovině, naopak nejnižší v gonádách. Na lokalitě Strachotín se rtuť v kaprech také nejvíce kumulovala ve svalovině, naopak nejméně rtuťí bylo nalezeno opět v šupinách, gonádách a mozku. V obou lokalitách byly také zjištěny statisticky významné rozdíly v obsahu rtuťí mezi sledovanými orgány. Pro porovnání jednotlivých lokalit byl použit obsah rtuťí ve svalovině ryb, neboť na všech lokalitách zde byl nejvyšší obsah rtuťí. Statistickým porovnáním bylo zjištěno, že jednotlivé lokality mezi sebou vykazují významný rozdíl, nejvyšší hodnoty byly naměřeny ve Strachotínském rybníce. Nicméně hodnoty obsahu rtuťí ve svalovině ve všech případech vyhověly hygienickému limitu do 0,5 mg/kg, což znamená, že rtuť nepředstavuje riziko pro konzumenty těchto komerčně chovaných ryb, ani nedochází k poškození životního prostředí těchto ryb nadměrnou kontaminací rtuťí. Zdraví ryb tedy obsahem rtuťí ve sledovaných rybnících není nijak negativně ovlivněno.

Úvod

Rtuť je přirozeně se vyskytující prvek pocházející ze zemské kůry, který se uvolňuje do životního prostředí jak v důsledku lidské činnosti i přírodních procesů (Pacyna a Pacyna, 2005). Jeho hladiny jsou pečlivě sledovány jak v biotické, tak v abiotické části životního prostředí, aby se vyhodnotila možná rizika vyplývající z rostoucích koncentrací. Expozicí z vnějšího prostředí a přes potravní řetězec se dostává rtuť do živých organismů (Abdel-Rasu et al, 2013). Obsah rtuťí v rybách je velmi proměnlivý a závisí na mnoha okolnostech. Bez ohledu na obsah rtuťí a její biologickou dostupnost v životním prostředí ryb, které jsou nejdůležitějšími faktory, hrají důležitou roli i druhy ryb a jejich postavení v potravinovém řetězci. Obsah rtuťí v rybách však vždy odráží kontaminaci místa odběru vzorků z důvodu schopnosti rtuťí, zejména jejích organických forem, hromadit se v živých organismech (Wang a Wang, 2012). Studie uvádějí, že řada onemocnění centrálního nervového systému, jakož i arytmie, kardiomyopatie či poškození ledvin jsou spojeny s expozicí rtuťí (Harari et al., 2012). Rtuť jako kontaminující látka je sledována v potravinách a v nařízení č. 1881/2016 je obsah rtuťí v potravinách povolen v maximálním limitu (0,5 mg.kg⁻¹) ve svalovině nedravných druhů ryb (Nařízení EP a R 1881/2016).

Cílem této studie bylo zhodnotit celkový obsah rtuťí ve tkáních (svalovina, slezina, ledvina, játra, šupiny, gonády) kapra obecného (*Cyprinus carpio*) ulovených ve třech rybnících nacházejících se v povodí řeky Moravy v České republice (Jaroslavický, Strachotín a Vrkoč).

Dílčím cílem bylo zhodnotit, zda existuje rozdíl v akumulaci rtuťí v jednotlivých orgánech kapra a porovnat obsah rtuťí v kaprech na sledovaných lokalitách mezi sebou.

Materiál a metodika

Sledované lokality

Jaroslavický rybník (též nazývaný Zámecký rybník) je druhý největší na Moravě. Nachází se asi 17 km jihovýchodně od města Znojma, u malé pohraniční obce Jaroslavice. Je provozován komerčním rybníkářstvím a slouží k chovu kaprů a jiných ryb. Napájení a odtok vody zajišťuje Dyjsko-mlýnský náhon, postranní kanál řeky Dyje. Má rozlohu 245 ha.

Strachotínský rybník je rybník lokalizovaný vedle obce Strachotín v těsném sousedství vodní nádrže Nové Mlýny. Rybník má rozlohu 54,5ha a je využíván komerčním rybníkářstvím k chovu kapra a dalších ryb. Zdrojem vody je bezejmenný levostranný přítok řeky Dyje.

Vrkoč je druhý největší rybník v soustavě Pohořelických rybníků. Patří mezi největší i v rámci České republiky. Nachází se mezi obcí Ivaň a vesnicí Nová Ves. Vodní plocha má rozlohu 156 ha. Rybník je napájen z Mlýnského náhonu Cvrčovice, který odebírá vodu z řeky Jihlavy. Rybník je opět ve vlastnictví komerčního rybníkářství a je určen k chovu kapra.

Tabulka č. 1. Popisné charakteristiky kaprů obecných pocházejících z rybníku Jaroslavický, Strachotín a Vrkoč v roce 2020.

rybník	pohlaví	hmotnost (kg)	délka těla (cm)	délka celkem (mm)
Jaroslavický	M	2,66	43,3	50
	F	2,66	42,7	49,5
	M	2,34	43	50
	M	2,56	42,3	49,6
	M	2,08	39,5	46,2
	M	2,5	44	52
	M	2,5	41,5	50
	F	2,86	46	54
	F	2,84	46,5	55
	M	2,38	40	48,5
Strachotín	M	2,84	42	49
	M	2,24	42	49
	F	2,54	44	50
	M	2,52	43	50
	F	2,52	43,7	51
	M	1,8	39	47
	M	2,34	43	49,9
	F	2,4	44	52
	M	2,44	41	49
	M	2,4	42,5	50
Vrkoč	M	2,7	45,5	53
	F	2,74	46,5	55
	M	2,76	45,5	53
	F	3,36	47	54
	F	2,5	45,8	54
	F	2,66	46	55
	M	2,7	44,7	52
	F	2,74	48	58
	M	3,04	46,3	56
	M	2,92	47,1	56

Odběr vzorků

V rámci výlovů jednotlivých rybníků, které provádělo Rybníkářství Pohořelice a. s., byly zakoupeny vzorky usmrcených kaprů obecných (*Cyprinus carpio*). Z každého rybníku bylo získáno 10 ks ryb. Ryby byly na ledu odvezeny do laboratoře, kde byly zváženy, změřeny a bylo určeno pohlaví. Dále byly z ryb odebrány jednotlivé vzorky tkání tkáních (svalovina, slezina, ledvina, játra, šupiny, gonády). Tyto byly následně označeny a vloženy do polyethylenových sáčků a skladovány až do analýzy při -18 °C. Základní charakteristiky odebraných ryb jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Analýza celkové rtuti (THg)

Celková rtuť byla stanovena metodou atomové absorpční spektrometrie na přístroji AMA 254 (Altec Ltd. Dvůr Králové nad Labem, Česká republika). Při samotné analýze byly jednotlivé vzorky bez předchozí přípravy po rozmrazení naváženy a vloženy do spalovací lodičky přístroje AMA 254 k analýze. Každý vzorek byl měřen minimálně dvakrát. Limit detekce přístroje je 1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Přesnost měření byla validována za pomoci referenčního materiálu NIST- 2976 (Mussle Tissues). Obsah celkové rtuti je vyjádřen v mg.kg^{-1} čerstvé tkáně.

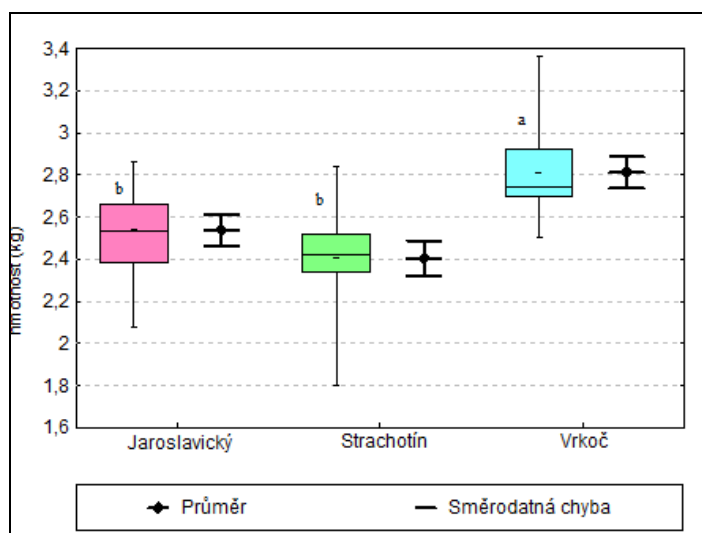
Data a statistická analýza

Zjištěná data byla zpracována do tabulek za pomoci programu Microsoft Word a Microsoft Excel (MS Office 365) a statistická analýza byla provedena v programu Unistat for Excel 6.5. Nejdříve byla data z jednotlivých rybníků a tkání podrobena testu normality (Shapiro-Wilkův test). Jednalo se o data s normálním i nenormálním rozdělením, tudíž byly použity dále neparametrické testy. Pro hodnocení rozdílů obsahu rtuti v jednotlivých orgánech mezi sebou v rámci jedné lokality byla použita Kruskal Wallis jednofaktorová ANOVA-Tukey HSD test. Pro hodnocení obsahu rtuti mezi lokalitami byl použit Mann-Whitněv test.

Výsledky

Zjištěná data obsahu rtuti byla od celkem 30 ryb byla statisticky analyzována. Hmotnost ryb z rybníka Vrkoče byla významně větší, než u ryb rybníka Jaroslavický ($p=0,0187$) a Strachotín ($p=0,0025$) (graf č. 1). Základní statistické charakteristiky obsahu rtuti jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Graf č. 1. Porovnání hmotnosti ryb ze sledovaných rybníků.

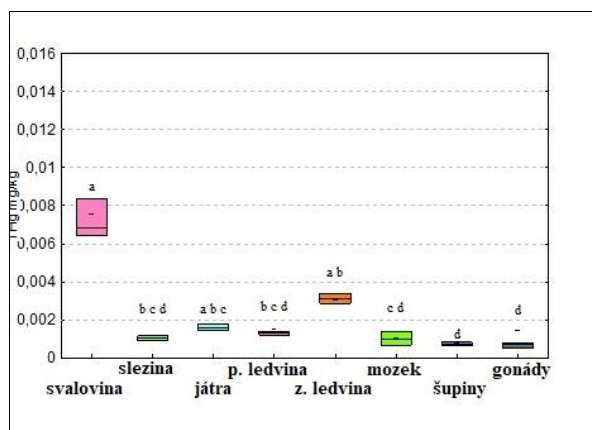


Tabulka č. 2. Základní statistické charakteristiky obsah celkové rtuti (mg.kg^{-1}) pro jednotlivé sledované orgány z rybníků jaroslavický, Strachotín a Vrkoč.

THg mg.kg^{-1}										
Jaroslavický	svalovina	slezina	p.		z.		játra	šupiny	gonády	mozek
			ledvina	ledvina	ledvina	ledvina				
průměr	0,0075	0,0011	0,0015	0,0031	0,0016	0,0008	0,0015	0,0010		
medián	0,0068	0,0010	0,0013	0,0031	0,0016	0,0007	0,0007	0,0010		
směrodatná odchylka	0,0028	0,0002	0,0007	0,006	0,0003	0,0003	0,0026	0,0004		
minimum	0,0046	0,0008	0,0012	0,0018	0,0012	0,0005	0,0004	0,0006		
maximum	0,0145	0,0014	0,0034	0,0040	0,0021	0,0014	0,0089	0,0016		
Strachotín	svalovina	slezina	ledvina		játra	šupiny	gonády	mozek		
průměr	0,0129	0,0020	0,0046	-	0,0024	0,0039	0,0008	-		
medián	0,0127	0,0020	0,0042	-	0,0023	0,0007	0,0008	-		
směrodatná odchylka	0,0043	0,0005	0,0010	-	0,0004	0,0103	0,0003	-		
minimum	0,0060	0,0011	0,0031	-	0,0020	0,0004	0,0006	-		
maximum	0,0192	0,0027	0,0060	-	0,0032	0,0333	0,0016	-		
Vrkoč			p.		z.					
	svalovina	slezina	ledvina	ledvina	játra	šupiny	gonády	mozek		
průměr	0,0068	0,0023	0,0014	0,0028	0,0018	0,0007	0,0007	-		
medián	0,0065	0,0015	0,0013	0,0025	0,0017	0,0006	0,0005	-		
směrodatná odchylka	0,0023	0,0022	0,0006	0,0014	0,0005	0,0002	0,0005	-		
minimum	0,0040	0,0011	0,0009	0,0017	0,0010	0,0004	0,0004	-		
maximum	0,0112	0,0086	0,0029	0,0068	0,0027	0,0010	0,0020	-		

Nejvyšší průměrný obsah rtuti v rybníku Jaroslavický byl zjištěn ve svalovině, naopak nejnižší v mozku. Obsah rtuti mezi jednotlivými orgány ryb ze stejné lokality vykazoval významný rozdíl. Jednotlivé rozdíly mezi sledovanými tkáněmi jsou vyznačeny v grafu č.21. Vysoce významně vyšší obsah rtuti byl zjištěn ve svalovině ($p=0,0000$) a zadní ledvině ($p=0,0002$) ve srovnání se šupinami kaprů z Jaroslavického rybníka.

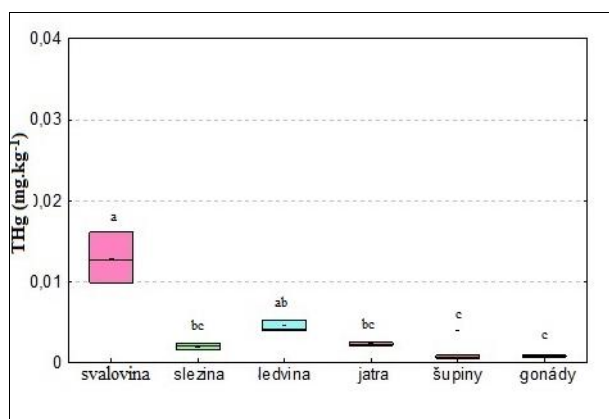
Graf č. 2. Průměrný obsah celkové rtuti ve tkáních kapra obecného (*Cyprinus carpio*) z rybníku Jaroslavický



a, b, c, d= skupiny s odlišnými indexy se statisticky významně liší

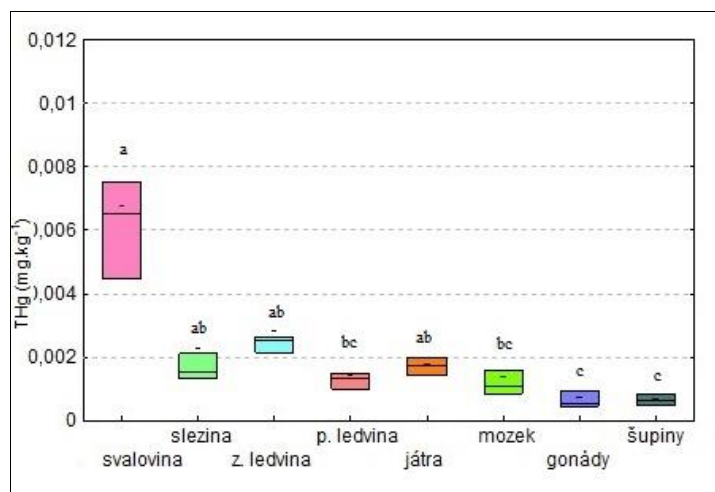
Na lokalitě Strachotín se rtuť v kaprech také nejvíce ukládá do svaloviny, naopak nejméně rtuti nacházíme opět v šupinách, gonádách a mozku. Statisticky významné rozdíly v obsahu rtuti mezi sledovanými orgány jsou uvedeny v grafu č. 3. Vysoce významně vyšší obsah rtuti byl zjištěn ve svalovině oproti gonádám a šupinám ($p=0,0000$) a také v obsahu rtuti v ledvinách ve srovnání se gonádami ($p=0,0005$) a šupinami ($p=0,0009$) kaprů z rybníka Strachotín.

Graf č. 3. Průměrný obsah celkové rtuti ve tkáních kapra obecného (*Cyprinus carpio*) z rybníku Strachotín



a, b, c= skupiny s odlišnými indexy se statisticky významně liší

Graf č. 4. Průměrný obsah celkové rtuti ve tkáních kapra obecného (*Cyprinus carpio*) z rybníku Vrkoč



a, b, c= skupiny s odlišnými indexy se statisticky významně liší

Nejvyšší průměrné hodnoty rtuti v případě rybníka Vrkoč byly zjištěny ve svalovině, naopak nejnižší opět v gonádách. Rozdíly mezi sledovanými orgány jsou zobrazeny v grafu č. 4. Vysoce významně vyšší obsah rtuti byl zjištěn ve svalovině ($p=0,0000$) a zadní ledvině ($p=0,0001$) ve srovnání se šupinami kaprů z rybníka Vrkoč.

Diskuze

Nejvyšší obsah rtuti byl zjištěn ve svalovině kapra z rybníka Jaroslavický, naopak nejnižší pak v mozku. Mezi sledovanými orgány byl zjišťován významný rozdíl, v některých případech i vysoce významný. Na námi sledovaných lokalitách rybníků Jaroslavický, Strachotín a Vrkoč byly nacházeny hodnoty rtuti mnohonásobně nižší, než je stanovený limit pro obsah rtuti daný nařízením EP a R č. 1881/2006. Maximální limit je stanoven pro nedravné ryby $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$. Hodnoty rtuti ve svalovině odpovídají nezatíženým lokalitám a také postavení kapra v potravinovém řetězci.

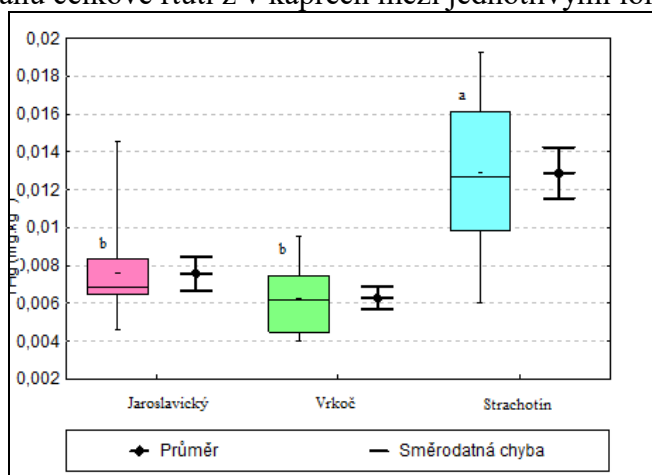
Na sledovaných lokalitách jsou zjištěné výsledky shodné se studiemi prováděnými na volných vodách ČR na kaprech (Vicarova et al., 2014). Výsledky obsahu rtuti z naší studie jsou shodné také se zjištěním Maršálka et al. (2007), kteří sledovali obsah celkové rtuti v játrech, gonádách a svalovině kaprů obecných odlovených z rybníků ČR nebo s výsledky studie provedené Kimákovou et al. (2018) u kaprů z volných vod Slovenska. Výsledky jsou shodné i s obsahem rtuti ve studiích s jelcem tloušťem (*Leuciscus cephalus*) tedy také nedravnou rybou (Kružíková et al. 2008a; Kružíková et al. 2008b). Data studie jsou shodná se zjištěním Havelkové et al. (2008), kde je hodnocen index mezi obsahem rtuti v játrech a svalovině, kde v nezatížených lokalitách je více rtuti ve svalovině než

v játrech. Naopak u lokalit zatížených se jedná o poměr opačný, kdy se při vyšším obsahu rtuti ve vodním prostředí akumuluje rtuť spíše do jater.

Obsah rtuti v orgánech kapra klesá následovně: svalovina > játra > zadní ledvina/ přední ledvina > slezina > mozek > gonády/šupiny. Mezi sledovanými orgány byl zjišťován významný rozdíl, což svědčí o rozdílném ukládání rtuti v jednotlivých orgánech organismu ryb. Pro porovnání jednotlivých lokalit byl použit obsah rtuti ve svalovině ryb, neboť na všech lokalitách zde byl nejvyšší obsah rtuti. Porovnáním bylo zjištěno, že jednotlivé lokality mezi sebou vykazují významný rozdíl v obsahu rtuti ve svalovině, liší se rybník Strachotín od rybníků Jaroslavický ($p=0,0065$) a Vrkoče ($p=0,0025$). (graf. č. 5). Zároveň pak v případě rybníka Strachotín však byla prokázána negativní korelace (Spearmanův koeficient $-0,604$; $p=0,0332$) mezi hmotností ryb a obsahem rtuti ve svalovině. V případě porovnání vztahu obsahu rtuti s hmotností ryb bez ohledu na lokalitu byla potvrzena negativní korelace (Spearmanův korelační koeficient $-0,5768$; $p=0,0011$).

Podle zjištěných výsledků obsahu rtuti lze usuzovat, že rtuť nepředstavuje riziko pro konzumenty těchto komerčně chovaných ryb a ani zdraví ryb ve sledovaných rybnících není nijak negativně ovlivněno.

Graf č. 5. Porovnání obsahu celkové rtuti z v kaprech mezi jednotlivými lokalitami.



a, b = skupiny s odlišnými indexy se statisticky významně liší

Závěr

Z výsledků provedených analýz tržních kaprů vyplývá, že rybníky v povodí řeky Moravy (Jaroslavický, Strachotín, Vrkoč) nejsou zatíženy rtutí. Svědčí o tom nízké hodnoty obsahu celkové rtuti ve svalovině (hluboko pod platným hygienickým limitem $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$), dále poměr mezi obsahem celkové rtuti ve svalovině a játrech (několika násobně vyšší obsah ve svalovině ve srovnání s obsahem v játrech) a negativní korelace mezi hmotností kaprů a obsahem celkové rtuti ve svalovině. Ryby jsou významným indikátorem zatížení prostředí rtutí.

Tato práce byla financovaná grantem 2021ITA22 VETUNI.

Literatura

- Abdel-Rasul, G.M., Abu-Salem, Manal M.A., Al-Batanony, A., Al-Dalatony M.A., Allam, H.K. 2013. Neurobehavioral, respiratory, and auditory disorders among mercury-exposed fluorescent lamp workers. *Menoufia Medical Journal* 26: 58-62.
- Havelková, M., Dušek, L., Némethová, D., Poleszczuk, Svobodová, Z. 2008. Comparison of mercury distribution between liver and muscle – a biomonitoring of fish from lightly and heavily contaminated localities. *Sensors* 8: 4095-4109.
- Harari, R., Harrari, F., Gerhardsson, L., Lundh, T., Skerfving, S., Broberg, K. 2012. Exposure and toxic effects of elemental mercury in gold-mining activities in Ecuador. *Toxicology Letters* 213: 75-82.

- Kimáková, T., Kuzmová, L., Nevolná, Z., Bencko, V. 2018. Fish and fish products as risk factors of mercury exposure. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 25: 488-493.
- Kružiková K., Svobodová, Z., Valentová, O., Randák, T., Velíšek, P. 2008a. Mercury and methylmercury in muscle tissue of chub from the Elbe river main tributaries. *Czech Journal of Food Sciences* 26: 65-70.
- Kružiková, K., Randák, t., Kenšová, R., Kroupová, H., Leontovyčová, D., Svobodová, Z. 2008b. Mercury and metyhmercury concentration in muslce tissue of fish caught in major rivers of the Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno* 77: 637-643.
- Maršálek P., Svobodová, Z., Randák, T. 2007. The content of total mercury and methylmercury in common carp from selected Czech ponds. *Acuaculture International* 15: 299-304.
- Nariadení komise (ES) č. 1881/2016 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách.
- Pacyna, E.G., Pacyna, J.M., Sundseth K., Munthe, J., Kindbom, K., Wilson, S. Steenhuisen, F., Maxson, P. 2010. Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020. *Atmospheric Environment* 44: 2487-2499.
- Vicarova, P., Kleckerova, A., Docekalova, H., Pelcova, P. Heavy metals in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) from two reservoirs in the Czech Republic. In: *Mendel Net* 2014, 522-525.
- Wang, W.X. 2012. Biodynamic understanding of mercury accumulation in marine and freshwater fish. *Advances in Environmental Research* 1: 15-35.

Vliv estrogenů na změny vybraných biochemických markerů se zaměřením na hodnocení endokrinní disrupce u triploidních jedinců dánia pruhovaného (*Danio rerio*)

Zuzana Weiserová¹, Jana Blahová¹, Veronika Doubková¹, Petr Maršálek¹, Roman Franěk²,
Martin Pšenička², Zdeňka Svobodová¹

¹Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, ²Laboratoř zárodečných buněk, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Abstrakt

V rámci naší studie bylo provedeno sledování vlivu ethinylestradiolu (EE2), semisyntetického estrogenu běžně užívaného v orální antikoncepci, na celosamčí triploidní populaci dánia pruhovaného (*Danio rerio*). Byly realizovány dva dílčí experimenty, ve kterých byl sledován účinek EE2 aplikovaného ve vodě (10 ng/l) a v krmivu (10 a 1 000 ng/kg). Po chronické expozici, která trvala 14 týdnů v případě aplikace do vody a 6 týdnů v případě aplikace testované látky do krmiva, byla sledována míra indukce vitellogeninu. V případě testování účinků EE2 podávaného v krmivu byly dále posuzovány změny aktivit vybraných antioxidantních a detoxikačních enzymů v celotělních homogenátech. V obou experimentech byl prokázán signifikantní nárůst koncentrace vitellogeninu po expozici EE2. Při aplikaci EE2 v krmivu došlo ke statisticky významnému zvýšení vitellogeninu pouze v případě nejvyšší testované koncentrace (1 000 ng/kg). Zároveň u této skupiny bylo zaznamenáno statisticky významné zvýšení mortality a naopak došlo signifikantnímu snížení celkové hmotnosti a délky těla v porovnání s kontrolní skupinou. Dále expozice 1 000 ng/kg EE2 v krmivu vedla ke statisticky významným změnám v aktivitách glutathion-S-transferázy, glutathionperoxidázy i glutathionreduktázy v porovnání s kontrolní skupinou. Skupina exponovaná environmentální koncentrací EE2 (10 ng/kg) v krmivu vykazovala signifikantní změny v porovnání s kontrolou pouze v případě aktivity glutathionreduktázy a celkové hmotnosti.

Úvod

Kontaminanty životního prostředí, které mohou narušit funkci neuroendokrinního systému obratlovců, nazýváme endokrinní disruptory (Hiramatsu et al., 2006). V posledních letech se jedná o intenzivně studovanou problematiku, a to nejen v oblasti vodního ekosystému. V humánní medicíně se dnes využívá odhadem asi 20 různých progestinů (jiným názvem gestagenů, progesteronů, progestagenů), které řadíme mezi endokrinní disruptory. Jedná se o látky, které mají široké spektrum použití. V kauzální medicíně se využívají například k léčbě děložních nádorů nebo při děložním krvácení (Kumar et al., 2015), v preventivní medicíně pak mají nezastupitelnou úlohu v orální antikoncepci. Uvedená léčiva se z organismu běžně vylučují močí a následně dochází k jejich vstupu do odpadních vod. Čistírny odpadních vod často nemají dostatečně efektivní technologie pro jejich kompletní odstranění. Nekompletně přečištěné odpadní vody, které tedy obsahují koktejl těchto látek, následně vstupují do vodního ekosystému a představují potenciální hrozbu pro necílové vodní organismy (Sumpter, 1995). Látky estrogenního charakteru byly zaznamenány celosvětově v různých biotických i abiotických matricích vodního prostředí. Existuje řada vědeckých studií, které potvrzují jejich pozitivní nález v povrchových vodách, sedimentech dna, ale také ve tkáních krevet, měkkýšů či ryb (Liu et al., 2015).

Jak již bylo zmíněno výše, hlavním zdrojem estrogenů ve vodním ekosystému je hormonální antikoncepce. Nejčastěji využívanou účinnou látkou je ethinylestradiol (EE2), což je syntetický derivát estradiolu. Mechanismus účinku EE2 spočívá v inhibici ovulace (Dhont, 2010). Poprvé byla tato sloučenina syntetizována v roce 1938 a v roce 1961 schválil jeho užití v přípravku Anoval® Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food Drug Administration – FDA). Tento schválený přípravek obsahoval 4 mg norethisteronu a 50 mg EE2 (Mears and Grant, 1962). O nově dostupný přípravek byl po jeho uvedení na trh enormní zájem. Bohužel vysoká koncentrace EE2 způsobovala u mnoha konzumentek řadu vedlejších účinků. Během uplynulých šedesáti let došlo k poměrně rozsáhlému

výzkumu v oblasti účinků EE2, což se projevilo především snížením dávky EE2 v antikoncepčních přípravcích a s tím spojených možných nežádoucích efektů (Dhont, 2010).

Existuje široká škála různých diagnostických postupů, které nám umožňují hodnotit přítomnost cizorodých látek v biotických a abiotických složkách vodního prostředí. Pro hodnocení jejich účinků na necílové organismy se provádí různé testy toxicity. Mezi hojně využívané zástupce vodních organismů, které se do testů toxicity zařazují, patří ryby. Jedním z nejrozšířenějších modelových organismů je akvariijní ryba dánío pruhované (*Danio rerio*). V testech toxicity se běžně provádí monitorování řady různých ukazatelů (např. mortalita, morfologické ukazatele, biochemické markery), které nám následně umožňují komplexní zhodnocení potenciálně negativních účinků testovaných kontaminantů (Velíšek, 2018). Nejčastěji se testovaná látka aplikuje ve vodě a simuluje tedy běžné podmínky ve vodním ekosystému (Ortiz-Villanueva et al., 2018; Tyler et al., 1999; Andersen and Holbech, 2003; Žlábek et al., 2009; Maltais and Roy, 2014). Nelze ovšem opomenout fakt, že tyto kontaminanty se v živých organismech mohou také kumulovat. Z uvedeného důvodu se v posledních letech často setkáváme se studii, které sledují právě účinky těchto látek perorální cestou.

Pro hodnocení účinků endokrinních disruptorů u ryb se často jako vhodný biomarker využívá vitellogenin. Vitellogenin je hlavním prekurzorem vaječného žloutku a u samic je běžně tvořen jako odpověď organismu na estrogen produkovaný vaječníky. Proces syntézy vitellogeninu probíhá na základě aktivace hypothalamo-hypofýzo-ovariální osy. Hypothalamus zajišťuje produkci gonadotropin-uvolňujícího hormonu (GnRH). Na tento proces má vliv mnoho endogenních a exogenních faktorů. Patří sem například vrozený biorytmus, výživný stav, sezónní změny fotoperiody a teploty a další. Jako odpověď na působení GnRH začne hypofýza uvolňovat folikuly stimulující hormon, který následně indukuje tvorbu 17 β -estradiolu ze tkáně theca follicula ovariálních folikulů. 17 β -estradiol vyvolá v játrech syntézu vitellogeninu a jeho následné uvolnění do krevního řečiště. Z krevního řečiště vitellogenin difunduje přes bazální membránu a mezibuněčný prostor, mezi buňky zóny granulosa. Přes folikulární buňky se vitellogenin následně dostává do kontaktu s oolemou. Do oocyty pak vstupuje pomocí specifických receptorů, které se nachází na jeho membráně (Reading et al., 2017). Samci mají velmi malé množství estrogenu v těle, proto je u nich produkce vitellogeninu minimální, často pod mezí detekce dané analytické metody (Sumpter, 1995). Na základě mnoha toxikologických výzkumů byla přítomnost vitellogeninu ve tkáních samců a juvenilních jedinců ryb zvolena jako jedna z možností detekce přítomnosti endokrinních disruptorů ve vodním prostředí (Drastichová et al., 2004). Vitellogenin můžeme detekovat v různých matricích. U větších ryb se nejčastěji využívá krevní plazma či sérum, případně jsou popsány studie, které analyzovaly vitellogenin v jaterní tkáni či povrchovém hlenu. U menších ryb, například akvariijních zástupců, se často využívá celotělních homogenátů (Hansen et al., 1998; Maltais and Roy, 2014).

Dánío pruhované se začíná pohlavně diferenciovat kolem 21. dne života a kompletní pohlavní diferenciaci je dokončena 42. den. Brion et al. (2004) sledovali vliv 17 β -estradiolu ve vodě na dánía pruhované s přirozeným poměrem pohlaví ve třech rozdílných věkových kategoriích. U mladších jedinců bylo pro indukci vitellogeninu potřeba vyšších dávek 17 β -estradiolu (100 ng/l) ve srovnání se staršími jedinci (5 až 25 ng/l). Ačkoliv byla tato studie velmi obsáhlá, nepopsala komplexní vliv estrogenních látek po celé období pohlavního dospívání těchto jedinců. Uvedené látky působí na necílové organismy po celou dobu jejich dospívání a následného života z důvodu jejich kontinuálního přísunu do vodního ekosystému. Autoři ve svém experimentu využili přirozeného poměru pohlaví, což ovšem sebou může nést problém, který souvisí s nevyrovnaným poměrem pohlaví. Obtížně odhadnutelnému poměru pohlaví při selekci jiker lze zabránit využitím celosamčí triploidní populace pokusných ryb. Tato ojedinělá charakteristika, kdy se uměle indukovaní triploidi vyvíjí pouze v samce, byla zjištěna právě u dánía pruhovaného (Kavumpurath et al., 1990). Další neopomenutelnou výhodou použití triploidů v testech toxicity je snížení počtu experimentálních zvířat při sledování xenoestrogenních účinků polutantů, protože tímto způsobem do experimentu zahrneme pouze samčí populaci, kterou potřebujeme.

Cílem předkládané studie bylo zhodnocení potenciálně negativního vlivu estrogenu EE2 na změny vybraných biochemických parametrů u triploidních jedinců dánía pruhovaného. V rámci studie

biomarkerů byla pozornost zaměřena především na ukazatele endokrinní disrupce jako je vitellogenin. Byly realizovány dvě dílčí studie, ve kterých byl sledován vliv dlouhodobého působení EE2 na juvenilní a adultní stádia dávia pruhovaného. V rámci prvního experimentu byla testovaná látka podávána ve vodě po dobu 14 týdnů. Ve druhém dílčím experimentu byl EE2 dávkován v krmivu po dobu 6 týdnů. Testovány byly environmentálně relevantní koncentrace a jejich násobky pro zhodnocení efektu dávky a koncentrace.

Materiál a metodika

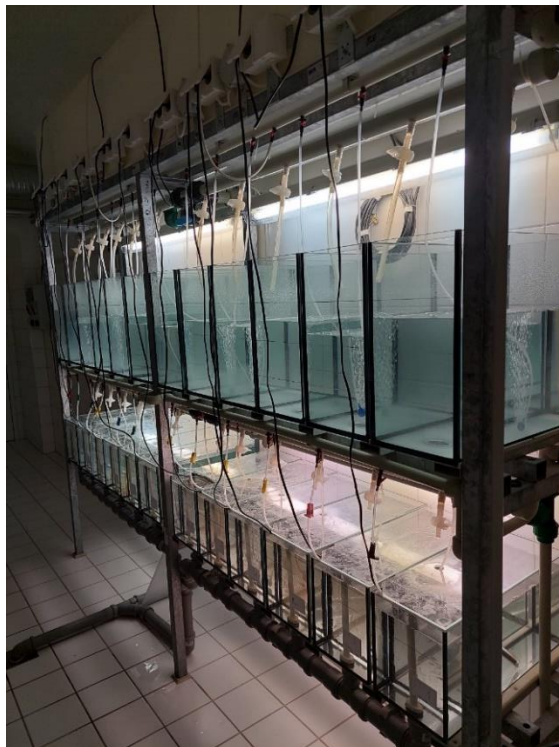
Byly provedeny dva dílčí experimenty s využitím celosamčí triploidní populace dávia pruhovaného. V rámci uvedených experimentů byl sledován chronický účinek EE2 na vybrané biomarkery se zaměřením na endokrinní disrupci. Experiment byl realizován ve spolupráci fakultou Rybářství a ochrany vod ve Vodňanech (Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích), která se problematikou triploidní populace dávia pruhovaného dlouhodobě zabývá. Triploidie byla u jiker dávia pruhovaného indukována pomocí tepelného šoku, konkrétně byla využita teplota 41°C. Teplotní šok byl aplikován 2 minuty po oplození (Franěk et al., 2019) a způsobil retenci jednoho polárního tělíska během buněčného dělení, což vedlo ke vzniku 3n (triploidního) jedince, namísto standartního 2n (diploidního) jedince (Kavumpurath and Pandian, 1990). Kontrola účinnosti triploidie byla provedena po šesti dnech od provedení tepelného šoku, kdy bylo 30 kusů ryb usmrceno (předávkováno MS 222) a byly analyzovány jejich ocasní ploutve. Ověření proběhlo pomocí průtokové cytometrie (Sysmex Partec GmbH, Německo) a zjištěné údaje byly porovnány s výsledky kontrolní (diploidní skupiny). U všech testovaných ryb byla potvrzena úspěšnost indukce triploidie.

V prvním experimentu byla testovaná látka aplikována do vodního roztoku v koncentraci 10 ng/l. Zvolená koncentrace odpovídá environmentálně relevantní hodnotě EE2 v povrchových vodách. Experiment probíhal na Jihočeské univerzitě v Českých Budějovicích (Fakulta rybářství a ochrany vod ve Vodňanech). Roztok EE2 byl připravován každý druhý den, současně s výměnou vodní lázně. Do experimentu byli zařazeni triploidi ve věku 1 týden. Vlastní expozice probíhala po dobu 14 týdnů. V průběhu experimentu byly pravidelně monitorovány základní fyzikálně-chemické parametry vody. Teplota vody byla $26 \pm 0,1^\circ\text{C}$ a světelný režim byl nastaven 14 h světla a 10 h tmy. Krmení probíhalo třikrát denně (ráno/poledne/večer) komerčním krmivem Tetra Min ve formě granulí. Po ukončení experimentu byly ryby zamraženy (-80°C) a následně využity pro analýzu vitellogeninu v celotělním homogenátu.

V druhém experimentu byla testovaná látka aplikována v krmivu. Byly použity dvě různé testované koncentrace – 10 a 1 000 ng/kg. Nižší testovaná koncentrace odpovídá environmentálně relevantní hodnotě, druhá koncentrace byla zvolena jako násobek environmentálně relevantní koncentrace pro zhodnocení vztahu dávky a odpovědi organismu. Experiment byl proveden opět ve spolupráci Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích (Fakulta rybářství a ochrany vod ve Vodňanech), která zajistila produkci triploidní populace. Vlastní experiment ale proběhl na Ústavu ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství (VETUNI Brno). Do experimentu byli zařazeni opět jedinci ve věku 1 týdne, kterým bylo podáváno speciálně připravené krmivo. Příprava krmiva proběhla ve spolupráci s Masarykovou univerzitou (Farmaceutická fakulta). Pro přípravu experimentálního krmiva bylo využito komerčního produktu Gemma Micro 150 (GM 150). V prvním kroku bylo komerční krmivo smícháno s koloidním oxidem křemičitým (Aerosil®200), který slouží jako prevence následné tvorby hrudek. Po důkladném zamíchání bylo ke krmivu přidáno 10 ml zásobního roztoku EE2 připraveného v 96% ethanolu o příslušné koncentraci pro získání experimentálních krmiv o dvou různých koncentracích. Po důkladném promíchání bylo krmivo po 24 hodinách vysušeno. Kontrolní krmivo bylo připraveno pouze smícháním s 10 ml 96% ethanolu, další postup byl shodný s experimentálním krmivem. Vlastní experiment probíhal v průtočném systému (obrázek č. 1) s výměnou vody v 12-hodinových intervalech. Nejprve byla provedena dvoutýdenní aklimatizace a následně bylo po dobu 6 týdnů podáváno testované krmivo. Krmivo bylo podáváno *ad libitum* dvakrát denně (ráno/večer) ve dvanáctihodinových intervalech. Při každém krmení byla zaznamenávána případná mortalita. V pravidelných intervalech byla prováděna kontrola základních fyzikálně-chemických parametrů vody (teplota, pH, obsah kyslíku, koncentrace dusitanů, dusičnanů a

amoniaku). Průměrná teplota vody byla během pokusu $25,8^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Po ukončení experimentu byly ryby usmrceny předávkováním za použití anestetika MS 222 (Tricaine, Tricaine methanesulfonate). Následně byly ryby individuálně zváženy, byla určena délka těla a ryby byly ihned zamraženy a skladovány v hlubokomrazícím boxu (-80°C) do doby vlastní analýzy. Stanovena byla koncentrace vitellogeninu a aktivita vybraných detoxikačních a antioxidačních enzymů (glutathion-S-transferáza – GST, glutathionreduktáza – GR a glutathionperoxidáza – GPx). Pro analýzu vitellogeninu byl využit pouze homogenát připravený ze středu těla (bez hlavy, bez ocasní ploutve). Aktivity enzymů byly prováděny v celotělním homogenátu.

Obrázek č. 1. Průtočný systém pro provádění testů toxicity na dáníu pruhovaném (foto: MVDr. Zuzana Weiserová).



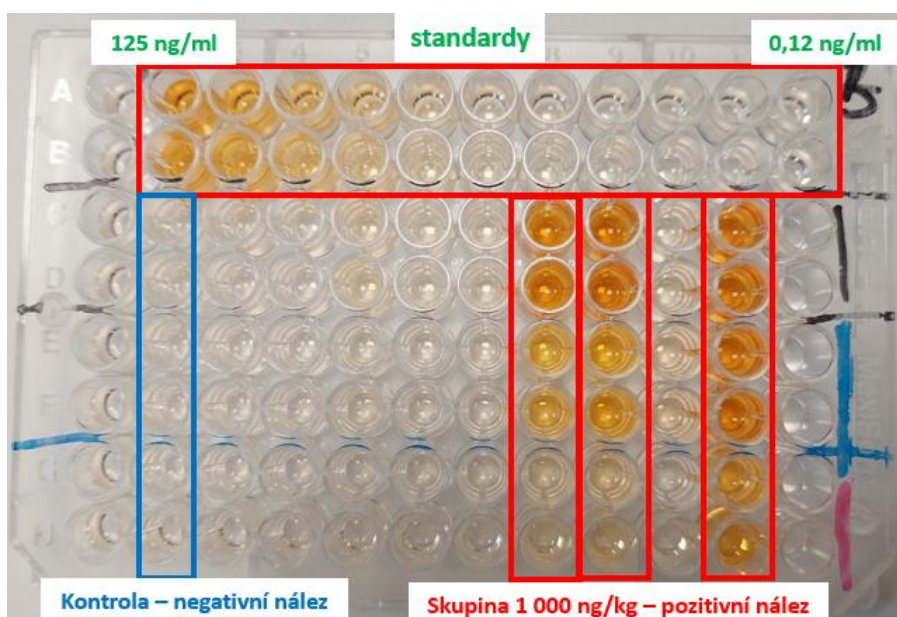
Analýza vitellogeninu v obou dílčích experimentech byla provedena ze středu těla, tzn. těla bez hlavy a ocasní ploutve, za použití komerčního ELISA kitu (Biosense Laboratories AS, Norsko). Po vyjmutí z hlubokomrazícího boxu byly vzorky homogenizovány (50 mmol/l TRIS-HCl, 1 % inhibitor proteáz, pH 7,4) s využitím přístroje TissueLyser II (Qiagen, USA). Homogenizace probíhala ve dvou cyklech, vždy o frekvenci 25 Hz po dobu 70 s. Následně byly zhomogenizované vzorky odstředěny při $18\,000 \times g$ a 4°C po dobu 30 minut (Microfuge 22R centrifuga, Beckman Coulter, USA). Následně byl odebrán supernatant pro stanovení koncentrace vitellogeninu. Stanovení vitellogeninu bylo provedeno sendvičovou ELISA metodou, vlastní detekce proběhla spektrofotometricky při vlnové délce 492 nm s využitím readru mikrotitračních destiček Varioskan Flash Reader (Thermo-Scientific, USA). Na obrázku č. 2 je ukázka mikrotitrační desky po inkubaci před vlastním spektrofotometrickým měřením. Vzhledem k tomu, že nebylo možné dopředu odhadnout koncentraci vitellogeninu v jednotlivých vzorcích, byly pro každý vzorek zvoleny tři různá ředění (250x, 2 500x, 25 000x)

Stanovení aktivity detoxikačních a antioxidačních enzymů (GST, GR, GPx) probíhalo spektrofotometricky (Habig et al., 1974; Carlberg and Mannervik, 1975; Flohe and Gunzler, 1984). Vzorky byly nejprve homogenizovány ve fosfátovém pufru (50 mmol/l KH_2PO_4 , 1 mmol/l EDTA, pH 7,4) a supernatant byl využit pro dílčí analýzy. Aktivita enzymů byla normalizována na koncentraci proteinu, který byl stanoven také spektrofotometricky pomocí kyseliny bicinchoninové (Smith et al, 1985). Spektrofotometrické stanovení bylo provedeno v mikrotitračních

destičkách s využitím readru mikrotitračních destiček Varioskan Flash Reader (Thermo-Scientific, USA).

Statistické zpracování bylo provedeno v programu Unistat for Excel 6.5. Nejprve bylo provedeno testování normality (Shapiro-Wilkův test) a homogenity rozptylu (Levenův test). Pro data, která vykazovala normální rozdělení, byla dále využita analýza rozptylu a test mnohonásobného porovnání (Tukey-HSD). V případě nesplnění podmínky normality byl využit vícevýběrový mediánový test. Testování rozdílů v mortalitě bylo provedeno s využitím kontingenčních tabulek. V případě experimentu, ve kterém byl sledován vliv EE2 ve vodní lázni, bylo testování rozdílu mezi středními hodnotami provedeno pomocí Mann-Whitneyova testu. Testování proběhlo na hladině významnosti $p < 0,05$ a $p < 0,01$.

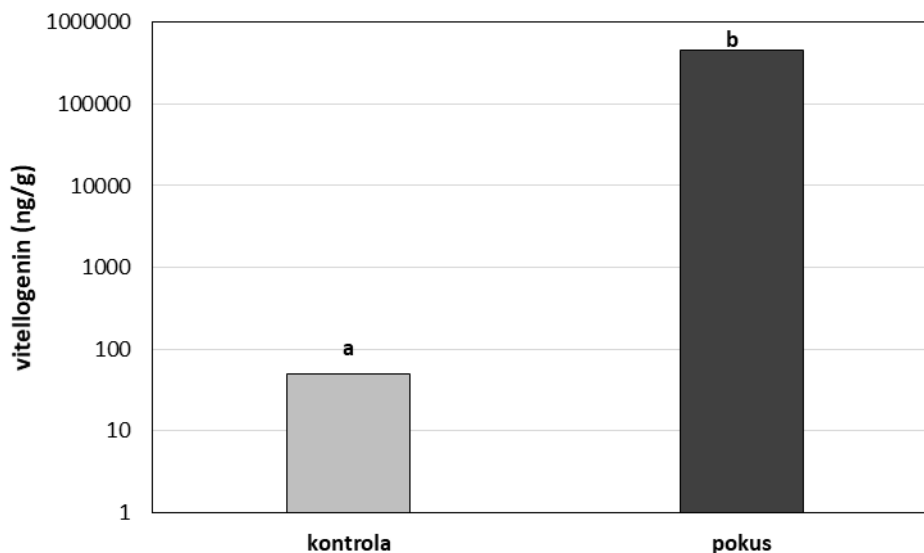
Obrázek č. 2. Analýza vitellogeninu s využitím ELISA metody – ukázka mikrotitrační desky po inkubaci (foto: MVDr. Zuzana Weiserová).



Výsledky

Výsledky analýzy vitellogeninu v celotělovém homogenátu dávia pruhovaného po 14-týdenní expozici 10 ng/l EE2 jsou uvedeny v grafu č. 1. U pokusné skupiny došlo ke statisticky vysoce významnému zvýšení produkce vitellogeninu v porovnání s kontrolní skupinou ($p < 0,01$). Detailní výsledky analýzy vitellogeninu jsou uvedeny v tabulce č. 1. V pokusné skupině byla přítomnost vitellogeninu potvrzena u všech analyzovaných vzorků. V kontrolní neexponované skupině to bylo pouze u dvou jedinců z celkového počtu deseti analyzovaných vzorků.

Graf č. 1. Koncentrace vitellogeninu v celotělovém homogenátu triploidů dánia pruhovaného po 14-týdenní expozici ethinylestradiolem ve vodě v koncentraci 10 ng/l. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě mediánové hodnoty. Rozdílná písmena (a, b) indikují statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($p < 0,01$). V případě výsledků pod mezí detekce byla pro statistické zpracování použita polovina meze detekce (tzn. 50 ng/g).



Tabulka č. 1. Výsledky analýzy vitellogeninu v celotělovém homogenátu triploidů dánia pruhovaného po 14-týdenní expozici ethinylestradiolem ve vodě v koncentraci 10 ng/l.

	kontrola	pokus
počet analyzovaných vzorků	10	10
medián (ng/g)	50*	449 461
maximum (ng/g)	26 312	1 217 755
minimum (ng/g)	< 300	53 007
počet pozitivních vzorků	2	10

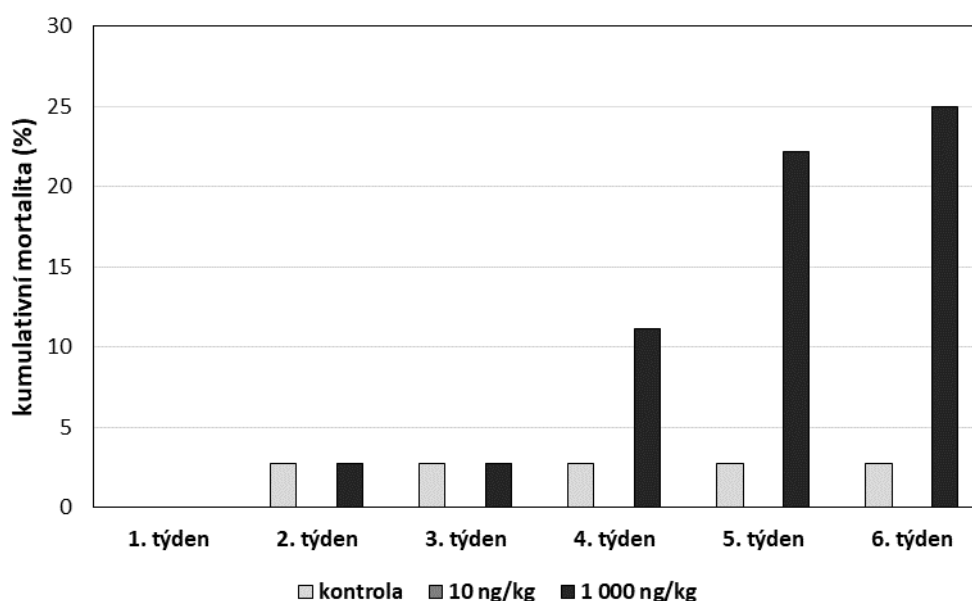
* v případě výsledků pod mezí detekce (100 ng/g) byla pro statistické zpracování použita polovina meze detekce (tzn. 50 ng/g)

V druhém dílčím experimentu byla sledována odezva organismu na perorální aplikaci EE2 po dobu 6 týdnů. Morfologické ukazatele na ukončení experimentu jsou uvedeny v tabulce č. 2. Z uvedených výsledků je zřejmé, že především vyšší testovaná koncentrace (1 000 ng/g) významně ovlivnila finální hmotnost i délku ryb, kdy u obou parametrů došlo ke snížení v porovnání s kontrolní skupinou. V případě délky těla byl statisticky významný rozdíl potvrzen také mezi experimentální skupinou vystavenou EE2 v koncentraci 10 a 1 000 ng/g. Mimo jiné byla v nejvyšší testované koncentraci také zaznamenána rozsáhlá mortalita. Tato hodnota byla testována jako statisticky vysoce významná v porovnání s kontrolou i pokusnou skupinou vystavenou 10 ng EE2/kg. V grafu č. 2 jsou uvedeny výsledky kumulativní mortality, kde je zřejmé, že ke zvýšenému úhynu docházelo až po delší expozici. Po čtyřech týdnech byla mortalita 11,1 %, po pátém týdnu 22,2 % a po ukončení expozice to bylo 25 %.

Tabulka č. 2. Morfologické ukazatele triploidů dánia pruhovaného po 6-týdenní expozici ethinylestradiolem podávaným v krmivu. Výsledky délky těla a hmotnosti jsou vyjádřeny ve formě mediánové hodnoty. Rozdílná písmena (a, b) indikují statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($p < 0,01$).

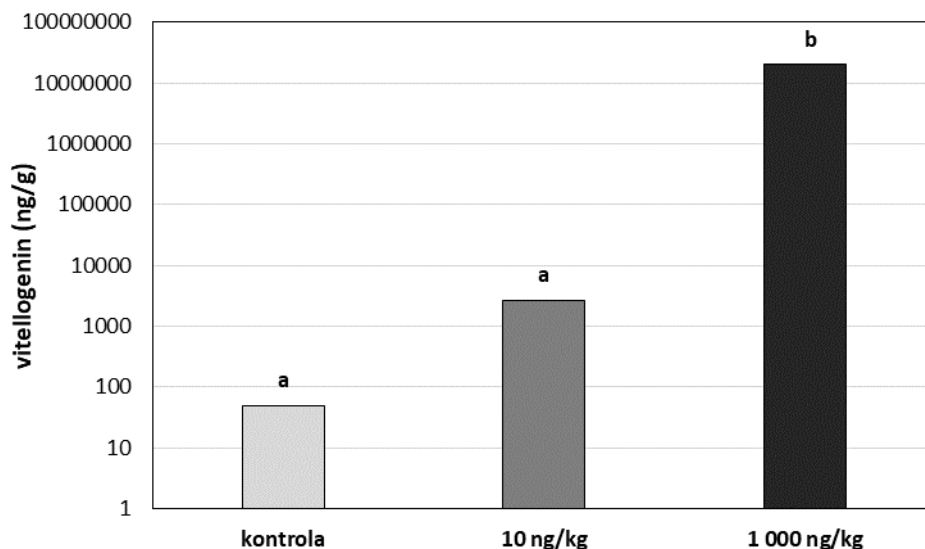
	kontrola (n=35)	10 ng/kg (n=36)	1 000 ng/kg (n=27)
mortalita (%)	2,8 ^a	0 ^a	25,0 ^b
délka těla (mm)	27,0 ^a	28,1 ^a	20,0 ^b
hmotnost těla (mg)	267,6 ^a	303,9 ^b	116,0 ^b

Graf č. 2. Kumulativní mortalita (%) triploidů dánia pruhovaného v průběhu 6-týdenní expozici ethinylestradiolem podávaným v krmivu.



Dalším ze sledovaných parametrů byl obsah vitellogeninu v tělním homogenátu. Pro analýzu byl využit pouze střed těla, tzn. bez hlavy a ocasní ploutve. Výsledky vitellogeninu jsou uvedeny v grafu č. 3 a tabulce č. 3. Z uvedených výsledků je zřejmé, že v experimentální skupině vystavené nejvyšší testované skupině (1 000 ng/kg)šlo ke statisticky vysoce významnému zvýšení koncentrace vitellogeninu. Koncentrace vitellogeninu je pohybovaly řádově v jednotkách až desítkách milionů ng/g, v kontrolní skupině byla maximální koncentrace řádově v jednotkách tisíců ng/g. Experimentální skupina vystavená environmentálně relevantní koncentraci EE2 (10 ng/kg) sice vykazovala také mírné zvýšení vitellogeninu, ale v porovnání s kontrolou nebyl tento rozdíl testován jako statisticky významný. Zajímavý je ovšem záchyt pozitivních vzorků, kdy v kontrolní skupině to bylo 40 % jedinců, ale v případě obou exponovaných skupin to bylo 100 % jedinců.

Graf č. 3. Koncentrace vitellogeninu v celotělovém homogenátu triploidů dávia pruhovaného po 6-týdenní expozici ethinylestradiolem podávaným v krmivu. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě mediánové hodnoty. Rozdílná písmena (a, b) indikují statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($p < 0,01$). V případě výsledků pod mezí detekce byla pro statistické zpracování použita polovina meze detekce (tzn. 50 ng/g).



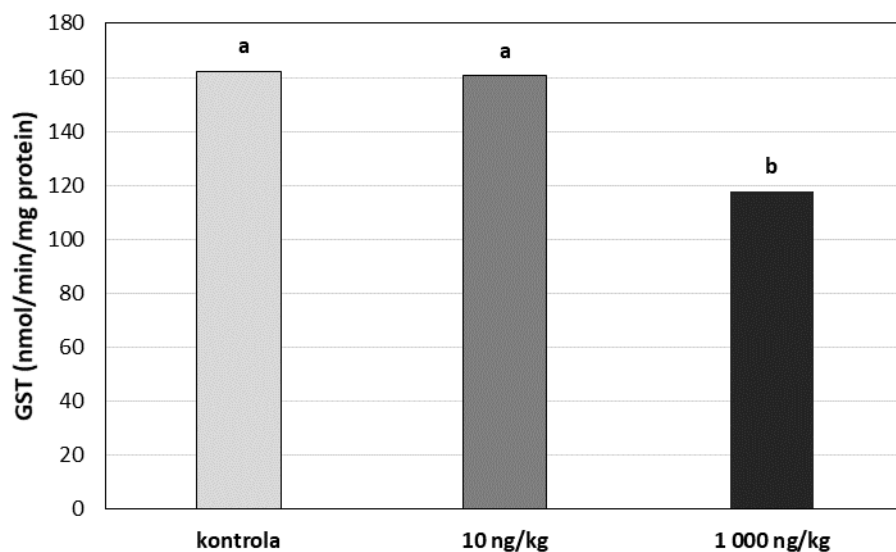
Tabulka č. 3. Výsledky analýzy vitellogeninu v celotělovém homogenátu dávia pruhovaného po 6-týdenní expozici ethinylestradiolem podávaným v krmivu.

	kontrola	10 ng/kg	1 000 ng/kg
počet analyzovaných vzorků	10	10	7
medián (ng/g)	50*	2 643	20 044 480
maximum (ng/g)	8 904	6 259	7 323 694
minimum (ng/g)	< 300	1 252	21 515 882
počet pozitivní vzorků	4	10	7

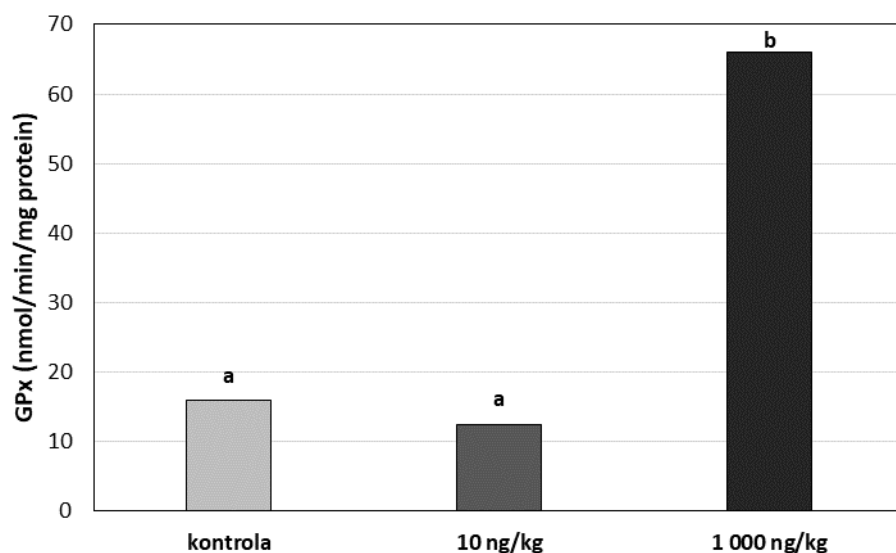
* v případě výsledků pod mezí detekce (100 ng/g) byla pro statistické zpracování použita polovina meze detekce (tzn. 50 ng/g)

Mezi další analyzované markery patřily aktivity detoxikačních a antioxidačních enzymů (GST, GPx, GR). Výsledky jsou uvedeny v grafech č. 4 až 6. U všech enzymů došlo k signifikantním změnám v případě experimentální skupiny vystavené nejvyšší testované koncentraci EE2 (1 000 ng/kg). V případě detoxikačního enzymu GST byl zaznamenán statisticky významný ($p < 0,05$) pokles aktivity. Pokusná skupina vystavená EE2 v koncentraci 10 ng/kg se oproti kontrolní skupině nelišila. Obdobný trend byl zaznamenán i v případě analýzy GR. Zde došlo ke statisticky významnému ($p < 0,05$) poklesu aktivity ale v obou pokusných skupinách. Nebyl ovšem zaznamenán rozdíl mezi exponovanými skupinami vystavenými EE2 v koncentracích 10 ng/kg a 1 000 ng/kg. Při analýze GPx bylo zjištěno, že nejvyšší testovaná koncentrace vedla ke statisticky vysoce významnému zvýšení aktivity tohoto antioxidačního enzymu, ale pouze v případě experimentální skupiny vystavené nejvyšší testované koncentraci. Toto zvýšení bylo v porovnání s kontrolní skupinou více jak čtyřnásobné.

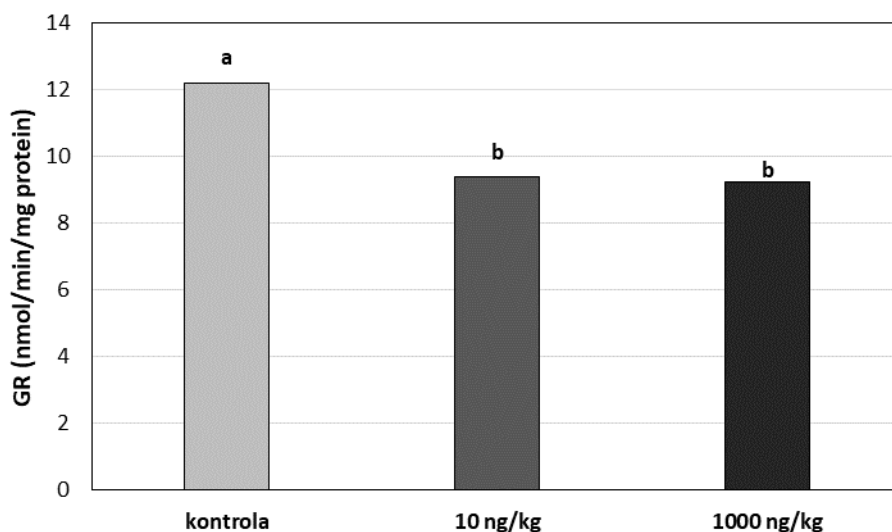
Graf č. 4. Aktivita glutathion-S-transferázy (GST) v celotělovém homogenátu triploidů dávia pruhovaného po 6-týdenní expozici ethinylestradiolem podávaným v krmivu. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě mediánové hodnoty. Rozdílná písmena (a, b) indikují statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($p < 0,05$).



Graf č. 5. Aktivita glutathionperoxidázy (GPx) v celotělovém homogenátu triploidů dávia pruhovaného po 6-týdenní expozici ethinylestradiolem podávaným v krmivu. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě mediánové hodnoty. Rozdílná písmena (a, b) indikují statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($p < 0,01$).



Graf č. 6. Aktivita glutathionreduktázy v celotělním homogenátu dánia pruhovaného po 6-týdenní expozici ethinylestradiolu podávaného v krmivu. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě mediánové hodnoty. Rozdílná písmena (a, b) indikují statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($p < 0,05$).



Diskuze

Ve vodním prostředí můžeme detekovat rozličné spektrum antropogenních kontaminantů, včetně široké škály zmiňovaných endokrinních disruptorů. Všechny tyto látky pak společně působí na vodní organismy, přestože jsou jejich jednotlivé environmentální koncentrace relativně nízké. Vzhledem ke komplexnosti vodních živočichů není možné vliv těchto látek nasimulovat in-vitro a pro posouzení jejich negativních vlivů využíváme různých testů toxicity (Velíšek, 2018).

Cílem našeho experimentu bylo zjistit toxicitu EE2, což je semisyntetický estrogen užívaný v humánní orální antikoncepci. V porovnání s přírodním estradiolem je EE2 ve vodním prostředí stabilnější a vykazuje vyšší estrogenní potenciál (11 až 27x) (Frontis et al., 2015). Pro komplexní zhodnocení byly negativní účinky posuzovány v rámci dvou dílčích experimentů, kdy testovaná látka byla podávána ve vodě a v krmivu. Do experimentu byly využity triploidní formy dánia pruhovaného, protože se jedná o celosamčí populaci, která se velmi dobře hodí pro hodnocení estrogenních efektů. Sledování probíhalo dlouhodobě, a to nejen během období dospívání, ale i v období krátce po dosažení pohlavní dospělosti. V případě experimentu, kdy testovaná látka byla podávána ve vodě, byl délka pokusu 14 týdnů. Při testování účinků EE2 podávaného v krmivu byla zvolena délka experimentu 6 týdnů. Obecně lze v literatuře nalézt pouze omezené informace, které se týkají sledování účinků toxicity kontaminantů po perorální aplikaci. Jako hlavní indikátor negativního účinku EE2 byl zvolen vitellogenin, který se hojně využívá jako marker endokrinní disrupce (Sumpter, 1995; Drastichová et al., 2004; Maltais and Roy, 2014).

Testování toxicity EE2 bylo zvoleno nejen z důvodu, že se tato látka hojně vyskytuje ve vodním prostředí, ale můžeme ji také detekovat v potravním řetězci (Dussault et al., 2009; Zhang et al., 2011). V České republice proběhla v uplynulých letech řada vědeckých studií, které odhalily zvýšené koncentrace vitellogeninu u ryb. Na řece Dyji se například zkoumal vliv estrogenních látek na parmu obecnou (*Barbus barbus*) (Peňáz et al., 2005). Další studie proběhly na řekách Ticha Orlice (Kolářová et al., 2005; Havelková et al., 2008) a Labe (Žlábek et al., 2009), kde byl hodnocen účinek na pstruha potočního (*Salmo trutta fario*). Obdobný trend ovšem lze zaznamenat i na celém světě, protože se aktuálně jedná o velmi často diskutovanou problematiku (Weiwei, 2017; Kalu et al., 2018). Toxikologické studie uvádějí, že vodní organismy nejsou významným způsobem ovlivněny nízkými koncentracemi EE2, řádově desítky ng/l (Laurenson et al., 2014). Ve vodním prostředí ovšem můžeme nalézt i mnohonásobně vyšší koncentrace, řádově se může jednat o stovky ng/l, což už pro

vodní organismy představuje významné riziko, a to zvláště při chronické expozici (Ramírez-Montero et al., 2022).

Výsledky analýzy vitellogeninu ukazují na úzký vztah mezi množstvím aplikovaného EE2 a koncentrací tohoto analytu v celotělním homogenátu. V obou testech došlo u nejvyšších testovaných koncentrací k významnému nárůstu obsahu vitellogeninu. Zajímavé je také zjištění, že v exponovaných skupinách byl u všech testovaných jedinců zjištěn pozitivní nález vitellogeninu. V experimentu zaměřeném na perorální aplikaci byla u nejvyšší testované skupiny také zaznamenána významná mortalita (25 %) a významné změny morfologických parametrů, které jednoznačně indikují významnou toxicitu EE2. Došlo k významnému snížení hmotnosti a délky těla, což může být zapříčiněno nižším zájmem ryb o krmivo, případně jeho sníženou konverzí v důsledku působení EE2. Obdobné závěry byly potvrzeny i v jiných studiích (Versonnen and Janssen, 2004; Ramírez-Montero et al., 2022).

Mezi další hojně využívané biomarkery řadíme analýzy aktivit detoxikačních a antioxidačních enzymů. V rámci naší studie bylo provedeno stanovení aktivity GST, GR a GPx v celotělním homogenátu po perorální expozici EE2. GST je klíčovým enzymem v procesu detoxikace endogenních a exogenních látek. Vyskytuje se prakticky u všech živočichů a jako katalyzátor se podílí na konjugaci redukováného glutathionu a xenobiotika (Ranson et al., 2005). V našem experimentu bylo zjištěno, že u skupiny exponované EE2 v koncentraci 1 000 ng/kg došlo k významnému snížení aktivity tohoto detoxikačního enzymu, což může indikovat významné zatížení organismu. Ze získaných výsledků lze usuzovat, že vysoká koncentrace EE2 snížila schopnost organismu tuto látku detoxikovat, což mohl vést k jeho kumulaci a zvyšování jeho toxického potenciálu. GPx se významně podílí na antioxidačním systému buněk, kdy katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku na vodu za současné oxidace redukováného glutathionu na oxidovanou formu (Matoušková et al., 2014). Zvýšení aktivity GPx u pokusné skupiny vystavené EE2 v koncentraci 1 000 ng/kg indikuje na rostoucí potřebu obranných buněčných mechanismů organismu. Pozorovaný jev mohl být opět zapříčiněn schopností kumulace EE2 v organismu. Statisticky významné změny byly pozorovány i v případě antioxidačního enzymu GR, kdy došlo v případě obou pokusných skupin ke snížení. GR katalyzuje redukci oxidovaného glutathionu na jeho redukovanou formu a zabezpečují tedy jeden z důležitých kroků antioxidační ochrany. Doplňuje tak funkci GPx při detoxikaci peroxidů (Matoušková et al., 2014). Snížení tohoto enzymu poukazuje na snížení antioxidační schopnosti organismu a jeho vyšší náchylnost k buněčnému poškození.

Závěr

Výsledky naší studie potvrdili, že vystavení triploidních forem dánie pruhovaného účinkům EE2 indukuje tvorbu vitellogeninu. Produkce vitellogeninu byla potvrzena jak ve studii, kdy byla testovaná látka podávána ve vodě, tak v experimentu zaměřeném na perorální aplikaci. Vyšší testovaná koncentrace (1 000 ng/kg) podávaná v krmivu vedla k mnohonásobně zvýšené odpovědi organismu. Obdobný trend byl také zaznamenán v případě analýzy detoxikačních a antioxidačních enzymů (GST, GPx a GR), kdy významnější změny byly potvrzeny především u experimentální skupiny vystavené nejvyšší testované koncentraci. Významné změny byly ovšem zaznamenány i v případě aktivity GR po expozici 10 ng/kg. V případě nejvyšší testované koncentrace EE2 (1 000 ng/kg) byly mimo jiné zaznamenány i významné změny v rámci morfologických parametrů, kdy jak u délky těla, tak u hmotnosti došlo k významnému snížení. Zároveň v této skupině byla pozorována vysoká mortalita, která na konci experimentu dosáhla 25 %. Chronické působení v délce několika týdnů nám dává poměrně komplexní obraz o působení polutantů na fyziologické funkce exponovaného organismu. Zvolené období pokusu v průběhu pohlavního dospívání a krátce po tomto období zasahuje do životní fáze ryb citlivé k přítomnosti xenobiotik a umožňuje nám získat poměrně komplexní informace o tom, jak mohou tyto látky v odpadních a povrchových vodách ovlivnit rybí populaci. Využití triploidní populace dánie pruhovaného v testech toxicity má své výhody také z hlediska redukce počtu experimentálních zvířat, protože při sledování xenoestrogenních účinků se pozorování provádí především u samčí populace.

Tato práce byla finančně podpořena projektem 2021ITA22 VETUNI.

Literatura

- Andersen, L., Holbech, H., Gessbo, Å., Norrgren, L., Petersen, G.I. 2003. Effects of exposure to 17 α -ethinylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 134: 365-374.
- Ben, W., Zhu, B., Yuan, X., Zhang, Y., Yang, M., Qiang, Z. 2017. Transformation and fate of natural estrogens and their conjugates in wastewater treatment plants: Influence of operational parameters and removal pathways. *Water Research* 124: 244-250.
- Carlberg, I., Mannervik, B. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry* 250: 5475-5480.
- Dhont, M. 2010. History of oral contraception. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care* 15: 12-18.
- Drastichová, J., Šíroková, Z., Žlábek, V. 2004. Review article: Vitellogenin as a biomarker for the exposure of fish to estrogenic chemicals. *Folia Veterinaria* 48: 114-118.
- Dussault, È.B., Balakrishnan, V.K., Borgmann, U., Solomon, K.R., Sibley, P.K. 2009. Bioaccumulation of the synthetic hormone 17 α -ethinylestradiol in the benthic invertebrates *Chironomus tentans* and *Hyalella Azteca*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1635-1641.
- Ekpeghere, K., Sim, W.J., Lee, H.J., Oh, J.E. 2018. Occurrence and distribution of carbamazepine, nicotine, estrogenic compounds, and their transformation products in wastewater from various treatment plants and the aquatic environment. *Science of the Total Environment* 640: 1015-1023.
- Flohe, L., Gunzler, W.A. 1985. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* 105: 114-121.
- Franěk, R., Tichopád, T., Fučíková, M., Steinbach, C., Pšenička, M. 2019. Production and use of triploid zebrafish for surrogate reproduction. *Theriogenology* 140: 33-43.
- Frontistis, Z., Kouramanos, M.S., Chatzisyneon, E., Hapeshi, E., Fatta-Kassinou, D., Xekoukoulotakis N.P., Mantzavinos, D. 2015. UV and simulated solar photodegradation of 17 α -ethinylestradiol in secondary-treated wastewater by hydrogen peroxide or iron addition. *Catalysis Today* 252: 84-92.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jacoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferases. First enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249: 7130-7139.
- Hansen, P.D., Dizer, H., Hock, B., Marx, A., Sherry, J., McMaster, M., Blaise, C. 1998. Vitellogenin – a biomarker for endocrine disruptors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 17: 448-451.
- Havelková, M., Svobodová, Z., Kolářová, J., Krijt, J., Némethová, D., Jarkovský, J., Pospíšil, R. 2008. Organic pollutant contamination of the river Tichá Orlice as assessed by biochemical markers. *Acta Veterinaria Brno* 77: 133-141.
- Hiramatsu, N., Matsubara, T., Fujita, T., Sullivan, C.V., Hara, A. 2006. Multiple piscine vitellogenins: biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments. *Marine Biology* 149: 35-47.
- Kavumpurath, S., Pandian, T.J. 1990. Induction of triploidy in the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton). *Aquaculture Research* 21: 299-306.
- Kolarova, J., Svobodova, Z., Zlabek, V., Randak, T., Hajslova, J., Suchan, P. 2005. Organochlorine and PAHs in brown trout (*Salmo trutta fario*) population from Tichá Orlice river due to chemical plant with possible effects to vitellogenin expression. *Fresenius Environmental Bulletin* 14: 1091-1096.
- Kumar, V., Johnson, A.C., Trubiroha, A., Tumová, J., Ihara, M., Grabic, R., Kloas, W., Tanaka, H., Kocour Kroupová, H. 2015. The challenge presented by progestins in ecotoxicological research: a critical review. *Environmental Science and Technology* 49: 2625-2638.
- Laurenson, J.P., Bloom, R.A., Page, S., Sandrieh, N. 2014. Ethinyl estradiol and other human pharmaceutical estrogens in the aquatic environment: a review of recent risk assessment data. *The AAPS Journal* 16: 299-310.

- Liu, S., Chen, H., Xu, X.R., Liu, S.S., Sun, K.F., Zhao, J.L., Ying, G.G. 2015. Steroids in marine aquaculture farms surrounding Hailing Island South China: Occurrence, bioconcentration, and human dietary exposure. *Science of the Total Environment* 502: 400-407.
- Maltais, D., Roy, R.L. 2014. Effects of nonylphenol and ethinylestradiol on copper redhorse (*Moxostoma hubbsi*), an endangered species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 108: 168-178.
- Matoušková, M., Ruttkay-Nedecký, B., Kizek, R. 2014. Antioxidační enzymy – biochemické markery oxidačního stresu. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*, 3: 53-56.
- Mears, E., Grant, E.C. 1962. "Anovlar" as an oral contraceptive. *Physiology of Reproduction* 14: 75-79.
- Nilsen, B.M., Berg, K., Eidem, J.K., Kristiansen, S.I., Brion, F., Porcher, J.M., Goksyr, A. 2004. Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378: 621-633.
- Ortiz-Villanueva, E., Jaumot, J., Martínez, R., Navarro-Martín, L., Piña, B., Tauler, R. 2018. Assessment of endocrine disruptors effects on zebrafish (*Danio rerio*) embryos by untargeted LC-HRMS metabolomic analysis. *Science of the Total Environment* 635: 156-166.
- Peňáz, M., Svobodová, Z., Baruš, V., Prokeš, M., Drastichová, J. 2005. Endocrine disruption in a barbel, *Barbus barbus* population from the River Jihlava, Czech Republic. *Journal of Applied Ichthyology* 21: 420-428.
- Ramírez-Montero, M. del C., Gómez-Oliván, L.M., Gutiérrez-Noya, V.M., Orozco-Hernández, J.M., Islas-Flores, H., Elizalde-Velázquez, G.A., SanJuan-Reyes, N., Galar-Martínez, M. 2022. Acute exposure to 17- α -ethinylestradiol disrupt the embryonic development and oxidative status of *Danio rerio*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 251: 109199.
- Ranson, H., Hemingway, J. 2005. Glutathione Transferases. In: Gilbert, L.I. (Ed.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Amsterdam, 383-402.
- Reading, B.J., Sullivan, C.V., Schilling, J. 2017. Vitellogenesis in fishes. In: *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.03076-4
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hemranson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150: 76-85.
- Sumpter, J.P. 1995. Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicology Letters* 82: 737-742.
- Tyler, C.R., van Aerle, R., Hutchinson, T.H., Maddix, S., Trip, H. 1999. An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 337-347.
- Versonne, B.J., Janssen, C.R. 2004. Xenoestrogenic effects of ethinylestradiol in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology* 19: 198-206.
- Velíšek, J. (ed.). 2018. *Vodní toxikologie pro rybáře*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Vodňany, 608 s.
- Zhang, X., Gao, Y., Li, Q., Li, G., Guo, Q., Yan, Ch. 2011. Estrogenic compounds and estrogenicity in surface water, sediments, and organisms from Yundang Lagoon in Xiamen, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61: 93-100.
- Žlábek, V., Randák, T., Kolářová, J., Svobodová, Z., Kroupová, H. 2009. 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* 82: 280-284.

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2021
(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu: FVHE/Dobšíková/ITA2021 (TA212031)

2. Název projektu: Suplementace výživy a její dopad na zdravotní stav, parametry vnitřního prostředí a produkční ukazatele vybraných druhů hospodářských zvířat

3. Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: doc. MVDr. Radka Dobšíková, Ph.D.

Fakulta/celoškolské pracoviště: FVHE

E-mail: dobsikovar@vfu.cz

Telefon: 541 562 784

4. Řešitelský kolektiv:

složení řešitelského týmu: (akademičtí pracovníci a jejich příslušnost k ústavům nebo klinikám fakulty nebo výzkumným skupinám CEITEC, studenti DSP) a forma zapojení každého člena řešitelského týmu

doc. MVDr. Radka Dobšíková, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), akademický pracovník, úvazek 1,0; hlavní řešitel – vedení projektu a koordinace činností řešitelského kolektivu, koordinace dílčích úkolů, praktické provádění experimentu, stanovení hematologických parametrů, analýza výsledků, statistické zpracování a vyhodnocení dat, příprava publikačních výstupů, zpracování závěrečné zprávy projektu

MVDr. Martin Hostovský, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), akademický pracovník, úvazek 1,0; spoluřešitel – koordinace dílčích úkolů řešitelského kolektivu, praktické provádění experimentu, odběr vzorků, stanovení biochemických parametrů a parametrů oxidativního stresu, analýza výsledků, statistické zpracování a vyhodnocení dat, příprava publikačních výstupů

MVDr. Vlastimil Šimek, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), akademický pracovník, úvazek 1,0; spoluřešitel – sestavení optimální krmné směsi, praktické provádění experimentu, odběr vzorků, stanovení hematologických ukazatelů, analýza výsledků, statistické zpracování a vyhodnocení dat, příprava publikačních výstupů

prof. Ing. David Zapletal, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), akademický pracovník, úvazek 1,0; spoluřešitel – koordinace dílčích úkolů, sestavení optimální krmné dávky a způsobu chovu, praktické provádění experimentu, analýza výsledků, statistické zpracování a vyhodnocení dat, příprava publikačních výstupů

Mgr. Lucie Hostovská (roz. Pešková) – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), student DSP FVHE VFU Brno, forma prezenční, akademický pracovník, úvazek 0,5; spoluřešitel – praktické provádění experimentu, odběr vzorků, stanovení biochemických parametrů a parametrů oxidativního stresu, podíl na rešeršní činnosti k řešené problematice, statistické zpracování dat, příprava publikačních výstupů

prof. Ing. Eva Straková, Ph.D. - Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), akademický pracovník, úvazek 1,0, spoluřešitel – koordinace aktivit dílčího projektu, metodické zpracování a vedení projektu, vyhodnocení analytické činnosti, tvorba databází výsledků, statistické zpracování výsledků, publikační činnost, vypracování dílčí závěrečné zprávy

Ing. Lucie Všetická, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), akademický pracovník, úvazek 1,0, spoluřešitel – sumarizace výsledků pro statistickou analýzu, řešeršní činnost, publikační činnost

MVDr. Martin Kutlvašr – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), student DSP FVHE VETUNI, forma kombinovaná, spoluřešitel – práce spojené s literárními databázemi, konfrontace dosažených výsledků se zahraničními vědeckými poznatky, podíl na řešeršní činnosti k řešené problematice

Mgr. Ing. Ludmila Křížová, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), akademický pracovník, úvazek 1,0, spoluřešitel – koordinace aktivit dílčího projektu na pracovišti, příprava metodik, odběry bachorové tekutiny, provádění experimentů in vitro, statistické vyhodnocení výsledků, publikace výsledků, sepsání dílčí závěrečné zprávy

MVDr. Jana Tšponová, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), akademický pracovník, úvazek 1,0, spoluřešitel – odběry bachorové tekutiny, provádění in vitro experimentů, tvorba databází výsledků a jejich vyhodnocování, publikace výsledků

Mgr. Kateřina Sedláková, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), akademický pracovník, úvazek 1,0, spoluřešitel – odběry bachorové tekutiny, provádění in vitro experimentů, tvorba databází výsledků a jejich vyhodnocování, publikace výsledků

5. V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu:

-

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Zaměření projektu je v souladu se zaměřením vědeckovýzkumných aktivit FVHE VETUNI, Sekce chovu a ochrany zvířat a veřejného veterinárního lékařství FVHE a Ústavu chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie. Dílčím směřováním výzkumu na FVHE je oblast ochrany a pohody zvířat, chovu a výživy zvířat a biochemie. Předkládaný projekt je směřován do problematiky zdraví a welfare zvířat v souvislosti s výživou zvířat, dílčí výzkumné aktivity projektu se zabývají sledováním a hodnocením vlivu suplementace výživy vybranými účinnými látkami rostlinné provenience na vnitřní prostředí zvířat, resp. biochemické procesy u zvířat, a dále studiem dietárních faktorů, včetně biologicky aktivních látek, a jejich vlivu na zdraví a užitkovost zvířat a kvalitu a zdravotní nezávadnost jejich produkce. Řešitelský kolektiv ústavu je dlouhodobě orientován do problematiky výživy drůbeže v souvislosti s hledáním optimalizačních výživářských programů, zabývá se problematikou vlivu suplementace výživy na parametry vnitřního prostředí testovaného organismu.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Cílem dílčích projektů bylo vyhodnocení a) účinku doplňků krmiva s pelyňkem na růstový výkon, imunologické, hematologické a biochemické ukazatele a parametry oxidačního stresu brojlerů vystavených působení tepelného stresu, b) produkčního zdraví klinicky zdravých nosnic v rámci snáškového období na základě zdravotního stavu, hematologických a biochemických ukazatelů a produkční schopnosti při optimalizované výživě, c) stanovení vlivu isoflavonů na průběh bachorové fermentace a na stravitelnost složek krmiva směsné krmné dávky s využitím in vitro metod.

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany):

V rámci 1. dílčího projektu byl sledován účinek doplňků krmiva obohacených o pelyněk na růstový výkon a parametry vnitřního prostředí brojlerů vystavených působení tepelného stresu. Na konci pokusu byly vyhodnoceny kvalitativní parametry masa. Pro projekt byli využiti 14denní brojleři Ross 308. Kontrolní skupina byla krmena klasickým krmivem, pokusné skupiny krmivem s 1%, 5% a 10% koncentrací pelyňku (Kostadinovic et al., 2015). Odběry krve a trusu pro parazitologické vyšetření proběhly na začátku pokusu, v týdenních intervalech a na konci pokusu. Současně byl sledován vliv testovaných koncentrací pelyňku na výskyt kokcií v GIT brojlerů, předpokládal se jeho antikokcidiální efekt. V průběhu pokusu bylo přistoupeno i k mikrobiologickému vyšetření trusu drůbeže. Výsledky byly/budou statisticky vyhodnoceny (Unistat for Excel, verze 5.6; SAS/STAT).

V rámci 2. dílčího projektu bylo řešeno téma, zda v závislosti na produkci násadových vajec v průběhu snáškového období dojde ke změně metabolického profilu nosnic. Změna v metabolickém profilu nosnic byla očekávána i v závislosti na výrobci kompletních krmných směsí. Pro pokus byl použit soubor klinicky zdravých nosnic rodičovského hejna masného hybrida ROSS 308. Rozdíl mezi skupinami byl dán jiným dodavatelem kompletních krmných směsí. Vybranými hematologickými a biochemickými ukazateli byl posouzen zdravotní stav nosnic. Produkční schopnost rodičovského hejna byla posouzena intenzitou snášky násadových vajec. Získané údaje byly statisticky zpracovány.

V rámci 3. dílčího projektu byly provedeny experimenty s cílem stanovit vliv koncentrací isoflavonů na stravitelnost sušiny, organické hmoty a NDF s využitím in vitro metod (dávka 40% extraktu isoflavonů do inkubací: 0, 5, 25, 50 a 75 mg), dále stanovit vliv přídatku isoflavonů na průběh fermentace a stravitelnost sušiny, organické hmoty a NDF, resp. stanovit dlouhodobý vliv dvou koncentrací isoflavonů daidzeinu a genisteinu na stravitelnost NDF, sušiny a organické hmoty in vitro, dle metodiky Tilley a Terry (1963). Byla použita bachorová tekutina od dojnic ze ŠZP Nové Dvory, testované vzorky krmiv byly stejné jako krmná dávka těchto dojnic, metodika dle McDougall (1948). Jako kritérium odezvy byly sledovány změny v pH, obsahu těkavých mastných kyselin, NH₃ a stravitelnosti NDF, sušiny a organické hmoty in vitro.

Dosažené výsledky projektu (max. 1/2 strany):

Výsledkem 1. dílčího projektu bylo získání experimentálních dat pro posouzení vlivu dietárního podání rostlinného antikokcidika na bázi pelyňku na vybrané hematologické a biochemické parametry drůbeže, resp. na výskyt kokcií v trusu drůbeže. Součástí práce bylo sledování vlivu přídatku tohoto přírodního antikokcidika na kvalitativní parametry svaloviny. V rámci analýz proběhlo rovněž vyšetření nutričních složek krmiva. Parazitologická vyšetření trusu neprokázala přítomnost kokcií v trusu drůbeže, mikrobiologicky byla v trusu zjištěna přítomnost např. *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium perfringens*. V současné době jsou biologické vzorky krevní plazmy laboratorně zpracovávány (biochemie), výsledky laboratorní analýzy hematologických parametrů a kvalitativních parametrů masa jsou statisticky zpracovávány. Dosud získané statistické analýzy prokázaly vliv přídatku pelyňku na některé sledované ukazatele (např. vaznost masa).

Výsledky 2. dílčího projektu byly informace o změnách sledovaných metabolických ukazatelů nosnic rodičovského hejna masného hybrida ROSS 308 během období snášky, ale i v závislosti na výrobci kompletních krmných směsí. Získaná data byla statisticky analyzována, jsou zpracována tabulkově a v grafickém vyjádření. Získaná data naznačují, že v souvislosti s rozdílnou intenzitou snášky v průběhu sledovaného období dochází k rozdílným tendencím u sledovaných ukazatelů metabolického profilu v průběhu snáškového cyklu. Byla pozorována závislost jak u hematologických, tak i u biochemických ukazatelů na intenzitě snášky (Hk, Hb, AST). Koncentrace plazmatického proteinu, cholesterolu, ALT, Ca, P, Mg a K odrážely intenzitu snášky. Řešením projektu se podařilo získat soubor vybraných hematologických a biochemických dat v průběhu snáškového období. Statistická analýza získaných dat bude zpracována do publikačního výstupu.

V rámci 3. dílčího projektu bylo prokázáno, že stravitelnost sušiny a organické hmoty nebyla hladinou isoflavonů ovlivněna. Naproti tomu stravitelnost NDF se vzrůstající hladinou isoflavonů klesala ($P>0,05$). pH po inkubaci bylo ve skupině I75 nižší (5,85) než u kontrolní skupiny K (5,76, $P<0,05$). Množství fermentačních produktů, tj. amoniaku, těkavých mastných kyselin a poměr kyseliny octové a propionové nebyly pokusným zásahem ovlivněny ($P>0,05$). V případě daidzeinu byly zjištěny rozdíly ve stravitelnosti organické hmoty a sušiny, v hodnotách pH a produkci amoniaku ($P<0,05$). V případě genisteinu byly zaznamenány rozdíly v hodnotách pH ($P<0,05$). Přídavek daidzeinu vedl k rozdílu v produkci jednotlivých TMK ($P<0,05$). Přídavek genisteinu do inkubací neměl vliv na žádný ze sledovaných parametrů ($P>0,05$).

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Výsledky 1. projektu přispějí k vyhodnocení vlivu přídavku pelyňku (*Artemisia* sp.) do krmiva na vybrané, výše uvedené, ukazatele vnitřního prostředí brojlera, včetně kvality finálního živočišného produktu (zlepšení zdravotního stavu a welfare drůbeže při zajištění kvalitního živočišného produktu). Výsledky 2. projektu přispějí k rozšíření, doplnění a aktualizaci údajů o metabolickém profilu rodičovského hejna ROSS 308 a rozvoji aviární hematologie. Výsledky 3. projektu doplní stávající znalosti o vlivu isoflavonů na fermentační pochody v bacheru.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Uplatnění výsledků projektu lze očekávat ve sféře vědecké, edukační, konzultační a poradenské, resp. ve veterinární praxi, kde mohou sloužit pro objektivní způsob hodnocení vlivu suplementace výživy vybranými účinnými látkami na ukazatele zdravotního stavu, stavu vnitřního prostředí a kvalitativní parametry živočišného produktu brojlera.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

Dílčí projekt 1: Effects of dietary supplementation with *Artemisia* on growth performance, biochemistry, haematology and oxidative stress parameters in heat-stressed broilers. *Poultry Science*, Q1 nebo *British Poultry Science*

Dílčí projekt 2: Changes of biochemical and haematological parameters in Ross 308 broilers during the laying period. *Italian Journal of Animal Science*

Dílčí projekt 3: Effects of daidzein and genistein on *in vitro* ruminal fermentation parameters and NDF digestibility. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	478160	478160
Služby	78000	70469,9
Cestovné	18000	9032,9
Další provozní náklady	221280	237777,2
Doplňkové náklady	119316	119316
Celkem	914756	914756,0

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

(komentář k čerpání finančních prostředků na řešení projektu – slovní popis v členění jednotlivých položek nákladů a konkrétní výčet, na co byly prostředky využity, komentář a zdůvodnění případných změn a rozdílů oproti schválenému rozpočtu projektu)

Osobní náklady:

Byly použity na odměnu akademickým pracovníkům a na stipendium pro studenty doktorského studijního programu podílejícího se na řešení projektu ITA.

Služby:

Služby byly čerpány v plánované výši na překladatelskou činnost v souvislosti s plánovanou publikační aktivitou a na analýzu vzorků.

Cestovné:

Finanční prostředky byly použity na služební cesty v souvislosti s projektem (odběry biologických materiálů apod.) a na konferenční poplatek studentské konference NutriNET 2021 (UVLF v Košicích).

Další provozní náklady:

Provozní náklady byly použity na nákup chemikálií a spotřebního materiálu pro hematologické a biochemické vyšetření vzorků (standarty chemikálií, reagensie pro biochemický analyzátor, laboratorní sklo, špičky, zkumavky apod.), dále na zakoupení analytických sáčků pro stanovení vlákniny, byly pořízeny patrony pro Soxhlet, exsikátor, laboratorní kádinky a laboratorní násypky, dále na nákup standardů isoflavonů daidzeinu a genisteinu, chemikálií, spotřebního laboratorního a drobného materiálu (laurylsíran sodný, močovina, sulfid sodný, salicylan sodný aj., enzymy, zkumavky, hadice, lano) a kancelářských potřeb (toner, euroobaly, zakládací složky).

Doplňkové náklady:

Byly plánované z přímých nákladů

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě doložte výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

9. Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VETUNI bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis 7.1. 2022 doc. Dobšíková
řešitele projektu:

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis 7.1. 2022 doc. Dobšíková
člena řešitelského týmu odpovědného za čerpání prostředků:

Přednosta ústavu nebo kliniky, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu nebo klinice, respektive celoškolském pracovišti, které řídí.

Datum, jméno a podpis 7.1. 2022 doc. Dobšíková
přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Datum, jméno a podpis
správce rozpočtu:

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis
děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2021

(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu: 2021ITA24

2. Název projektu:

Vliv nanočástic začleněných do aktivních a biodegradabilních filmů a obalů na jejich funkční a technologické vlastnosti.

3. Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: **doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.**

Fakulta/celoškolské pracoviště: Fakulta veterinární hygieny a ekologie

E-mail: tremlovab@vfu.cz

Telefon: 541562794, 541562700, 602116956

4. Řešitelský kolektiv:

Řešitelský kolektiv tvoří akademičtí pracovníci, výzkumní pracovníci a studenti DSP Ústavu hygieny a technologie potravin rostlinného původu.

Akademičtí pracovníci

doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D., akademický pracovník, úvazek 1,0 – koordinace dílčích úkolů, interpretace výsledků ve všech dílčích aktivitách, příprava a kontrola publikací, vypracování zprávy o řešení projektu.

MSc. Dani Dordevic, Ph.D., akademický pracovník, úvazek 1,0 – koordinace dílčích aktivit (výroba jedlých obalů, stanovení celkových polyfenolů spektrofotometricky a pomocí HPLC, textura, analýza FTIR, XRD, antimikrobiální analýza, stanovení zeta-potenciálu, 3D tisk obalu), hodnocení vzorků a interpretace výsledků, příprava a kontrola publikací, vypracování podkladů pro zprávu o řešení projektu.

doc. MVDr. Matej Pospiech, Ph.D., akademický pracovník, úvazek 0,8 – provedení analýz na elektronovém mikroskopu, hodnocení vzorků a interpretace výsledků, vypracování podkladů pro zprávu o řešení projektu.

Ing. Lenka Havlová, Ph.D. akademický pracovník, úvazek 1,0 – stanovení alergenů metodou ELISA, vypracování podkladů pro závěrečnou zprávu a publikace.

Mgr. Zdeňka Javůrková, Ph.D., akademický pracovník, úvazek 0,9 – stanovení barvy v barevných systémech CIELAB a RGB, hodnocení výsledků, vypracování podkladů pro závěrečnou zprávu a publikace.

Mgr. Hana Koudelková Mikulášková, Ph.D., akademický pracovník, úvazek 0,5 – stanovení antioxidační aktivity a celkových polyfenolů, hodnocení výsledků, vypracování podkladů pro závěrečnou zprávu a publikace.

Ing. Alexandra Tauferová, Ph. D. akademický pracovník, úvazek 0,6 – senzorická analýza připravených vzorků, hodnocení výsledků, vypracování podkladů pro závěrečnou zprávu a publikace.

Studenti DSP

Ing. Simona Jančíková (3. rok studia) – koordinace a provádění dílčích aktivit (výroba jedlých obalů, stanovení antioxidační aktivity a celkových polyfenolů, stanovení texturálních parametrů, FTIR, stanovení zeta-potenciálu a 3D tisk obalu), zpracování a interpretace výsledků.

Ing. Karolína Těšíková (2. rok studia) – stanovení antioxidační aktivity, celkových polyfenolů, texturálních parametrů, 3D tisk obalu, zpracování a interpretace výsledků.

Mgr. Martina Pečová (2. rok studia) – stanovení alergenů metodou, ELISA zpracování a interpretace výsledků.

5. V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu:

Všechny dílčí úkoly projektu včetně interpretace výsledků budou řešeny na Ústavu hygieny a technologie potravin rostlinného původu na Fakultě veterinární hygieny a ekologie VFU Brno.

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Projekt je zaměřen na problematiku zdravotní nezávadnosti, hygieny a kvality potravin. Projekt je v souladu s podporovanými směry výzkumu na Fakultě veterinární hygieny a ekologie. Řešené téma úzce souvisí se zaměřením Ústavu hygieny a technologie potravin rostlinného původu a navazuje na předchozí výzkumné aktivity.

Cíle projektu:

V projektu byly řešeny následující dílčí cíle:

- výroba biodegradabilních/jedlých obalů a filmů s přídavkem kovových nanočástic;
- testování interakcí mezi polysacharidy, rostlinnými výlisky a nanočásticemi;
- aplikace vyrobených obalů a filmů na potraviny;
- zhodnocení stability biodegradabilních/jedlých obalů během skladování při různých teplotních a vlhkostních podmínkách.

Dosažené výsledky projektu:

a) Hodnocení vlastností biodegradabilních/jedlých obalů a filmů

Tabulka 1: Složení vyrobených obalů

Vzorek	Složení
CH _L	Chitosan + 1% kyselina mléčná + glycerol
CH _{LHR}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 10 % extrakt* + glycerol
CH _{LZn0,05}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,05% nano ZnO + glycerol
CH _{LZn0,2}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,2% nano ZnO + glycerol
CH _{LZn0,5}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,5% nano ZnO + glycerol
CH _{LTi0,05}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,05% nano TiO ₂ + glycerol
CH _{LTi0,2}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,2% nano TiO ₂ + glycerol
CH _{LTi0,5}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,5% nano TiO ₂ + glycerol
CH _{LAg10}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + koloidní Ag 10 ppm + glycerol
CH _{LAg30}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + koloidní Ag 30 ppm + glycerol
CH _{LAg50}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + koloidní Ag 50 ppm + glycerol
CH _{LHRZn0,05}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,05% nano ZnO + 10 % extrakt* + glycerol
CH _{LHRZn0,2}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,2% nano ZnO + 10 % extrakt* + glycerol
CH _{LHRZn0,5}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,5% nano ZnO + 10 % extrakt* + glycerol

CH _{LHRTi0,05}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,05% nano TiO ₂ + 10 % extrakt* + glycerol
CH _{LHRTi0,2}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,2% nano TiO ₂ + 10 % extrakt* + glycerol
CH _{LHRTi0,5}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,5% nano TiO ₂ + 10 % extrakt* + glycerol
CH _{LHRAg10}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + koloidní Ag 10 ppm + 10 % extrakt* + glycerol
CH _{LHRAg30}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + koloidní Ag 30 ppm + 10 % extrakt* + glycerol
CH _{LHRAg50}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + koloidní Ag 50 ppm + 10 % extrakt* + glycerol

*extrakt z červených hroznů

Tloušťka obalů

Tloušťka obalů se pohybovala v rozmezí 0,176 – 0,318 mm. Chitosanový obal bez přídavku hroznového extraktu vykazoval menší tloušťku než chitosanový obal s přídavkem hroznového extraktu. Nicméně u vzorků obsahující nanočástice a koloidní stříbro tomu bylo naopak. Obaly obsahující hroznový extrakt a koloidní stříbro/nano TiO₂ se vyznačují největší tloušťkou, z nichž vzorek obsahující nano TiO₂ v 0,2 % vykazuje tloušťku až 0.318 ± 0.096 mm.

Obsah vody, rozpustnost a stupeň bobtnání

Chitosanový obal s přídavkem hroznového extraktu vykazoval vyšší procentuální obsah vody než chitosanový obal bez přídavku hroznového extraktu. Z použitých nanočástic a koloidního stříbra byl pozorován nejnižší obsah vody u vzorků s přídavkem nano ZnO, kde klesal obsah vody se zvyšující se koncentrací nano ZnO. Nejvyšší procentuální obsah vody byl zaznamenán u obalů s přídavkem koloidního stříbra, kde byl procentuální obsah vody přímo úměrný zvyšující se koncentraci kovu.

Rozpustnost chitosanových obalů byla vyšší u vzorků bez přídavku hroznového extraktu. Nejvyšší hodnoty rozpustnosti vykazovaly vzorky s přídavkem nano ZnO, kde rozpustnost rostla se zvyšující se koncentrací zinku.

Z výsledků je patrné, že velikost stupně bobtnání závisí na přídavku hroznového extraktu. U obalů bez přídavku hroznového extraktu je nejnižší stupeň bobtnání u vzorku CH_L (254.394 ± 54.379 %). Přídavek nanočástic a koloidního stříbra zvyšuje stupeň bobtnání. U většiny vzorků lze pozorovat zvýšení stupně bobtnání se zvyšující se koncentrací nanočástic/koloidního stříbra.

Textura obalů

V případě pevnosti byla nejvyšší hodnota zjištěna u obalu s přídavkem nanozinku (0,2%) 0,279 ± 0,074 MPa. u obalu s přídavkem 0,5 % nanozinku nebylo možné měření provést z důvodu nekompatibility obalu po vysušení. Když porovnáváme skupinu vzorků s přídavkem nanozinku a zároveň i s přídavkem extraktu z červených hroznů, tak bylo zjištěno, že u vzorků, kde byl jen samotný chitosan se pevnost po přidání extraktu z červených hroznů zvýšila. Zatímco u nanozinku po přidání extraktu z červených hroznů docházelo ke snížení pevnosti.

Když byl do obalů přidáván nanotitan, tak po přidání extraktu z červených hroznů bylo pozorováno mírné zvýšení hodnot pevnosti. Naopak při porovnání obalu obsahujícího pouze chitosan a extrakt z červených hroznů byla hodnota pevnosti vyšší než, když se do této matrice přidal nanotitan.

U použití koloidního stříbra byla v případě obalů složených pouze z chitosanu a koloidního stříbra v různých koncentracích došlo oproti kontrole k mírnému zvýšení pevnosti, jakmile se ale k této základní matici přidal extrakt z červených hroznů, tak při zvyšující se koncentraci koloidního stříbra docházelo ke snižování pevnosti až na hodnotu 0,031 ± 0,007 MPa.

Obsah celkových polyfenolů v obalech

Z měření celkových polyfenolů chitosanových obalů vyjádřených obsahem kyseliny gallové, je patrné nejvyšší množství této kyseliny u vzorku CH_{LHRZn0,05} a CH_{LHRZn0,2}. V rámci obalů CH_L a CH_{LHR} byla pozorována statistická významnost (p<0,05). Z hlediska použitých nanočástic/koloidního stříbra bylo obecně sledováno nejvyšší množství polyfenolů u obalů obsahující nano TiO₂.

Stanovení polyfenolů pomocí HPLC

U vzorků nebyla zjištěna jednoznačná závislost zvyšování nebo snižování obsahu epigalokatechinu, ale existuje staticky významný rozdíl mezi vzorky CH_L a CH_{LHR}, tedy pokud byl do obalu přidán extrakt z červených hroznů.

Stanovení antioxidační aktivity obalů

- Metodou FRAP, která využívá schopnosti antioxidantů redukovat železo (III>II) - je patrný rozdíl mezi vzorky CH_L a CH_{LHR}, kde přídavek extraktu z hroznových výlisků pozitivně ovlivňuje antioxidační aktivitu a

také je zde potvrzena statistická významnost ($p < 0,05$). Tento trend je patrný i u vzorků s nanočásticemi/koloidním stříbrem. Ze vzorků obsahující hroznový extrakt je vysoká antioxidační aktivita zaznamenána převážně u vzorků s přidavkem koloidního stříbra, nicméně nejvyšší antioxidační hodnota byla naměřena u vzorku $CH_{LHRTiO_2,5}$ ($8.339 \pm 0.235 \mu\text{mol Trolox/g}$).

- Metodou DPPH, která udává míru zachycení volných radikálů - antioxidační aktivita vzorku CH_{LHR} je výrazně vyšší, než antioxidační aktivita vzorku CH_L ($p < 0,05$). Téměř u všech vzorků s přidavkem hroznového extraktu byla zaznamenána vyšší antioxidační aktivita. Nejvyšší antioxidační aktivita byla pozorována u vzorku $CH_{LHRAg50}$. Přídavek koloidního stříbra do obalového materiálu výrazně zvýšil antioxidační aktivitu.
- Metodou ABTS, která je založena na schopnosti eliminace volných radikálů - v souladu s výsledky z výše uvedených metod je antioxidační aktivita vzorku s hroznovým extraktem CH_{LHR} vyšší, než vzorek bez hroznového extraktu CH_L . Tento trend se projevuje i u vzorků s přidavkem nanočástic/koloidního stříbra. Nejvyšší antioxidační aktivita byla pozorována u vzorku $CH_{LHRAg50}$ (3.004 ± 0.187). Tento vzorek je statisticky významný se vzorky CH_L a CH_{LHR} ($p < 0,05$). Naopak nejnižší hodnoty antioxidační aktivity byly naměřeny u vzorků bez hroznového extraktu s přidavkem nano TiO_2 . Z výsledků lze pozorovat antioxidační efekt přidaného hroznového extraktu.
- Metodou CUPRAC - z výsledků je patrný rozdíl mezi antioxidační kapacitou CH_L a CH_{LHR} . Přídavek hroznového extraktu zvýšil antioxidační kapacitu více než dvojnásobně. Vysoká antioxidační aktivita se projevuje i u vzorků s nanočásticemi/koloidním stříbrem a s přidavkem hroznového extraktu. Oproti ostatním vzorkům byly naměřeny vyšší antioxidační aktivity u vzorků s přidavkem koloidního stříbra. Nejvyšší hodnotu antioxidační aktivity vykazoval vzorek $CH_{LHRAg30}$ ($23.213 \pm 0.192 \mu\text{mol Trolox/g}$).

b) 3D tisk čokoládových obalů

Tabulka 2 uvádí složky čokoládových obalů.

Tabulka 2: Složení vzorků 3D tisku

Vzorek	Složení
control	čokoláda
Choco _{Zn0,05}	čokoláda + 0,05% nano ZnO
Choco _{Zn0,2}	čokoláda + 0,2% nano ZnO
Choco _{Zn0,5}	čokoláda + 0,5% nano ZnO
Choco _{Ag10}	čokoláda + koloidní Ag 10 ppm
Choco _{Ag30}	čokoláda + koloidní Ag 30 ppm
Choco _{Ag50}	čokoláda + koloidní Ag 50 ppm

Obsah polyfenolů u 3D tisku čokoládových vzorků

I když s rostoucí koncentrací nano ZnO a koloidního stříbra klesá obsah kyseliny gallové, v porovnání s kontrolou, přídavek nanomateriálu a koloidního stříbra ve většině vzorků pozitivně ovlivnil antioxidační aktivitu. Nejvyšší antioxidační aktivita byla naměřena u vzorku čokolády obsahující 0,05 % nano ZnO ($8.284 \pm 1.138 \text{ mg gallové kyseliny/ml}$).

Výsledky antioxidačních aktivit měřených metodou FRAP se pohybovaly v nižších hodnotách, než je tomu u výsledků antioxidačních aktivit měřených metodou CUPRAC. U metody FRAP vzorek Choco_{Ag50} a vzorky obsahující nano ZnO vykazovaly nižší hodnoty antioxidační aktivity v porovnání s kontrolou. Naopak vzorky s přidavkem koloidního stříbra Choco_{Ag10} a Choco_{Ag30} se projevily vyšší antioxidační aktivitou.

Z hlediska metody CUPRAC kontrola vykazovala nejvyšší antioxidační aktivitu. Přídavek nanomateriálů a koloidního stříbra způsobilo pokles antioxidační aktivity u všech vzorků. Nejnižší hodnoty byly zaznamenány u vzorku Choco_{Zn0,2} ($79,118 \pm 1,135 \mu\text{mol Troloxu/g}$). V případě přídavku koloidního stříbra byla pozorována nejnižší aktivita u vzorku Choco_{Ag50} ($89,524 \pm 0,936 \mu\text{mol Troloxu/g}$).

Metoda DPPH vykazovala několikanásobně vyšší antioxidační aktivity čokoládových objektů, než je tomu u metody ABTS. Nejvyšší antioxidační aktivita byla pozorována u vzorku Choco_{Ag50} ($82.045 \pm 1.117 \%$), který byl statisticky významný vůči kontrole ($p < 0,05$). Antioxidační aktivity ostatních vzorků tištěné čokolády byly velmi

podobné antioxidační aktivitě kontrolního vzorku. U metody ABTS byla pozorována vyšší antioxidační aktivita oproti kontrole u vzorku Choco_{Zn0,5} a u vzorků s obsahem koloidního stříbra, přičemž nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval vzorek Choco_{Ag30} (13.085 ± 1.241 %).

Z výsledků texturálního měření vyplývá, že přídavek nano ZnO a koloidního stříbra několikanásobně zvýšil tvrdost čokoládového objektu. Výjimku tvoří vzorek obsahující 0,05 % nano ZnO. Vzorky obsahující koloidní stříbro vykazují mnohonásobně vyšší tvrdost, než vzorky obsahující nano ZnO. Nejvyšší hodnota tvrdosti byla zaznamenána u vzorku Choco_{Ag10} (2389.833 ± 1460.037 g).

c) Skladovací pokus s balenými jahodami

Ztráta vody

V průběhu skladovacího procesu byl v jahodách pokrytých chitosanovým filmem sledován úbytek vody. Nejvyšší úbytek vody ve 3. dni skladování byl zaznamenán u vzorku CH_{LHRZn0,05}. V porovnání s kontrolou byl sledován nižší úbytek vody u vzorku CH_L a naopak vyšší úbytek vody u vzorku CH_{LHR}. Z hlediska 7. dne, nejvyšší úbytek vody vykazoval vzorek CH_{LZn0,5}. Trend úbytku vody u kontrolního vzorku a vzorků CH_L a CH_{LHR} byl podobný jako ve 3. den skladování. Dle výsledku je patrné, že u většiny vzorků aplikace chitosanového obalu způsobil nižší úbytek vody v průběhu skladování.

Změna antioxidační aktivity

Z výsledků je v porovnání s kontrolou patrná vyšší antioxidační aktivita u vzorků CH_L a CH_{LHR} 0. a 7. den. Ačkoliv 0. den mají téměř všechny vzorky oproti kontrole vyšší antioxidační aktivitu, v průběhu skladování jejich antioxidační aktivita klesá pod hodnotu antioxidační aktivity kontroly. Na konci skladovacího pokusu byla antioxidační aktivita vzorků s obsahem nanočástic/koloidního stříbra velmi podobná. Nejvyšší pokles antioxidační aktivity byl zaznamenán u vzorku CH_{LHRAg50} ($9.222 \pm 0.123 \rightarrow 7.827 \pm 0.279 \rightarrow 2.932 \pm 0.106$), kde se projevuje statistická významnost vůči vzorku CH_{LHR} ($p < 0,05$).

Chitosanové obalové systémy se vyznačují nízkou aktivitou vychytávání volných radikálů, což se projevuje i ve výsledcích - je patrný pokles antioxidačních aktivit u vzorků CH_L a CH_{LHR} ve srovnání s kontrolou. Antioxidační aktivity obalů s nanočásticemi/koloidním stříbrem jsou velmi podobné, a to bez ohledu na přídavek hroznového extraktu. Nejvyšší antioxidační aktivita v 7. den skladování byla naměřena u vzorku CH_{LHRAg10} (86.817 ± 0.209 %), kde se vyskytuje statistická významnost ($p < 0,05$) oproti vzorkům CH_L a CH_{LHR}.

Z výsledků skladovacího pokusu máčených jahod v chitosanové matici je zřejmý pokles antioxidační aktivity měřené metodou ABTS při aplikaci chitosanového obalu. V 7. den byla antioxidační aktivita kontroly vyšší, než vzorky CH_L a CH_{LHR}. Pokles antioxidační aktivity byl pozorován i po přidavku nanočástic/koloidního stříbra. Nicméně u vzorků s nanočásticemi/koloidním stříbrem obohacenými o hroznový extrakt se projevila vyšší antioxidační aktivita oproti vzorkům bez přídavku hroznového extraktu. Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval vzorek CH_{LHRAg10} (4.369 ± 0.140 %), u kterého docházelo naopak k nárůstu antioxidační aktivity v průběhu skladování. U tohoto vzorku byla zaznamenána statistická významnost s kontrolou, CH_L a CH_{LHR} ($p < 0,05$).

Z výsledků měření antioxidační aktivity jahod potažených chitosanovým obalem metodou CUPRAC je patrný vzrůst antioxidační aktivity u řady vzorků. V porovnání s kontrolou, vzorkem CH_L a CH_{LHR} je antioxidační aktivita 7. den skladování u všech vzorků nižší. Nejvyšší antioxidační aktivita vzorků s nanočásticemi/koloidním stříbrem na konci skladovacího pokusu byla sledována u vzorku CH_{LHRAg10} (23.651 ± 0.858 μmol Trolox/g).

Textura jahody

Byla hodnocena pevnost kůže (slupky) jahody a elasticita. V rámci dne 0 byla nejnižší hodnota v případě jahod balených v chitosanu s přídavkem hroznového extraktu ($125,23 \pm 20,96$ g) a nejvyšší hodnoty u obalu z koloidního stříbra v koncentraci 50 ppm ($168,68 \pm 13,54$ g) a s přídavkem nanozinku o koncentraci 0,05 % a extraktem z červených hroznů ($168,16 \pm 26,42$ g). V případě dne 0 nebyly mezi jednotlivými vzorky zjištěny statisticky významné rozdíly ($p > 0,05$). U 3. dne už u některých vzorků docházelo k velkému zvyšování pevnosti slupky. U dne 0 a dne 7 nebyl v případě elasticity mezi jednotlivými vzorky zjištěn statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$).

d) Hodnocení povrchu jedlých obalů

U jedlých obalů byl hodnocen povrch a lom.

Srovnání kontroly CH_L a kontroly s přídavkem hroznové šťávy CH_{LHR} vykazuje minimální rozdíly. U CH_{LHR} je patrný malý výskyt nerozpustných částic hroznových extraktů potvrzených jak na ploše tak v lomu. Distribuce nerozpustného podílu je náhodná, a nedochází k oddělení termodynamických fází.

Přídavek ZnO do jedlého obalu se projevuje vznikem zdrsnění obalu ve srovnání s kontrolou. ZnO mají z pohledu mikrostruktury pravidelnou kruhovou strukturu, která se projevuje také na struktuře formovaného jedlého obalu. Přičemž při větším zvětšení je patrná kruhovitá struktura ZnO promenující na povrch. Naše studie potvrdila krystalické výkvěty zejména na povrchu obalů. U vzorků ZnO a ZnO_{Hr} v koncentracích 0,2-0,5 % byly dále pozorovány štěrbinové porušení povrchu jedlého obalu. Původ štěrbin je způsoben rozdílnými termodynamickými vlastnostmi obou materiálů. V lomu byly pozorovány krystaly a fázové segregace u vzorků ZnO_{Hr} 0,05 a 0,2 %. Vzorek ZnO_{Hr} 0,5 % byl charakterizován velkými nerovnoměrnými krystaly spolu s odlupujícími se částmi v důsledku fázové segregace. Distribuce částic byla nerovnoměrná na povrchu stejně tak i v lomu obalu.

Přídavek TiO₂ byl na mikrosnímčích rovněž pozorován, byl potvrzen tvar oválný. Formování krystalů bylo potvrzeno na povrchu ale také v lomu obalu. Koloidní stříbro by mělo vytvářet struktury, které způsobují zdrsnění povrchu nebo jsou viditelné na lomu, v našem případě však nebyla přítomnost koloidního stříbra potvrzena.

Rozdíly mezi vzorky s 10 % hroznovým extraktem a vzorky bez extraktu, byly potvrzeny ve všech vyšetřených vzorcích. U jedlých obalů s přídavkem hroznového extraktu byla potvrzena přítomnost blíže neurčitelných struktur, které pochází z procesu extrakce. Jejich začlenění do chitosanové sítě ale bylo potvrzeno, jejich přítomnost způsobila prominanci biofilmu, která je způsobena adhezí chitosanu k rostlinným tkáním.

e) Hodnocení alergenicity

Metodou sendvičového enzymatického imunisorbentního testu (ELISA) byl zjišťován obsah bílkovin s alergenním potenciálem v obalech, jejichž součástí byl chitosan a u poloviny vzorků také hroznová mouka ve stejné koncentraci. Vzorky dále obsahovaly přídavek nanočástic zinku (ZnO), titanu (TiO₂) nebo koloidní roztok stříbra (Ag) v různých koncentracích.

Kontrolní vzorek chitosanu bez přídavku hroznové mouky vykazoval statisticky významně ($p \leq 0,05$) vyšší reaktivitu ($27,49 \pm 0,04$ ppm) než kontrolní vzorek chitosanu s přídavkem hroznové mouky ($11,09 \pm 0,05$ ppm). Antigenní reaktivita ve vzorcích obohacených nanočásticemi oxidu zinečnatého bez přídavku hroznové mouky stoupala se zvyšující se koncentrací oxidu zinečnatého ($33,67 \pm 0,60$ ppm pro 0,05 ZnO; $44,55 \pm 2,77$ ppm pro 0,2 ZnO a $44,61 \pm 3,87$ ppm pro 0,5 ZnO), podobně jako u vzorků s obsahem hroznové mouky ($1,70 \pm 0,01$ ppm pro 0,05 ZnO; $2,17 \pm 0,03$ ppm pro 0,2 ZnO a $2,76 \pm 0,05$ ppm pro 0,5 ZnO), kdy reaktivita antigenů měla také vzrůstající tendenci.

Se zvyšujícím se obsahem nanočástic oxidu titaničitého ve vzorcích se snižovala reaktivita antigenů, jak ve vzorcích obohacených hroznovou moukou ($3,59 \pm 0,02$ ppm pro 0,05 TiO₂; $2,47 \pm 0,04$ ppm pro 0,2 TiO₂ a $0,08 \pm 0,02$ ppm pro 0,5 TiO₂), tak i ve vzorcích bez hroznové mouky ($35,87 \pm 1,70$ ppm pro 0,05 TiO₂; $30,97 \pm 0,31$ ppm pro 0,2 TiO₂ a $20,26 \pm 0,04$ ppm pro 0,5 TiO₂).

Jiná situace byla zjištěna u vzorků obalů s obsahem koloidního stříbra a hroznové mouky, kdy se reaktivita antigenů zvyšovala se zvyšující se koncentrací koloidního Ag ($3,98 \pm 0,05$ ppm pro 10 Ag; $10,19 \pm 0,04$ ppm pro 30 Ag a $25,98 \pm 1,30$ ppm pro 50 Ag), zatímco u vzorků bez přídavku hroznové mouky se zvyšující se koncentrací koloidního Ag se reaktivita snižovala ($25,90 \pm 0,96$ ppm pro 10 Ag; $21,10 \pm 0,32$ ppm pro 30 Ag a $15,85 \pm 0,12$ ppm pro 50 Ag).

Rozdíly mezi vzorky stejné koncentrace s přídavkem a bez přídavku hroznové mouky byly ve všech případech statisticky významné ($p \leq 0,05$).

Výsledky potvrdily změnu imunoreaktivity následkem přídavku zdroje fenolických látek (hroznová mouka). Všechny vzorky s přídavkem hroznové mouky vykazovaly nižší imunoreaktivitu než vzorky bez přídavku, s výjimkou vzorků s přídavkem 50 ppm koloidního stříbra. U koloidního stříbra s přídavkem hroznové mouky je pozorována opačná závislost než u vzorků bez přídavku. Tento vztah může být vysvětlen reakcí fenolických látek s koloidním stříbrem.

f) Senzorické hodnocení obalů

Kvantitativní deskriptivní analýza

Analýzou faktorů byla potvrzena úzká korelace mezi intenzitou barvy a intenzitou vůně. Naopak mezi deskriptory charakteru povrchu (hodnoty se pohybují od nejnižších pro hladký povrch po nejvyšší pro drsný povrch) a lepivost byla potvrzena záporná korelace. Mezi jednotlivými vzorky jedlých obalů existovala řada statisticky významných rozdílů. Na mapě vzorků se jednoznačně vyčlenil odlehlý vzorek Zn_05 charakteristický vysokou drsností povrchu a současně velmi nízkými hodnotami intenzity barvy, intenzity vůně, lepivosti i flexibility. Druhým odlehlým vzorkem byl vzorek ZnGR_05 charakteristický rovněž vysokou drsností povrchu,

nízkou lepivostí a flexibilitou, ale současně statisticky významně vyšší intenzitou vůně i barvy. Vzorky obsahující hroznový extrakt patřily obecně ke vzorkům charakteristickým intenzivnější barvou i vůní, a to z důvodu přítomnosti typických antokyanových barviv a řady charakteristických těkavých aromatických látek. Výrazně se lišil také kontrolní vzorek bez obsahu nano-kovů a rovněž bez obsahu hroznového extraktu, který byl charakteristický hladkým povrchem, nízkou intenzitou barvy i vůně, vyšší lepivostí i flexibilitou. Hodnoty flexibility vzorků s obsahem nano-kovů, avšak bez přidaného hroznového extraktu vykazovaly spíše vyšší flexibilitu, srovnatelnou s kontrolním vzorkem. Charakter povrchu se pohyboval v širším intervalu od 1,89 do 8,49. Přídavek nano-kovů rovněž přispěl ke změně instrumentálně stanovené barvy v systému CIELab, a to výrazným snížením hodnot L^* a současně zvýšením hodnot a^* and b^* , což se projevilo mírným načervenalým a nažloutlým nádechem. V rámci naší studie byla sensoricky hodnocena intenzita barvy obalů, která byla u většiny vzorků bez obsahu hroznového extraktu mírně vyšší ve srovnání s kontrolním vzorkem.

Hedonická analýza

Analýzou faktorů byla potvrzena úzká korelace mezi celkovým hodnocením a příjemností vzhledu, poté příjemností vůně. Z mapy vzorků zobrazující statisticky významné ($p > 0.05$) rozdíly mezi jednotlivými jedlými obaly je vidět, že mezi jednotlivými vzorky jedlých obalů existovala řada statisticky významných rozdílů. Na mapě vzorků se jednoznačně vyčlenil odlehlý vzorek Ag_50 charakteristický nejnižšími hodnotami příjemnosti ve všech hodnocených deskriptorech. Druhým odlehkým a nejhůře hodnoceným vzorkem byl vzorek Ti_05. Nejlépe hodnoceným byl kontrolní vzorek bez obsahu nano-kovů a hroznového extraktu, který však byl těsně následován vzorky s obsahem nano-zinku v koncentracích 0,2 a 0,05 %. Všechny tyto vzorky dosahovaly nízkých hodnot v intenzitě barvy a vůně a vyznačovaly se hladkým povrchem s vysokou flexibilitou. Vysoké skóre v celkovém hodnocení tedy souviselo s jejich neutrálním charakterem, který je u jedlých obalů preferován. Z tohoto důvodu dosahovaly obecně vyšších hodnot vzorky neobsahující hroznový extrakt, nicméně u vzorku ZnGR_02 bylo dosaženo průměrných hodnot a byl vyhodnocen jako celkově přijatelný. Přídavek nano-kovů je významný z funkčního hlediska a umožňuje výrobu obalů s antimikrobiální aktivitou, vzorky s vyšší koncentrací přídavku nano-kovu však dosahovaly nižší příjemnosti.

Hodnocení pravděpodobnosti nákupu potravinářských komodit v jedlém obalu

Výsledky analýzy pravděpodobnosti nákupu různých skupin potravinových komodit zabalených do jednotlivých jedlých obalů ukazují, že hodnotitelé si nedokázali představit využití analyzovaných jedlých obalů pro skupiny komodit, jako jsou masné výrobky, mléčné výrobky (sýry), pekařské výrobky či ovoce a zelenina. Nejvyšších hodnot a tudíž i nejvyšší pravděpodobnosti nákupu potravin dosáhl kontrolní vzorek neobsahující hroznový extrakt ani nano-kov. Ze vzorků obsahujících nano-kovy bylo pro hodnotitele nejlépe představitelné využití vzorků s 0,05% a 0,2% koncentrací nano-zinku, a to pro všechny hodnocené typy komodit, poté vzorku Ti_005, a to pro balení ovoce, zeleniny a mléčných výrobků.

g) Hodnocení barvy obalů

U vzorků s přídavkem stříbra došlo oproti kontrolním vzorkům (CH_L a CH_{LHR}) ke snížení parametru L , naopak u parametrů a^* a b^* došlo ke zvýšení (v závislosti na přidané koncentraci). Také byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi kontrolními vzorky a vzorky s přídavky stříbra (ΔE). Průhlednost obalů se se zvyšujícími koncentracemi snižovala. Stejně se také snižoval index bělosti. Výsledky ukazují, že ve vzorcích s přídavkem Ag byla snížena průhlednost a bělost. Snížení jasů (L) lze navíc připsat neprůhlednosti nanočástic stříbra. Vlivem přídavků nanočástic stříbra se zvyšuje parametr ΔE a mění se barva obalů až na tmavě hnědou v závislosti na koncentraci nanočástic stříbra. V naší studii jsme dosáhly obdobných výsledků. U vzorků obalů s přídavkem nanočástic TiO_2 se ΔE zvyšovala a whiteness index se také díky jejich přítomnosti zvýšil. Obaly obsahující TiO_2 měly se zvyšující se koncentrací také vyšší parametr L , b^* , ΔE i Whiteness index. Se zvyšováním přídavku nanočástic ZnO se zvyšuje ΔE .

h) Závěry

Výzkum byl zaměřen na možnost výroby jedlých/biodegradabilních obalů s využitím nanokovů a hroznových výlisků. Výsledky ukázaly určité interakce mezi přidanými složkami, a to s ohledem na druh složky a/ nebo jejím množstvím. Texturní parametry obalů byly ovlivněny zejména recepturou, přídavek nanokovů se projevil vyšší tvrdostí experimentálně vyrobených obalů. Obsah vody a rozpustnost byly ovlivněny různými recepturami. Rozpustnost se zvýšila pouze u vzorků s přídavkem nano ZnO. Přidání nano TiO vedlo k nejvyšší antioxidační kapacitě, i když v závislosti na metodě provedené antioxidační kapacity. Byla prokázána možnost vyrobených filmů/obalů aplikace na jahody a výsledky prokázaly nižší ztrátu vody u balených vzorků. Řešení

projektu přineslo četné výsledky a řada zjištění, zejména interakce jednotlivých složek a jejich vliv na celkové vlastnosti obalu, by měly být předmětem dalších experimentů.

Výsledky jsou obsahem Přílohy 1 závěrečné zprávy.

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Výsledky získané v rámci řešení projektu odpovídají stanoveným cílům a zahrnují např.:

- nové informace ve výzkumu jedlých obalů, týkající se jejich složení a postupu výroby,
- nové informace ve výzkumu jedlých obalů, týkající se jejich technologických vlastností,
- zavedení nových metod výroby jedlých matric pomocí 3D tisku,
- zavedení nové metody (CUPRAC) pro stanovení antioxidačních vlastností.

Byly získány zcela nové dosud nepublikované výsledky, cílené pro odbornou a vědeckou veřejnost v oblasti bezpečnosti potravin. Výsledky jsou k srovnání s výsledky jiných kolektivů a budou publikovány na odborných konferencích a zpracovány formou impaktovaného článku. Řešené téma je začleněné do současně řešené problematiky ústavu a je řešené také v rámci DSP prací.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Výsledky budou využity k publikování impaktovaných článků. Výsledky výzkumu mohou potvrdit důležitost výzkumu navrhovaného k řešení z hlediska prokázání možnosti výroby jedlých obalů a jejich uplatnění pro balení a skladování různých jedlých matric. Výsledky jsou také základ pro další navazující výzkumy, které se budou v budoucnosti tímto výzkumem ještě podrobněji zabývat.

Publikace budou po uveřejnění zaslány ITA VFU Brno.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž se předpokládá publikace dosažených výsledků:

Biodegradable packaging produced with the addition of nanometals and its influence on wrapped fruit. Foods, 4.0 (Q1)

Colloidal silver included in biodegradable packaging: textural and microbial properties. Polymers, 3.1 (Q1)

3D print of edible packaging. LWT-FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, 4.0 (Q1)

Influence of the addition of grape flour and selected nanoparticles on the immunoreactivity of edible packaging containing chitosan by ELISA method. Food And Agricultural Immunology, IF 3,1; Q2

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	655 200	655 200
Služby	129 000	2 545,82
Cestovné	10 000	0
Další provozní náklady	498 391	500 753,59
Doplňkové náklady	193 888	193 888
Celkem	1 486 479	1 352 387,41

Zdůvodnění nákladů:

Osobní náklady a stipendia

Jsou stanoveny v souladu s podmínkami na 46,37 % (včetně odvodů fakulty) a jsou určeny pro:

- odměnu hlavnímu řešiteli za zpracování podkladů k projektu, kontrolu řešení projektu, vypracování a obhájení závěrečné zprávy,
- odměny spoluřešitelů (akademičtí pracovníci) za vypracování podkladů, řešení konkrétních úkolů, odpovědnost za konkrétní metodiku nebo dílčí úkol, zpracování výsledků a podkladů pro závěrečnou zprávu, za přípravu publikací,
- stipendium studentů DSP za řešení konkrétních úkolů, odpovědnost za konkrétní metodiku zpracování výsledků a podkladů pro závěrečnou zprávu a publikaci.

Služby - prostředky byly čerpány formou pronájmu k tlakovým lahvím plynu.

Cestovné – nebylo možné vyčerpat s ohledem na pandemii Covid-19.

Další provozní náklady:

DHM – 3D tiskárna, PC sestava pro GLC – PC2, monitor M3 dle specifikace pro VZ, sušící váhy, SD karty, záložní pevný disk

spotřební materiál – běžné a speciální chemikálie, vzorky ovoce, laboratorní sklo speciální, ochranné rukavice, speciální kity (Veratox for Crustacea Allergen) a testy, Petriho misky, histologické skla a kazety, univerzální testovací vzorky nanočástic pro kalibraci SEM, laboratorní sklo, terčíky pro SEM analýzu, laboratorní pomůcky

další – odborná literatura

Doplňkové náklady:

Byly stanoveny ve výši 15 % z plánovaných přímých nákladů projektu.

Celkové plánované náklady nebyly vyčerpány.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – výpis z IFIS

k závěrečné zprávě je doložen výpis z IFIS dne 11. 1. 2022, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků.

9. Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VETUNI bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu: doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu **odpovědného za čerpání prostředků:**

doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.

Přednosta ústavu nebo kliniky, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu nebo klinice, respektive celoškolském pracovišti, které řídí.

Datum, jméno a podpis

přednosty ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:
doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:
Ing. Luděk Vítoslavský

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:
doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.

Razítko

Příloha 1_ závěrečná zpráva ITA_Tremlová_2021

Výroba biodegradabilních/jedlých obalů a filmů s přidavkem kovových nanočástic

Materiál a metodika

Příprava výlisků

Pro výrobu výlisků byly použity červené hrozny bezpečkové, odrůda Scarlotta Seedless vypěstované v Jižní Africe a zakoupené v běžné tržní síti (Tesco, Brno, Česká republika). Z červených hroznů byla získána šťáva pomocí odšťavňovače Catler JE 4011. Vedlejší produkt vznikající při výrobě šťávy - výlisky, byly dále přendány do sáčků a zmrazeny pro další použití.

Příprava extraktu

Z rozmražených výlisků bylo odváženo 10 g, ke kterým bylo přidáno 100 ml vroucí destilované vody (100°C) a po 10 minutách byla provedena filtrace (filtrační papír Whatmann č. 1), extrakt o laboratorní teplotě byl následně použitý pro přípravu obalů.

Příprava obalů

Výroba obalů s přidavkem nanočástic

Nejprve byly naváženy příslušné nanočástice (ZnO nebo TiO₂) v koncentracích 0,02; 0,2 a 0,5 %. Poté bylo přidáno 135 ml 1% kyseliny mléčné rozpuštěné v destilované vodě. Následně bylo přidáno 1,5 g chitosanu a směs byla rozmíchána. Dále byla kádinka se směsí zahřívána na plotýnce do ztekucení a následně míchána na magnetické míchačce (15 minut) při 50°C a rychlosti 750 rpm. V dalším kroku bylo přidáno 0,75 ml glycerolu a následovalo míchání po dobu 5 minut za stejných podmínek. Poté byl film formující roztok přelit do Petriho misky o průměru 150 cm. V případě, kdy byl do obalu přidáván i extrakt z červených hroznů následoval tento přídavek po 15 minutách míchání, a to v objemu 13,5 ml; zároveň bylo na začátku použito o 13,5 ml méně kyseliny mléčné.

Výroba obalů s přidavkem koloidního stříbra

Nejprve byly naváženy příslušné nanočástice (ZnO nebo TiO₂) v koncentracích 0,02; 0,2 a 0,5 %. Poté bylo přidáno 135 ml 1% kyseliny mléčné rozpuštěné v koloidním stříbru o koncentracích 10, 30 a 50 ppm. Poté bylo přidáno 1,5 g chitosanu a směs byla rozmíchána. Následně byla zahřívána na plotýnce do ztekucení a následovalo míchání na magnetické míchačce po dobu 15 minut při 50°C a rychlosti otáček 750 rpm. Následovalo přidání 0,75 ml glycerolu a míchání po dobu 5 minut a vylití do Petriho misek o průměru 150 cm. V případě, kdy byl do obalu přidáván i extrakt z červených hroznů následoval tento přídavek po 15 minutách míchání a to v objemu 13,5 ml; zároveň bylo na začátku použito o 13,5 ml méně roztoku kyseliny mléčné v koloidním stříbru.

Tabulka 1: Složení vyrobených obalů

Vzorek	Složení
CH _L	Chitosan + 1% kyselina mléčná + glycerol
CH _{LHR}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 10 % extrakt* + glycerol
CH _{LZn0,05}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,05% nano ZnO + glycerol
CH _{LZn0,2}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,2% nano ZnO + glycerol
CH _{LZn0,5}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,5% nano ZnO + glycerol
CH _{LTiO,05}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,05% nano TiO ₂ + glycerol
CH _{LTiO,2}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,2% nano TiO ₂ + glycerol
CH _{LTiO,5}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,5% nano TiO ₂ + glycerol
CH _{LAg10}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + koloidní Ag 10 ppm + glycerol
CH _{LAg30}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + koloidní Ag 30 ppm + glycerol
CH _{LAg50}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + koloidní Ag 50 ppm + glycerol
CH _{LHRZn0,05}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,05% nano ZnO + 10 % extrakt* + glycerol
CH _{LHRZn0,2}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,2% nano ZnO + 10 % extrakt* + glycerol

CH _{LHRZn0,5}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,5% nano ZnO + 10 % extrakt* + glycerol
CH _{LHRTiO,05}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,05% nano TiO ₂ + 10 % extrakt* + glycerol
CH _{LHRTiO,2}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,2% nano TiO ₂ + 10 % extrakt* + glycerol
CH _{LHRTiO,5}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + 0,5% nano TiO ₂ + 10 % extrakt* + glycerol
CH _{LHRAg10}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + koloidní Ag 10 ppm + 10 % extrakt* + glycerol
CH _{LHRAg30}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + koloidní Ag 30 ppm + 10 % extrakt* + glycerol
CH _{LHRAg50}	Chitosan + 1% kyselina mléčná + koloidní Ag 50 ppm + 10 % extrakt* + glycerol

*extrakt z červených hroznů

Příprava 3D čokoládových matic

Pro přípravu matrice pro 3D tisk byla použita čokoláda 3D Choco Dark (mycusini[®], Německo).

Příprava 3D čokoládových matic s přidavkem nanočástic

Nejdříve bylo temperováno příslušné množství čokoládové matrice. Po temperaci na 45 °C, bylo do matrice přimícháno množství nanočástic odpovídající koncentraci 0,05; 0,2 a 0,5 %. Čokoládová matrice spolu s nanočásticemi byla dále temperována na 45 °C po dobu 20 min. Poté byla čokoládová směs ponechána při laboratorní teplotě 2 h a následně uchovávána při +7 °C.

Příprava 3D čokoládových matic s přidavkem koloidního stříbra

Nejdříve bylo temperováno příslušné množství čokoládové matrice. Po temperaci na 45 °C, byl do matrice přimíchán 1 ml koloidního stříbra o koncentraci 10; 30 a 50 ppm. Čokoládová matrice spolu s koloidním stříbrem byla dále temperována na 45 °C po dobu 20 min. Poté byla čokoládová směs ponechána při laboratorní teplotě 2 h a následně uchovávána při +7 °C.

Tabulka 2: Složení vzorků 3D tisku

Vzorek	Složení
control	čokoláda
Choco _{Zn0,05}	čokoláda + 0,05% nano ZnO
Choco _{Zn0,2}	čokoláda + 0,2% nano ZnO
Choco _{Zn0,5}	čokoláda + 0,5% nano ZnO
Choco _{Ag10}	čokoláda + koloidní Ag 10 ppm
Choco _{Ag30}	čokoláda + koloidní Ag 30 ppm
Choco _{Ag50}	čokoláda + koloidní Ag 50 ppm

3D tisk čokolády

Pro 3D tisk byla použita 3D tiskárna mycusiny[®] (Print2Taste, Německo), nerezová tryska (Print2Taste, Německo) a šablona Cylinder z nabídky předloh od výrobce. Před 3D tiskem byly matrice temperovány 30 min při laboratorní teplotě. 3D tisk probíhal při teplotě 45 °C a rychlostí nastavenou výrobcem. Po vytisknutí byly matrice uchovávány při +7 °C.

Balení jahod

Jahody byly zakoupeny v běžné tržní síti (Tesco, Brno, Česká republika), odrůda Harmony, pěstované v České republice.

Pro balení byly vybrány pouze nepoškozené kusy jahod. Byly ponořeny do film formujících roztoků (viz. Tabulka 1) o teplotě 25-30°C po dobu 30 s. Následně byly vytaženy, krátce okapány a přendány na Petriho misku k dosušení, pro každý vyrobený film formující roztok bylo použito 12 kusů jahod. Jahody se nechaly schnout po dobu 2 hodin. Dále byly umístěny do skladovací misky, tak aby se vzájemně nedotýkaly. Pro pokus byly také skladovány jahody bez obalu. Poté byly provedeny analýzy (FRAP, DPPH, ABTS, CUPRAC, polyfenoly, textura, ztráta hmotnosti) ve dnech 0, 3 a 7.

Tloušťka obalů

Tloušťka obalů byla měřena pomocí mikrometru Mitotuyo M310-25 (Kawasaki, Japonsko). Každé měření bylo zopakováno 5x pro každý druh obalu.

Obsah vody, stupeň smáčení a rozpustnost

Obsah vody, stupeň smáčení a rozpustnost byly staveny dle Souza et al. (2017) s drobnými úpravami. Pro analýzu byly nejprve vystřiženy z každého obalu 3 čtverce o rozměrech (2x2 cm), které byly zváženy (W1), přendány do zvážených misek a umístěny do sušárny (EcoCell 55) po dobu 2 hodin při 105°C. Poté byly obaly znovu zváženy (W2) a ponořeny do kádinek s 25 ml destilované vody po dobu 24 hodin. Po 24 hodinách byly nerozpuštěné vzorky znovu zváženy (W3) a přemístěny do sušárny po dobu 24 hodin při 105°C a poté znovu zváženy (W4).

Obsah vody, stupeň smáčení a rozpustnost byly zjištěny podle následujících vzorců:

$$\begin{aligned}\text{Obsah vody (\%)} &= [(W - W2)/W1] \times 100 \\ \text{Rozpustnost (\%)} &= [(W2 - W4)/W2] \times 100 \\ \text{Stupeň smáčení (\%)} &= [(W3 - W2)/W2] \times 100\end{aligned}$$

ABTS

Metoda stanovení antioxidační aktivity ABTS byla provedena dle Thaiponga et al. (2006). Do tmavých lahvíček bylo naváženo 0,1 g vzorku, ke kterému bylo přidáno 20 ml směsi ethanol:voda (1:1) a vzorky byly ultrazvukovány po dobu 30 minut. 12- 16 hodin před měřením bylo smícháno 10 ml 0,007M roztoku ABTS s 10 ml 0,00245M roztoku peroxidisíranu draselného. Roztok byl před samotným měřením zředěn tak, aby jeho výsledná absorbance při 735 nm byla 0,7. Poté bylo smícháno 1980 µl roztoku ABTS s 20 µl připraveného extraktu obalu nebo jahod. Vzorky byly inkubovány po dobu 5 minut ve tmě a následně byla změřena absorbance při 735 nm. Výsledky byly vypočítány podle následujícího vzorce:

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

DPPH

Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH dle Sivaroobana et al. (2008) Do tmavých lahvíček bylo naváženo 0,1 g vzorku, ke kterému bylo přidáno 20 ml směsi ethanol:voda (1:1) a vzorky byly ultrazvukovány po dobu 30 minut a poté přefiltrovány. 1 ml 0,1 mM roztok DPPH bylo smícháno se 3 ml extraktu a po 30 minutách inkubace ve tmě byla změřena absorbance na spektrofotometru CECIL při 517 nm.

$$\text{DPPH (\%)} = [(Abs_{\text{DPPH}} - Abs_{\text{DPPH}}) / Abs_{\text{DPPH}}] \times 100$$

FRAP

Pro stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP dle Behbahaniho et al. (2017) bylo naváženo 0,1 g vzorku, ke kterému bylo přidáno 20 ml směsi ethanol:voda (1:1) a vzorky byly poté ultrazvukovány ve vodní lázni po dobu 30 minut. Následně bylo odpipetováno 180 µl extraktu do tmavých lahvíček, do kterých se přidalo 300 µl destilované vody a 3,6 ml pracovního roztoku (octový pufr, TPTZ a FeCl₃). Vzorky byly dále inkubovány po dobu 8 minut ve tmě. Absorbance byla změřena při vlnové délce 593 nm oproti slepému vzorku (destilovaná voda + pracovní roztok). Trolox byl použit pro přípravu kalibrační křivky a výsledky byly vyjádřeny jako µmol Troloxu na gram vzorku.

Stanovení celkových polyfenolů spektrofotometricky

Celkový obsah polyfenolů byl měřen pomocí metody Folin-Ciocalteu dle Tomadoniho et al. (2016). 0,1 g obalu bylo naváženo do tmavé lahvičky a poté bylo přidáno 20 ml směsi ethanol:voda (1:1). Vzorky byly extrahovány po dobu 30 minut v ultrazvukové lázni a následně byl odebrán 1 ml do 25 ml odměrné baňky, ke vzorku bylo přidáno 5 ml roztoku Folin Ciocalteu (naředěného 1:10) a 4 ml 7,5% Na₂CO₃. Vzorky byly inkubovány ve tmě po dobu 30 minut. Absorbance byla změřena při 765 nm oproti slepému vzorku (1 ml vzorku byl nahrazen 1 ml destilované vody). Výsledky byly vyjádřeny jako obsah mg gallové kyseliny na gram vzorku.

Stanovení polyfenolů pomocí HPLC

Pro stanovení polyfenolů byl použit vysokoúčinný kapalinový chromatograf HPLC 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Byla použita metoda podle Gómeze-Estaca et al. (2009) s modifikacemi. Mobilní fáze se skládala z 1% kyseliny fosforečné (A) a z acetonitrilu (B) v následujícím složení: 80% A a 20% B po dobu 20 min, 70% A a 30% B od 20 do 25 min, 60% A a 40% B od 25 do 40 min. Separace probíhala na koloně Zorbax SB-C18 4.6 x 250 mm (Agilent Technologies, USA) a detekce byla provedena na DAD detektoru (diode array detector).

Textura obaly

Síla (MPa) a pružnost (%) byly změřeny za použití texturometru TA.XT plus (Godalming, UK) za použití metody ASTM mezinárodní testovací metody – ASTM D882-02. Vyrobené obaly byly nastříhány na obdélníky o rozměrech 1 x 5 cm a každé měření bylo provedeno 5 x.

Textura jahody

Pro měření byl použit texturometr TA.XT plus (Godalming, UK). Textura jahod byla vyjádřena jako skin strength (pevnost slupky) (g) a pružnost (mm). Měření bylo provedeno 5 krát.

Textura čokoláda

Pro měření byl použit texturometr TA.XT plus (Godalming, UK). Textura 3D objektů byla vyjádřena jako tvrdost (g). Měření bylo provedeno 4x. Před měřením byly 3D objekty temperovány na laboratorní teplotu.

Statistická analýza

Ve všech tabulkách jsou prezentovány průměrné hodnoty \pm standardní odchylky, kdy všechny analýzy byly provedeny třikrát. Statistický význam $p < 0,05$ byl určen pomocí jedno-výběrového ANOVA testu s použitím parametrického Tukeyho testu (v případě, kdy Levenův test ukazoval hodnoty $p > 0,05$) a neparametrický Games-Howell post hoc test (v případě, kdy Levenův test ukazoval hodnoty $p < 0,05$). Pro statistické zpracování byl použit program IBM SPSS.

Výsledky a diskuze

Tloušťka obalů

V Tabulce 3 jsou uvedeny výsledky z měření tloušťky obalů. Tloušťka obalů se pohybuje v rozmezí 0,176 – 0,318 mm. Chitosanový obal bez přídavku hroznového extraktu vykazuje menší tloušťku, než je tomu u chitosanového obalu s přídavkem hroznového extraktu. Nicméně u vzorků obsahující nanočástice a koloidní stříbro pozorujeme větší tloušťku u obalů s přídavkem hroznového extraktu. Obaly obsahující hroznový extrakt a koloidní stříbro/nano TiO_2 se vyznačují největší tloušťkou, z nichž vzorek obsahující nano TiO_2 v 0,2 % vykazuje tloušťku až 0.318 ± 0.096 mm.

Tabulka 3: Obaly - tloušťka

Vzorek	Tloušťka (mm)
CH _L	0.212 \pm 0.068
CH _{LHR}	0.198 \pm 0.022
CH _{LZn0,05}	0.214 \pm 0.033
CH _{LZn0,2}	0.230 \pm 0.051
CH _{LZn0,5}	0.226 \pm 0.027
CH _{LTi0,05}	0.182 \pm 0.019
CH _{LTi0,2}	0.212 \pm 0.044
CH _{LTi0,5}	0.192 \pm 0.046
CH _{LAg10}	0.232 \pm 0.013
CH _{LAg30}	0.228 \pm 0.037
CH _{LAg50}	0.212 \pm 0.015
CH _{LHRZn0,05}	0.248 \pm 0.044
CH _{LHRZn0,2}	0.176 \pm 0.050

CH _{LHRZn0,5}	-
CH _{LHRTi0,05}	0.248 ± 0.054
CH _{LHRTi0,2}	0.318 ± 0.096
CH _{LHRTi0,5}	0.258 ± 0.054
CH _{LHRAg10}	0.224 ± 0.027
CH _{LHRAg30}	0.304 ± 0.062
CH _{LHRAg50}	0.260 ± 0.049

*horní indexy znázorňují statisticky významné rozdíly (p<0,05) mezi řádky

Obsah vody, rozpustnost a stupeň bobtnání

V Tabulce 4 jsou uvedeny výsledky obsahu vody, rozpustnosti a stupně bobtnání chitosanových obalů. Chitosanový obal s přidavkem hroznového extraktu vykazoval vyšší procentuální obsah vody, než chitosanový obal bez přidavku hroznového extraktu. Z použitých nanočástic a koloidního stříbra byl pozorován nejnižší obsah vody u vzorků s přidavkem nano ZnO, kde klesal obsah vody se zvyšující se koncentrací nano ZnO. Podle studie Indumathi and Rajarajeswari, 2019 snižuje začlenění ZnO do matrice hydrofilitu obalu. Nejvyšší procentuální obsah vody byl zaznamenán u obalů s přidavkem koloidního stříbra, kde byl procentuální obsah vody přímo úměrný zvyšující se koncentraci kovu. Rozpustnost chitosanových obalů byla vyšší u vzorků bez přidavku hroznového extraktu. Nejvyšší hodnoty rozpustnosti vykazovaly vzorky s přidavkem nano ZnO, kde rozpustnost rostla se zvyšující se koncentrací zinku.

Z výsledků je patrné, že velikost stupně bobtnání závisí na přidavku hroznového extraktu. U obalů bez přidavku hroznového extraktu je nejnižší stupeň bobtnání u vzorku CH_L (254.394 ± 54.379 %). Přidavek nanočástic a koloidního stříbra zvyšuje stupeň bobtnání. U většiny vzorků lze pozorovat zvýšení stupně bobtnání se zvyšující se koncentrací nanočástic/koloidního stříbra.

Tabulka 4: Obaly - obsah vody, rozpustnost, stupeň bobtnání

Vzorek	Obsah vody (%)	Rozpustnost (%)	Stupeň bobtnání (%)
CH _L	18.216 ± 0.800 ^a	47.700 ± 27.593 ^a	254.394 ± 54.379 ^a
CH _{LHR}	20.296 ± 1.002 ^{ab}	37.630 ± 3.363 ^{ab}	65.561 ± 13.010 ^{ab}
CH _{LZn0,05}	15.365 ± 1.123 ^{abc}	47.213 ± 0,47 ^{abc}	332.334 ± 8.853 ^{abc}
CH _{LZn0,2}	14.131 ± 0.776 ^{acd}	58.864 ± 0.589 ^{abd}	524.736 ± 21.448 ^{acd}
CH _{LZn0,5}	9.123 ± 0.136 ^{cde}	69.673 ± 40.228 ^{ae}	3893.941 ± 2294.168
CH _{LTi0,05}	18.767 ± 0.481 ^{abcf}	36.884 ± 2.123 ^{abcf}	291.715 ± 11.543 ^{abcde}
CH _{LTi0,2}	16.888 ± 0.605 ^{abcdfg}	36.991 ± 0.138 ^{abefg}	256.372 ± 7.306 ^{abcdef}
CH _{LTi0,5}	18.602 ± 1.065 ^{abcdfgh}	31.248 ± 0.855 ^{abfh}	312.391 ± 54.572 ^{abcdfgh}
CH _{LAg10}	18.084 ± 1.755 ^{abcdefghi}	43.184 ± 0.750 ^{abcfi}	260.792 ± 8.138 ^{abcdefgh}
CH _{LAg30}	20.074 ± 1.219 ^{abcdfghij}	38.237 ± 2.197 ^{abcfghij}	278.159 ± 35.280 ^{abcdefghi}
CH _{LAg50}	20.931 ± 1.448 ^{abcdfghijk}	38.075 ± 0.221 ^{abefgik}	273.701 ± 8.036 ^{abcdfghij}
CH _{LHRZn0,05}	21.979 ± 1.540 ^{abcdfghijkl}	39.513 ± 22.817 ^{abfgijkl}	53.819 ± 3.844 ^{abcefgghijk}
CH _{LHRZn0,2}	14.832 ± 1.214 ^{abcdfghijklm}	52.129 ± 0.333 ^{abejlm}	125.725 ± 29.463 ^{abcefgghijkl}
CH _{LHRZn0,5}	12.305 ± 1.038 ^{cdegim}	61.646 ± 1.849 ^{ademn}	126.124 ± 20.638 ^{abcefgghijklm}
CH _{LHRTi0,05}	22.322 ± 1.392 ^{abfghijkln}	38.172 ± 1.555 ^{abfghijkl}	53.918 ± 6.423 ^{abcefgghijklm}
CH _{LHRTi0,2}	19.002 ± 0.726 ^{abcfghijklmno}	39.621 ± 1.733 ^{abcfghijkl}	46.780 ± 16.023 ^{abcefgghijklm}
CH _{LHRTi0,5}	20.459 ± 0.857 ^{abcfghijklmnop}	36.180 ± 3.291 ^{abcfghijkl}	49.355 ± 9.500 ^{abcefgghijklm}
CH _{LHRAg10}	21.357 ± 0.911 ^{abfghijklmnop}	35.835 ± 4.867 ^{abcdfghijklm}	74.760 ± 53,400 ^{abcefgghijklm}
CH _{LHRAg30}	22.030 ± 1.708 ^{abcdfghijklmnop}	39.200 ± 0.534 ^{abfgjklpqrs}	62.402 ± 44.475 ^{abcefgghijklm}
CH _{LHRAg50}	25.463 ± 1.387 ^{bfijklmnop}	37.550 ± 1.364 ^{abfghijklpqrs}	118.871 ± 90.261 ^{abcefgghijklm}

*horní indexy znázorňují statisticky významné rozdíly (p<0,05) mezi řádky

Textura obalů

Výsledky textury obalů vyjádřené jako pevnost (MPa) a pružnost (%) jsou uvedené v Tabulce 5. V případě pevnosti byla nejvyšší hodnota zjištěna u obalu s přídavkem nanozinku (0,2%) $0,279 \pm 0,074$ MPa a u obalu s přídavkem 0,5 % nanozinku nebylo možné měření provést z důvodu nekompatibility obalu po vysušení. Když porovnááme skupinu vzorků s přídavkem nanozinku a zároveň i s přídavkem extraktu z červených hroznů, tak bylo zjištěno, že u vzorků, kde byl jen samotný chitosan se pevnost po přidání extraktu z červených hroznů zvýšila. Zatímco u nanozinku po přidání extraktu z červených hroznů docházelo ke snížení pevnosti.

Když byl do obalů přidáván nanotitan, tak po přidání extraktu z červených hroznů bylo pozorováno mírné zvýšení hodnot pevnosti. Naopak při porovnání obalu obsahujícího pouze chitosan a extrakt z červených hroznů byla hodnota pevnosti vyšší než, když se do této matrice přidal nanotitan.

U použití koloidního stříbra byla v případě obalů složených pouze z chitosanu a koloidního stříbra v různých koncentracích došlo oproti kontrole k mírnému zvýšení pevnosti, jakmile se ale k této základní matici přidal extrakt z červených hroznů, tak při zvyšující se koncentraci koloidního stříbra docházelo ke snižování pevnosti až na hodnotu $0,031 \pm 0,007$ MPa.

Tabulka 5: Pevnost a pružnost obalů

Vzorek	Pevnost (MPa)	Pružnost (%)
CH _L	0.047 ± 0.026^{afi}	$114.415 \pm 12.451^{aceg}$
CH _{LHR}	0.098 ± 0.034^{cfij}	104.616 ± 8.627^{cel}
CH _{LZn0.05}	0.121 ± 0.044^{ebc}	104.752 ± 10.927^{edl}
CH _{LZn0.2}	0.279 ± 0.074^{cbc}	88.750 ± 7.376^{he}
CH _{LZn0.5}	0.121 ± 0.044^{ied}	104.752 ± 10.927^b
CH _{LTi0.05}	0.048 ± 0.012^f	104.003 ± 4.885^{hei}
CH _{LTi0.2}	0.061 ± 0.016^{afi}	$111.157 \pm 5.106^{iadkg}$
CH _{LTi0.5}	0.079 ± 0.025^{afei}	$104.847 \pm 9.219^{acedi}$
CH _{LAg10}	0.057 ± 0.015^{afei}	133.422 ± 9.863^{iadg}
CH _{LAg30}	0.067 ± 0.022^{afei}	$121.894 \pm 9.306^{iadikg}$
CH _{LAg50}	0.053 ± 0.021^{afei}	$125.718 \pm 15.505^{acedig}$
CH _{LHRZn0.05}	0.066 ± 0.013^{geij}	105.972 ± 6.956^{acei}
CH _{LHRZn0.2}	0.259 ± 0.063^{db}	100.823 ± 4.374^{kce}
CH _{LHRZn0.5}	X	X
CH _{LHRTi0.05}	0.056 ± 0.019^{afe}	$115.256 \pm 10.757^{iadikg}$
CH _{LHRTi0.2}	0.084 ± 0.027^{afec}	$115.210 \pm 3.591^{idikcg}$
CH _{LHRTi0.5}	0.077 ± 0.034^{afe}	97.968 ± 8.064^{kace}
CH _{LHRAg10}	0.070 ± 0.022^{afe}	122.83 ± 5.798^{iadg}
CH _{LHRAg30}	0.049 ± 0.008^{jaf}	$129.198 \pm 14.637^{jadig}$
CH _{LHRAg50}	0.031 ± 0.007^{afh}	144.673 ± 13.947^g

*horní indexy znázorňují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi řádky

Obsah celkových polyfenolů v obalech

V Tabulce 6, která zobrazuje výsledky z měření celkových polyfenolů chitosanových obalů vyjádřené obsahem kyseliny gallové, je patrné nejvyšší množství této kyseliny u vzorku CH_{LHRZn0,05} a CH_{LHRZn0,2}. Lze očekávat vyšší nárůst kyseliny gallové u vzorků s přídavkem extraktu z hroznů, protože je známo, že hroznové výlisky jsou bohaté na polymerní fenolické sloučeniny (Martins et al, 2020). V rámci obalů CH_L a CH_{LHR} byla pozorována statistická významnost ($p < 0,05$). Z hlediska použitých nanočástic/koloidního stříbra bylo obecně sledováno nejvyšší množství polyfenolů u obalů obsahující nano TiO₂.

Tabulka 6: Obaly - polyfenoly

Vzorek	TPC (mg gallové kys./ml)
CH _L	0.957 ± 0.108^a

CH _{LHR}	1.329 ± 0.154 ^b
CH _{LZn0,05}	0.992 ± 0.021 ^{ac}
CH _{LZn0,2}	0.804 ± 0.038 ^{acd}
CH _{LZn0,5}	0.358 ± 0.038
CH _{LTi0,05}	1.348 ± 0.080 ^{be}
CH _{LTi0,2}	1.338 ± 0.269 ^{bef}
CH _{LTi0,5}	0.744 ± 0.008 ^{dg}
CH _{LAg10}	0.636 ± 0.045 ^{dgh}
CH _{LAg30}	1.016 ± 0.029 ^{aci}
CH _{LAg50}	0.756 ± 0.010 ^{dghj}
CH _{LHRZn0,05}	2.079 ± 0.224
CH _{LHRZn0,2}	1.802 ± 0.053
CH _{LHRZn0,5}	0.638 ± 0,033 ^{dghj}
CH _{LHRTi0,05}	1.116 ± 0.010 ^{acik}
CH _{LHRTi0,2}	1.337 ± 0,017 ^{befl}
CH _{LHRTi0,5}	1.472 ± 0,003 ^{befl}
CH _{LHRAg10}	0.873 ± 0.008 ^{acdgjim}
CH _{LHRAg30}	0.987 ± 0.009 ^{acdikmn}
CH _{LHRAg50}	0.852 ± 0.014 ^{acdgjimn}

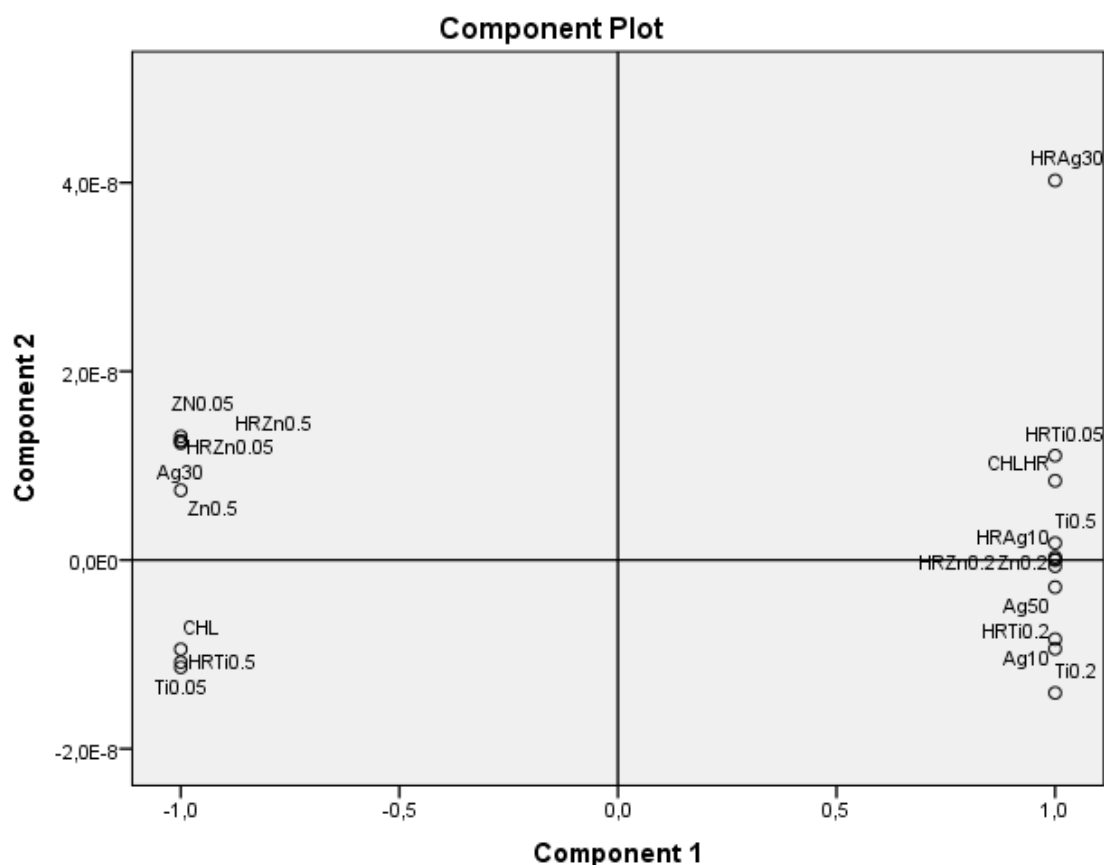
*horní indexy znázorňují statisticky významné rozdíly (p<0,05) mezi řádky

Stanovení polyfenolů pomocí HPLC

Výsledky obsahu epigalokatechinu ve vzorcích obalů jsou shrnuty v Tabulce 7 a statisticky vyhodnoceny v Garfu 1. U vzorků nebyla zjištěna jednoznačná závislost zvyšování nebo snižování obsahu epigalokatechinu, ale dle provedené PCA analýzy je z Grafu 1 patrné, že existuje staticky významný rozdíl mezi vzorky CH_L a CH_{LHR}, tedy pokud byl do obalu přidán extrakt z červených hroznů.

Tabulka 7: Obsah epigalokatechinu v obalech

Vzorek	Epigalokatechin (µg/g)
CH _L	187.73 ± 0.39
CH _{LHR}	120.34 ± 0.05
CH _{LZn0.05}	195.50 ± 2.71
CH _{LZn0.2}	184.85 ± 0.77
CH _{LZn0.5}	77.79 ± 0.80
CH _{LTi0.05}	253.56 ± 0.31
CH _{LTi0.2}	142.19 ± 1.44
CH _{LTi0.5}	157.45 ± 0.81
CH _{LAg10}	221.78 ± 1.17
CH _{LAg30}	256.18 ± 1.17
CH _{LAg50}	237.96 ± 0.67
CH _{LHRZn0.05}	168.76 ± 1.95
CH _{LHRZn0.2}	53.20 ± 0.10
CH _{LHRZn0.5}	41.79 ± 0.93
CH _{LHRTi0.05}	160.83 ± 0.64
CH _{LHRTi0.2}	176.09 ± 0.30
CH _{LHRTi0.5}	133.81 ± 0.14
CH _{LHRAg10}	207.42 ± 0.32
CH _{LHRAg30}	46.24 ± 0.14
CH _{LHRAg50}	323.77 ± 1.89



Graf 1: PCA analýza výsledků obsahu epigalokatechinu

Stanovení antioxidační aktivity obalů

Výsledky v Tabulce 8 zobrazují měření antioxidační kapacity chitosanových obalů metodou FRAP, která využívá schopnosti antioxidantů redukovat železo (III>II) (Jones et al, 2017). Zde je patrný rozdíl mezi vzorky CH_L a CH_{LHR}, kde přídavek extraktu z hroznových výlisků pozitivně ovlivňuje antioxidační aktivitu a také je zde potvrzena statistická významnost ($p < 0,05$). Tento trend je patrný i u vzorků s nanočásticemi/koloidním stříbrem. Ze vzorků obsahující hroznový extrakt je vysoká antioxidační aktivita zaznamenána převážně u vzorků s přídavkem koloidního stříbra, nicméně nejvyšší antioxidační hodnota byla naměřena u vzorku CH_{LHRTi0,5} ($8.339 \pm 0.235 \mu\text{mol Trolox/g}$).

Tabulka 8: Obaly- FRAP

Vzorek	FRAP ($\mu\text{mol Troloxu/g}$)
CH _L	1.849 ± 0.152^a
CH _{LHR}	2.259 ± 0.052^b
CH _{LZn0,05}	1.915 ± 0.079^{ac}
CH _{LZn0,2}	1.471 ± 0.144^{ad}
CH _{LZn0,5}	0.821 ± 0.280^e
CH _{LTi0,05}	1.413 ± 0.144^{def}
CH _{LTi0,2}	1.477 ± 0.159^{adfg}
CH _{LTi0,5}	1.223 ± 0.206^{defgh}
CH _{LAg10}	1.719 ± 0.029^{adfgi}
CH _{LAg30}	2.114 ± 0.202^{abcij}
CH _{LAg50}	2.348 ± 0.174^{bjk}
CH _{LHRZn0,05}	1.225 ± 0.046^{defghi}
CH _{LHRZn0,2}	$1.229 \pm 0.064^{defghlm}$
CH _{LHRZn0,5}	$1.604 \pm 0.014^{adfg hn}$
CH _{LHRTi0,05}	2.691 ± 0.235^{bjko}
CH _{LHRTi0,2}	3.374 ± 0.233^p

CH _{LHRTi0,5}	8.339 ± 0.235 ^{abcdefghijklmnopq}
CH _{LHRAg10}	3.927 ± 0.392 ^{pqr}
CH _{LHRAg30}	4.766 ± 0.087 ^{qr}
CH _{LHRAg50}	6.744 ± 0.198 ^q

*horní indexy znázorňují statisticky významné rozdíly (p<0,05) mezi řádky

V Tabulce 9 jsou zobrazeny výsledky měření antioxidační aktivity chitosanových obalů pomocí metody DPPH, která udává míru zachycení volných radikálů. Antioxidační aktivita vzorku CH_{LHR} je výrazně vyšší, než antioxidační aktivita vzorku CH_L (p<0,05). Téměř u všech vzorků s přidavkem hroznového extraktu byla zaznamenána vyšší antioxidační aktivita. Nejvyšší antioxidační aktivita byla pozorována u vzorku CH_{LHRAg50}. Přídavek koloidního stříbra do obalového materiálu výrazně zvýšil antioxidační aktivitu. Je známo, že koloidní stříbro vykazuje antioxidační vlastnosti (Das et al, 2019).

Tabulka 9: Obaly - DPPH

Vzorek	DPPH (%)
CH _L	17.358 ± 0.901 ^a
CH _{LHR}	27.922 ± 0.941 ^b
CH _{LZn0,05}	20.395 ± 1.812 ^{ac}
CH _{LZn0,2}	16.233 ± 1.292 ^{ad}
CH _{LZn0,5}	12.370 ± 0.298 ^e
CH _{LTi0,05}	22.052 ± 1.694 ^{cf}
CH _{LTi0,2}	20.678 ± 1.573 ^{acfg}
CH _{LTi0,5}	15.533 ± 1.769 ^{ade}
CH _{LAg10}	19.502 ± 3.434 ^{acdfgh}
CH _{LAg30}	21.711 ± 2.134 ^{cfghi}
CH _{LAg50}	32.202 ± 1.631 ^j
CH _{LHRZn0,05}	28.571 ± 0.174 ^{bjk}
CH _{LHRZn0,2}	29.925 ± 0.898 ^{bjkl}
CH _{LHRZn0,5}	22.429 ± 0.834 ^{cfghi}
CH _{LHRTi0,05}	38.559 ± 1.807
CH _{LHRTi0,2}	29.395 ± 4.211 ^{bjkl}
CH _{LHRTi0,5}	9.983 ± 0.536 ^e
CH _{LHRAg10}	46.636 ± 3.434
CH _{LHRAg30}	58.286 ± 1.890
CH _{LHRAg50}	72.278 ± 0.949

*horní indexy znázorňují statisticky významné rozdíly (p<0,05) mezi řádky

Výsledky v Tab 10. zobrazují naměřené hodnoty antioxidační aktivity pomocí ABTS, která je založena na schopnosti eliminace volných radikálů (Mareček et al, 2017). V souladu s výsledky z výše uvedených metod je antioxidační aktivita vzorku s hroznovým extraktem CH_{LHR} vyšší, než vzorek bez hroznového extraktu CH_L. Tento trend se projevuje i u vzorků s přidavkem nanočástic/koloidního stříbra. Nejvyšší antioxidační aktivita byla pozorována u vzorku CH_{LHRAg50} (3.004 ± 0.187). Tento vzorek je statisticky významný se vzorky CH_L a CH_{LHR} (p<0,05). Naopak nejnižší hodnoty antioxidační aktivity byly naměřeny u vzorků bez hroznového extraktu s přidavkem nano TiO₂. Z výsledků lze pozorovat antioxidační efekt přidaného hroznového extraktu. Fenolické látky svou aktivitou pohlcují volné radikály a tím dochází k blokování oxidačních řetězových reakcí (Nair et al, 2020).

Tabulka 10: Obaly - ABTS

Vzorek	ABTS (%)
CH _L	0.494 ± 0.064 ^a
CH _{LHR}	0.753 ± 0.043 ^{ab}
CH _{LZn0,05}	1.166 ± 0.043 ^c
CH _{LZn0,2}	0.875 ± 0.081 ^{bd}
CH _{LZn0,5}	0.810 ± 0.119 ^{bde}

CH _{LTi0,05}	0.279 ± 0.070 ^{af}
CH _{LTi0,2}	0.384 ± 0.061 ^{afg}
CH _{LTi0,5}	0.404 ± 0.062 ^{afg}
CH _{LAg10}	1.781 ± 0.155 ^h
CH _{LAg30}	2.145 ± 0.065 ⁱ
CH _{LAg50}	2.433 ± 0.101 ^j
CH _{LHRZn0,05}	0.823 ± 0.102 ^{bde}
CH _{LHRZn0,2}	1.133 ± 0.032 ^{cd}
CH _{LHRZn0,5}	1.436 ± 0.119 ^{ck}
CH _{LHRTi0,05}	1.587 ± 0.110 ^{hk}
CH _{LHRTi0,2}	2.164 ± 0.154 ^{ijl}
CH _{LHRTi0,5}	2.802 ± 0.262 ^m
CH _{LHRAg10}	2.327 ± 0.214 ^{ijl}
CH _{LHRAg30}	2.869 ± 0.213 ^{mn}
CH _{LHRAg50}	3.004 ± 0.187 ^{mn}

*horní indexy znázorňují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi řádky

V Tabulce 11 jsou zobrazeny výsledky z měření antioxidační aktivity chitosanových obalů pomocí metody CUPRAC. Z výsledků je patrný rozdíl mezi antioxidační kapacitou CH_L a CH_{LHR}. Přídavek hroznového extraktu zvýšil antioxidační kapacitu více než dvojnásobně. Vysoká antioxidační aktivita se projevuje i u vzorků s nanočásticemi/koloidním stříbrem a s přídavkem hroznového extraktu. Oproti ostatním vzorkům byly naměřeny vyšší antioxidační aktivity u vzorků s přídavkem koloidního stříbra. Nejvyšší hodnotu antioxidační aktivity vykazoval vzorek CH_{LHRAg30} (23.213 ± 0.192 μmol Trolox/g).

Tabulka 11: Obaly - CUPRAC

Vzorek	CUPRAC (μmol Trolox/g)
CH _L	9.189 ± 0.424 ^a
CH _{LHR}	24.526 ± 0.405
CH _{LZn0,05}	10.088 ± 0.358 ^b
CH _{LZn0,2}	6.514 ± 0.025
CH _{LZn0,5}	1.669 ± 0.071 ^c
CH _{LTi0,05}	11.298 ± 0.099
CH _{LTi0,2}	8.562 ± 0.330
CH _{LTi0,5}	4.596 ± 0.218
CH _{LAg10}	9.215 ± 0.282 ^{ad}
CH _{LAg30}	9.389 ± 0.306 ^{ade}
CH _{LAg50}	9.999 ± 0.301 ^{be}
CH _{LHRZn0,05}	17.272 ± 0.025 ^f
CH _{LHRZn0,2}	18.575 ± 0.226 ^g
CH _{LHRZn0,5}	1.869 ± 0.160 ^c
CH _{LHRTi0,05}	19.865 ± 0.210
CH _{LHRTi0,2}	18.631 ± 0.428 ^g
CH _{LHRTi0,5}	14.576 ± 0.092
CH _{LHRAg10}	17.560 ± 0.641 ^f
CH _{LHRAg30}	23.213 ± 0.192
CH _{LHRAg50}	21.060 ± 0.169

*horní indexy znázorňují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi řádky

V Tab. 14 a 15 jsou uvedeny výsledky měření antioxidačních aktivit hroznových výlisků a hroznového extraktu.

Tabulka 12: Hroznové výlisky a hroznový extrakt - polyfenoly, FRAP, CUPRAC

Vzorek	TPC (mg gallové kys./ml)	FRAP (μmol Troloxu/g)	CUPRAC (μmol Troloxu/g)
--------	-----------------------------	--------------------------	----------------------------

Hroznové výlisky	3.381 ± 0.118	6.531 ± 0.228	3.869 ± 0.413
Hroznový extrakt	0.150 ± 0.014	0.290 ± 0.028	0.469 ± 0.271

Tabulka 13: Hroznové výlisky a hroznový extrakt - ABTS, DPPH

Vzorek	ABTS (%)	DPPH (%)
Hroznové výlisky	5.850 ± 0.313	86.282 ± 0.425
Hroznový extrakt	0.300 ± 0.040	6.666 ± 0.197

Skladovací pokus s balenými jahodami

Ztráta vody

V průběhu skladovacího procesu (Tabulka 14) byl v jahodách pokrytých chitosanovým filmem sledován úbytek vody. Nejvyšší úbytek vody ve 3. dni skladování byl zaznamenán u vzorku CH_{LHRZn0,05}. V porovnání s kontrolou byl sledován nižší úbytek vody u vzorku CH_L a naopak vyšší úbytek vody u vzorku CH_{LHR}. Z hlediska 7. dne, nejvyšší úbytek vody vykazoval vzorek CH_{LZn0,5}. Trend úbytku vody u kontrolního vzorku a vzorků CH_L a CH_{LHR} byl podobný jako ve 3. den skladování. Dle výsledku je patrné, že u většiny vzorků aplikace chitosanového obalu způsobil nižší úbytek vody v průběhu skladování. Tento výsledek odpovídá výsledkům ze studie Vivek and Subbarao (2018), která sledovala úbytek vody v průběhu skladování chitosanem obalovaného kiwi.

Tabulka 14: Skladovací pokus jahody - ztráta vody v průběhu skladování

Vzorek	Den 3 Ztráta vody (%)	Den 7 Ztráta vody (%)
kontrola	0.261	0.448
CH _L	0.241	0.363
CH _{LHR}	0.275	0.454
CH _{LZn0,05}	0.287	0.465
CH _{LZn0,2}	0.197	0.380
CH _{LZn0,5}	0.246	0.678
CH _{LAg10}	0.269	0.470
CH _{LAg30}	0.198	0.324
CH _{LAg50}	0.223	0.361
CH _{LHRZn0,05}	0.353	0.450
CH _{LHRZn0,2}	0.190	0.356
CH _{LHRZn0,5}	0.229	0.386
CH _{LHRAg10}	0.277	0.502
CH _{LHRAg30}	0.223	0.402
CH _{LHRAg50}	0.249	0.433

Obsah polyfenolů balených jahod

Tabulka 15 zobrazuje výsledky obsahu kyseliny gallové ze skladovacího pokusu obalovaných jahod. V porovnání s výsledky v Tab 4., zde sledujeme úbytek kyseliny gallové mezi vzorky CH_L a CH_{LHR}. V 0. dni skladování byla zaznamenána nejvyšší hodnota obsahu polyfenolů u kontroly ve srovnání se vzorky CH_L a CH_{LHR} (p<0,05). Nicméně vlivem skladování obsah polyfenolů u kontrolního vzorku klesá rychleji, než je tomu u vzorků CH_L a CH_{LHR}, kde obsah polyfenolů je téměř stabilní. Tento výsledek potvrzuje, že použití chitosanového obalu může zachovat vyšší obsah fenolických látek v důsledku zpomalení oxidace (Kumarihami et al, 2022). U vzorků obsahující nanočástice/koloidní stříbro dochází ke snížení obsahu polyfenolů a to nejen v rámci doby skladování, ale i ve srovnání se vzorky CH_L a CH_{LHR}. Ze vzorků obsahující nanočástice/koloidní stříbro je pozorováno na konci skladovacího pokusu nejvyšší množství polyfenolů u vzorku CH_{LHRAg10} (1.547 ± 0.045 mg gallové kyseliny/ml), kde se projevuje statistická významnost (p<0,05) s kontrolním vzorkem.

Tabulka 15: Skladovací pokus jahody - polyfenoly

Vzorek	Den 0, TPC (mg gallové kys./ml)	Den 3, TPC (mg gallové kys./ml)	Den 7, TPC (mg gallové kys./ml)
kontrola	1.928 ± 0.031 ^a	1.725 ± 0.017 ^a	1.247 ± 0.046 ^a
CH _L	1.717 ± 0.011 ^b	2.298 ± 0.030 ^b	1.726 ± 0.090 ^b
CH _{LHR}	1.684 ± 0.055 ^{bc}	1.403 ± 0.020 ^c	1.678 ± 0.165 ^{bc}
CH _{LZn0,05}	2.108 ± 0.053 ^d	2.091 ± 0.015	1.181 ± 0.012 ^{ad}
CH _{LZn0,2}	1.419 ± 0.021	1.429 ± 0.015 ^{cd}	1.202 ± 0.027 ^{ade}
CH _{LZn0,5}	1.568 ± 0.062 ^e	1.572 ± 0.040 ^e	1.178 ± 0.016 ^{adef}
CH _{LAg10}	1.556 ± 0.068 ^{ef}	1.874 ± 0.020 ^f	1.067 ± 0.056 ^{defg}
CH _{LAg30}	1.553 ± 0.032 ^{efg}	1.455 ± 0.033 ^{cddeg}	0.983 ± 0.025 ^{gh}
CH _{LAg50}	1.691 ± 0.037 ^{bch}	2.402 ± 0.095 ^b	0.920 ± 0.031 ^{ghi}
CH _{LHRZn0,05}	1.625 ± 0.047 ^{bcefgghi}	1.599 ± 0.011 ^{eh}	0.790 ± 0.017 ^{ij}
CH _{LHRZn0,2}	1.854 ± 0.030 ^a	1.546 ± 0.023 ^{deghi}	0.840 ± 0.086 ^{hijk}
CH _{LHRZn0,5}	2.131 ± 0.051 ^{dj}	1.511 ± 0.019 ^{cddeghi}	0.999 ± 0.169 ^{ghil}
CH _{LHRAg10}	1.589 ± 0.043 ^{cefgi}	1.704 ± 0.068 ^{ahj}	1.547 ± 0.045 ^c
CH _{LHRAg30}	2.031 ± 0.048 ^{djk}	1.687 ± 0.064 ^{aejh}	0.929 ± 0.053 ^{ghijkl}
CH _{LHRAg50}	2.098 ± 0.096 ^{djk}	1.854 ± 0.177 ^f	1.190 ± 0.067 ^{adefg}

*horní indexy znázorňují statisticky významné rozdíly (p<0,05) mezi řádky

Z výsledků v Tabulce 16 je v porovnání s kontrolou patrná vyšší antioxidační aktivita u vzorků CH_L a CH_{LHR} 0. a 7. den. Ačkoliv 0. den mají téměř všechny vzorky oproti kontrole vyšší antioxidační aktivitu, v průběhu skladování jejich antioxidační aktivita klesá pod hodnotu antioxidační aktivity kontroly. Na konci skladovacího pokusu byla antioxidační aktivita vzorků s obsahem nanočástic/koloidního stříbra velmi podobná. Nejvyšší pokles antioxidační aktivity byl zaznamenán u vzorku CH_{LHRAg50} (9.222 ± 0.123 → 7.827 ± 0.279 → 2.932 ± 0.106), kde se projevuje statistická významnost vůči vzorku CH_{LHR} (p<0,05).

Tabulka 16: Skladovací pokus jahody - FRAP

Vzorek	Den 0 (μmol Troloxu/g)	Den 3 (μmol Troloxu/g)	Den 7 (μmol Troloxu/g)
kontrola	3.814 ± 0.182 ^a	4.709 ± 0.076 ^a	3.071 ± 0.068 ^a
CH _L	4.851 ± 0.045 ^b	6.929 ± 0.420 ^b	4.277 ± 0.075 ^b
CH _{LHR}	4.724 ± 0.279 ^{bc}	3.932 ± 0.122 ^c	3.962 ± 0.119 ^{bc}
CH _{LZn0,05}	6.560 ± 0.064 ^d	5.795 ± 0.147	2.554 ± 0.042 ^d
CH _{LZn0,2}	3.106 ± 0.090	3.057 ± 0.158	2.630 ± 0.145 ^{de}
CH _{LZn0,5}	3.943 ± 0.443 ^{ae}	4.195 ± 0.425 ^{acd}	2.487 ± 0.204 ^{def}
CH _{LAg10}	3.949 ± 0.054 ^{aef}	4.268 ± 0.475 ^{acde}	2.490 ± 0.199 ^{defg}
CH _{LAg30}	4.294 ± 0.087 ^{cefg}	3.941 ± 0.189 ^{cdef}	2.286 ± 0.058 ^{d fgh}
CH _{LAg50}	4.789 ± 0.294 ^{bch}	4.703 ± 0.277 ^{adeg}	2.285 ± 0.116 ^{d fghi}
CH _{LHRZn0,05}	4.751 ± 0.230 ^{bcghi}	4.824 ± 0.113 ^{aegh}	2.012 ± 0.063 ^{hij}
CH _{LHRZn0,2}	5.629 ± 0.090	4.196 ± 0.104 ^{acdefgi}	2.284 ± 0.070 ^{d fghijk}
CH _{LHRZn0,5}	6.861 ± 0.325 ^{dj}	4.397 ± 0.232 ^{acdefghi}	2.414 ± 0.090 ^{defghik}
CH _{LHRAg10}	4.932 ± 0.125 ^{bchi}	3.756 ± 0.272 ^{cdefi}	3.951 ± 0.506 ^{bc}
CH _{LHRAg30}	7.289 ± 0.355 ^j	6.857 ± 0.478 ^b	2.837 ± 0.034 ^{adel}
CH _{LHRAg50}	9.222 ± 0.123	7.827 ± 0.279	2.932 ± 0.106 ^{ael}

*horní indexy znázorňují statisticky významné rozdíly (p<0,05) mezi řádky

Chitosanové obalové systémy se vyznačují nízkou aktivitou vylučování volných radikálů (Rui et al, 2017), což se projevuje i ve výsledcích z Tabulky 17, kde je patrný pokles antioxidačních aktivit u vzorků CH_L a CH_{LHR} ve srovnání s kontrolou. Antioxidační aktivity obalů s nanočásticemi/koloidním stříbrem jsou velmi podobné, a to bez ohledu na přidavek hroznového extraktu. Nejvyšší antioxidační aktivita

v 7. den skladování byla naměřena u vzorku CH_{LHRAg10} (86.817 ± 0.209 %), kde se vyskytuje statistická významnost (p<0,05) oproti vzorkům CH_L a CH_{LHR}.

Tabulka 17: Skladovací pokus jahody - DPPH

Vzorek	Den 0 DPPH (%)	Den 3 DPPH (%)	Den 7 DPPH (%)
kontrola	79.692 ± 0.371	75.346 ± 22.115 ^a	75.746 ± 0.101
CH _L	89.398 ± 0.130 ^a	84.179 ± 0.433 ^{ab}	61.563 ± 0.177
CH _{LHR}	89.023 ± 0.296 ^{ab}	71.534 ± 0.360 ^{ac}	70.477 ± 0.370 ^a
CH _{LZn0,05}	87.713 ± 0.129 ^c	83.081 ± 0.299 ^{ad}	74.488 ± 0.229
CH _{LZn0,2}	76.806 ± 0.205	78.932 ± 2.487 ^{abde}	64.608 ± 0.413 ^b
CH _{LZn0,5}	86.200 ± 0.266	84.771 ± 0.748 ^{abf}	81.392 ± 0.312
CH _{LAg10}	82.821 ± 0.458 ^d	80.431 ± 0.214 ^{aeg}	71.317 ± 0.438 ^c
CH _{LAg30}	88.279 ± 0.348 ^{bce}	77.119 ± 0.207 ^{abdefh}	67.959 ± 0.135
CH _{LAg50}	88.958 ± 0.373 ^{abef}	80.808 ± 0.545 ^{aeg}	70.877 ± 0.301 ^{ac}
CH _{LHRZn0,05}	87.706 ± 0.541 ^{ce}	73.090 ± 0.396 ^{ai}	72.357 ± 0.573
CH _{LHRZn0,2}	90.644 ± 0.725	84.301 ± 0.329 ^{abefj}	63.506 ± 0.390
CH _{LHRZn0,5}	88.932 ± 0.353 ^{abef}	73.953 ± 1.742 ^{acei}	64.486 ± 0.233 ^b
CH _{LHRAg10}	84.271 ± 0.240 ^g	85.746 ± 0.606 ^{af}	86.817 ± 0.209
CH _{LHRAg30}	83.680 ± 0.270 ^{gh}	83.194 ± 0.421 ^{abdefhk}	56.873 ± 0.301
CH _{LHRAg50}	83.081 ± 0.429 ^{dh}	83.011 ± 1.002 ^{abdefhjk}	76.995 ± 0.101

*horní indexy znázorňují statisticky významné rozdíly (p<0,05) mezi řádky

Z výsledků skladovacího pokusu máčených jahod v chitosanové matrici v Tabulce 18. je zřejmý pokles antioxidační aktivity měřené metodou ABTS při aplikaci chitosanového obalu. V 7. den byla antioxidační aktivita kontroly vyšší, než vzorky CH_L a CH_{LHR}. Pokles antioxidační aktivity byl pozorován i po přidavku nanočástic/koloidního stříbra. Nicméně u vzorků s nanočásticemi/koloidním stříbrem obohacenými o hroznový extrakt se projevila vyšší antioxidační aktivita oproti vzorkům bez přidavku hroznového extraktu. Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval vzorek CH_{LHRAg10} (4.369 ± 0.140 %), u kterého docházelo naopak k nárůstu antioxidační aktivity v průběhu skladování. U tohoto vzorku byla zaznamenána statisticky významnost s kontrolou, CH_L a CH_{LHR} (p<0,05).

Tabulka 18: Skladovací pokus jahody - ABTS

Vzorek	Den 0 ABTS (%)	Den 3 ABTS (%)	Den 7 ABTS (%)
kontrola	3.942 ± 0.237 ^a	2.652 ± 0.140 ^a	3.138 ± 0.517 ^a
CH _L	1.562 ± 0.243 ^b	3.265 ± 0.216 ^b	1.796 ± 0.371 ^b
CH _{LHR}	1.928 ± 0.357 ^{bc}	1.515 ± 0.267 ^c	2.637 ± 0.114 ^{bc}
CH _{LZn0,05}	2.849 ± 0.510 ^d	2.334 ± 0.159 ^{ad}	2.055 ± 0.536 ^{bcd}
CH _{LZn0,2}	1.770 ± 0.232 ^{bce}	1.995 ± 0.244 ^{cde}	2.056 ± 0.140 ^{bcde}
CH _{LZn0,5}	1.334 ± 0.152 ^{bce}	2.408 ± 0.414 ^{abcdef}	2.579 ± 0.455 ^{acdef}
CH _{LAg10}	2.550 ± 0.186 ^{cdf}	3.685 ± 0.535 ^{abg}	2.339 ± 0.231 ^{bcdefg}
CH _{LAg30}	2.607 ± 0.300 ^{dfg}	5.147 ± 0.393	2.923 ± 0.211 ^{acfgh}
CH _{LAg50}	2.955 ± 0.340 ^{d fgh}	4.005 ± 0.295 ^{gh}	2.239 ± 0.131 ^{bcdefghi}
CH _{LHRZn0,05}	3.196 ± 0.477 ^{d fghi}	2.421 ± 0.257 ^{adefi}	2.528 ± 0.244 ^{acdefghij}
CH _{LHRZn0,2}	3.341 ± 0.470 ^{adhij}	2.966 ± 0.205 ^{abfgij}	2.801 ± 0.277 ^{acdefghijk}
CH _{LHRZn0,5}	5.095 ± 0.288	3.165 ± 0.314 ^{abfgjk}	3.677 ± 0.282 ^{al}
CH _{LHRAg10}	3.058 ± 0.243 ^{d fghij}	3.245 ± 0.261 ^{bfijkl}	4.369 ± 0.140 ^l
CH _{LHRAg30}	3.993 ± 0.364 ^{ajk}	2.503 ± 0.774 ^{abcdefghijklm}	2.757 ± 0.499 ^{acdefghijklm}
CH _{LHRAg50}	4.042 ± 0.183 ^{ak}	3.073 ± 0.416 ^{abdfgijklm}	3.234 ± 0.544 ^{afghijklm}

*horní indexy znázorňují statisticky významné rozdíly (p<0,05) mezi řádky

Z výsledků měření antioxidační aktivity jahod potažených chitosanovým obalem metodou CUPRAC (Tabulka 19) je patrný vzrůst antioxidační aktivity u řady vzorků. V porovnání s kontrolou, vzorkem CH_L a CH_{LHR} je antioxidační aktivita 7. den skladování u všech vzorků nižší. Nejvyšší antioxidační aktivita vzorků s nanočásticemi/koloidním stříbrem na konci skladovacího pokusu byla sledována u vzorku CH_{LHRAg10} (23.651 ± 0.858 μmol Trolox/g).

Tabulka 19: Skladovací pokus jahody - CUPRAC

Vzorek	Den 0 CUPRAC (μmol Troloxu/g)	Den 3 CUPRAC (μmol Troloxu/g)	Den 7 CUPRAC (μmol Troloxu/g)
kontrola	17.086 ± 0.142 ^a	17.932 ± 0.283 ^a	19.099 ± 0.645 ^a
CH _L	17.452 ± 0.840 ^{ab}	23.916 ± 0.330	20.154 ± 0.243 ^{ab}
CH _{LHR}	15.174 ± 1.205 ^c	15.473 ± 0.537 ^b	20.380 ± 0.659 ^b
CH _{LZn0,05}	23.241 ± 0.528 ^d	23.052 ± 0.074	15.606 ± 0.452 ^c
CH _{LZn0,2}	12.231 ± 0.135	15.936 ± 0.037 ^b	17.676 ± 0.139 ^d
CH _{LZn0,5}	16.881 ± 0.427 ^{abe}	18.179 ± 0.215 ^{ac}	16.710 ± 0.332 ^{cde}
CH _{LAg10}	14.250 ± 1.155 ^c	27.415 ± 0.318 ^d	17.005 ± 0.700 ^{def}
CH _{LAg30}	16.370 ± 0.769 ^{abcef}	15.124 ± 0.214 ^b	16.850 ± 0.330 ^{defg}
CH _{LAg50}	16.917 ± 0.415 ^{abefg}	21.353 ± 0.108	16.852 ± 0.721 ^{defgh}
CH _{LHRZn0,05}	18.170 ± 0.390 ^{abegh}	18.720 ± 0.499 ^c	15.060 ± 0.182 ^c
CH _{LHRZn0,2}	19.816 ± 1.193 ⁱ	16.736 ± 0.425 ^e	17.309 ± 1.271 ^{defghi}
CH _{LHRZn0,5}	21.926 ± 0.323 ^{dj}	17.203 ± 0.051 ^e	17.294 ± 0.222 ^{defghij}
CH _{LHRAg10}	16.199 ± 1.428 ^{abcefg}	24.785 ± 0.024	23.651 ± 0.858
CH _{LHRAg30}	19.138 ± 0.412 ^{hi}	25.456 ± 0.103	18.292 ± 0.462 ^{adijk}
CH _{LHRAg50}	21.694 ± 1.069 ^{dj}	27.515 ± 0.370 ^d	18.695 ± 0.563 ^{adk}

*horní indexy znázorňují statisticky významné rozdíly (p<0,05) mezi řádky

Textura jahody

Pevnost kůže (slupky) jahody je zhodnocena v Tabulce 20 a elasticita v Tabulce 21. V rámci dne 0 byla nejnižší hodnota v případě jahod balených v chitosanu s přídatkem hroznového extraktu (125,23 ± 20,96 g) a nejvyšší hodnoty u obalu z koloidního stříbra v koncentraci 50 ppm (168,68 ± 13,54 g) a s přídatkem nanozinku o koncentraci 0,05 % a extraktem z červených hroznů (168,16 ± 26,42 g). V případě dne 0 nebyly mezi jednotlivými vzorky zjištěny statisticky významné rozdíly (p > 0,05). U 3. dne už u některých vzorků docházelo k velkému zvyšování pevnosti slupky. U dne 0 a dne 7 nebyl v případě elasticity mezi jednotlivými vzorky zjištěn statisticky významný rozdíl (p > 0,05).

Tabulka 20: pevnost slupky jahod (g)

Vzorek	Den 0	Den 3	Den 7
Kontrola	135.87 ± 22.99	148.94 ± 38.89 ^a	404.92 ± 48.46 ^{ac}
CH _L	134.08 ± 40.49	241.25 ± 33.54 ^{abd}	357.00 ± 72.27
CH _{LHR}	125.23 ± 20.96	223.95 ± 55.64 ^{ab}	334.68 ± 53.09
Zn0.05	128.46 ± 36.83	494.46 ± 71.77 ^c	429.03 ± 83.83 ^c
Zn0.2	163.41 ± 14.42	256.52 ± 40.46 ^{abd}	313.86 ± 52.23
Zn0.5	139.01 ± 40.58	288.59 ± 47.30 ^{bd}	369.71 ± 38.98 ^{ac}
Ag10	150.03 ± 18.17	345.53 ± 52.88 ^{bde}	181.94 ± 61.90 ^b
Ag30	134.51 ± 28.02	426.99 ± 66.13 ^{ce}	336.25 ± 76.45
Ag50	168.68 ± 13.54	224.94 ± 33.35 ^{ab}	313.86 ± 66.94
Zn _{HR} 0.05	168.16 ± 26.42	235.77 ± 48.58 ^{ab}	229.47 ± 47.62 ^{ab}
Zn _{HR} 0.2	152.06 ± 37.49	309.98 ± 61.60 ^{be}	427.50 ± 201.45 ^c
Zn _{HR} 0.5	150.78 ± 31.86	474.94 ± 47.95 ^c	202.64 ± 116.18 ^{ab}
Ag _{HR} 10	155.81 ± 22.99	331.46 ± 50.41 ^{be}	242.24 ± 67.27 ^{abd}
Ag _{HR} 30	136.72 ± 23.38	356.98 ± 57.81 ^{de}	411.69 ± 69.36 ^{cd}
Ag _{HR} 50	151.18 ± 30.66	328.82 ± 46.53 ^{be}	307.14 ± 65.51

*horní indexy znázorňují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi řádky

Tabulka 21: Elasticita (mm)

vzorek	Den 0	Den 3	Den 7
Kontrola	2.41 ± 0.36	2.84 ± 0.54 ^a	3.77 ± 0.37
CH _L	2.30 ± 0.34	4.12 ± 0.67	3.86 ± 0.77
CH _{LHR}	2.87 ± 0.41	3.00 ± 0.38	4.12 ± 0.67
Zn0.05	2.72 ± 0.17	5.08 ± 0.03 ^b	4.67 ± 1.16
Zn0.2	2.92 ± 0.50	3.79 ± 0.38 ^a	4.17 ± 1.09
Zn0.5	2.48 ± 0.44	3.44 ± 0.69	4.37 ± 1.08
Ag10	2.47 ± 0.18	3.81 ± 0.60	3.71 ± 1.40
Ag30	2.73 ± 0.26	4.19 ± 0.57	3.99 ± 1.24
Ag50	2.55 ± 0.23	3.47 ± 0.28 ^a	3.94 ± 0.53
Zn _{HR} 0.05	2.32 ± 0.19	3.04 ± 0.39 ^a	3.24 ± 0.28
Zn _{HR} 0.2	2.26 ± 0.46	3.01 ± 0.44 ^a	4.43 ± 1.11
Zn _{HR} 0.5	2.48 ± 0.76	4.28 ± 0.46	2.74 ± 1.61
Ag _{HR} 10	2.99 ± 0.33	4.59 ± 0.78	2.81 ± 0.40
Ag _{HR} 30	2.47 ± 0.48	3.51 ± 0.55 ^a	4.32 ± 0.61
Ag _{HR} 50	2.82 ± 0.36	4.53 ± 0.73	3.59 ± 0.44

*horní indexy znázorňují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi řádky

3D tisk

Obsah polyfenolů u 3D tisku čokoládových vzorků

V Tabulce 22 jsou zobrazeny výsledky měření antioxidační aktivity čokoládových tištěných objektů vyjádřených obsahem kyseliny gallové. Čokoláda je produktem bohatým na polyfenoly, zejména na flavan-3-oly (Paz-Yépez et al, 2019). I když s rostoucí koncentrací nano ZnO a koloidního stříbra klesá obsah kyseliny gallové, v porovnání s kontrolou, přídavek nanomateriálu a koloidního stříbra ve většině vzorků pozitivně ovlivnil antioxidační aktivitu. Nejvyšší antioxidační aktivita byla naměřena u vzorku čokolády obsahující 0,05 % nano ZnO (8.284 ± 1.138 mg gallové kyseliny/ml).

Tabulka 22: 3D tisk čokolády - polyfenoly

Vzorek	TPC (mg gallové kys./ml)
kontrola	7.587 ± 0.160 ^a
Choco _{Zn0,05}	8.284 ± 1.138 ^{ab}
Choco _{Zn0,2}	7.004 ± 0.118 ^{ac}
Choco _{Zn0,5}	6.965 ± 0.219 ^{acd}
Choco _{Ag10}	8.240 ± 0.042 ^{abe}
Choco _{Ag30}	8.078 ± 0.398 ^{abef}
Choco _{Ag50}	7.455 ± 0.113 ^{abcdef}

*horní indexy znázorňují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi řádky

V Tabulce 23 jsou zobrazeny výsledky z měření antioxidační aktivity čokoládových objektů metodou FRAP a CUPRAC. Výsledky antioxidačních aktivit měřených metodou FRAP se pohybovaly v nižších hodnotách, než je tomu u výsledků antioxidačních aktivit měřených metodou CUPRAC. U metody FRAP vzorek Choco_{Ag50} a vzorky obsahující nano ZnO vykazovaly nižší hodnoty antioxidační aktivity v porovnání s kontrolou. Naopak vzorky s přídavkem koloidního stříbra Choco_{Ag10} a Choco_{Ag30} se projevily vyšší antioxidační aktivitou.

Z hlediska metody CUPRAC kontrola vykazovala nejvyšší antioxidační aktivitu. Přídavek nanomateriálů a koloidního stříbra způsobil pokles antioxidační aktivity u všech vzorků. Nejnižší hodnoty byly zaznamenány u vzorku Choco_{Zn0,2} ($79,118 \pm 1,135$ μmol Troloxu/g). V případě přídavku koloidního stříbra byla pozorována nejnižší aktivita u vzorku Choco_{Ag50} ($89,524 \pm 0,936$ μmol Troloxu/g).

Tabulka 23: 3D tisk čokolády – FRAP, CUPRAC

Vzorek	FRAP ($\mu\text{mol Troloxu/g}$)	CUPRAC ($\mu\text{mol Troloxu/g}$)
kontrola	32.203 \pm 1.833 ^a	114,268 \pm 7,009
Choco _{Zn0,05}	27.399 \pm 0.517 ^{ab}	99,832 \pm 0,088 ^a
Choco _{Zn0,2}	28.870 \pm 0.634 ^{abc}	79,118 \pm 1,135
Choco _{Zn0,5}	27.829 \pm 2.651 ^{abcd}	84,218 \pm 0,328
Choco _{Ag10}	36.826 \pm 5.570 ^{ae}	99,832 \pm 0,088 ^a
Choco _{Ag30}	41.213 \pm 5.576 ^e	107,349 \pm 0,890
Choco _{Ag50}	30.694 \pm 1.311 ^{abcd}	89,524 \pm 0,936

*horní indexy znázorňují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi řádky

V Tabulce 24 jsou zobrazeny výsledky antioxidační aktivity tištěných čokoládových objektů měřených metodou DPPH a ABTS. Metoda DPPH vykazovala několikanásobně vyšší antioxidační aktivity čokoládových objektů, než je tomu u metody ABTS. Nejvyšší antioxidační aktivita byla pozorována u vzorku Choco_{Ag50} (82.045 \pm 1.117 %), který byl statisticky významný vůči kontrole ($p < 0,05$). Antioxidační aktivity ostatních vzorků tištěné čokolády byly velmi podobné antioxidační aktivitě kontrolního vzorku. U metody ABTS byla pozorována vyšší antioxidační aktivita oproti kontrole u vzorku Choco_{Zn0,5} a u vzorků s obsahem koloidního stříbra, přičemž nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval vzorek Choco_{Ag30} (13.085 \pm 1.241 %).

Tabulka 24: 3D tisk čokolády - DPPH, ABTS

Vzorek	DPPH (%)	ABTS (%)
kontrola	72.183 \pm 2.956 ^a	12.686 \pm 1.014 ^a
Choco _{Zn0,05}	71.703 \pm 8.354 ^{ab}	12.073 \pm 0.362 ^{ab}
Choco _{Zn0,2}	69.458 \pm 1.675 ^{abc}	11.736 \pm 0.194 ^{abc}
Choco _{Zn0,5}	72.474 \pm 7.341 ^{abcd}	12.764 \pm 0.622 ^{abcd}
Choco _{Ag10}	64.305 \pm 4.337 ^{abcde}	13.081 \pm 0.592 ^{abde}
Choco _{Ag30}	71.202 \pm 4.584 ^{abcde}	13.085 \pm 1.241 ^{abdef}
Choco _{Ag50}	82.045 \pm 1.117 ^{bd}	12.919 \pm 0.490 ^{abcdef}

*horní indexy znázorňují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi řádky

V Tabulce 25 jsou uvedeny výsledky tvrdosti z texturálního měření. Z výsledků vyplývá, že přídavek nano ZnO a koloidního stříbra několikanásobně zvýšil tvrdost čokoládového objektu. Výjimku tvoří vzorek obsahující 0,05 % nano ZnO. Vzorky obsahující koloidní stříbro vykazují mnohonásobně vyšší tvrdost, než vzorky obsahující nano ZnO. Nejvyšší hodnota tvrdosti byla zaznamenána u vzorku Choco_{Ag10} (2389.833 \pm 1460.037 g).

Tabulka 25: 3D tisk čokolády: textura - tvrdost (g)

Vzorek	Tvrdost (g)
kontrola	24.240 \pm 18.542 ^a
Choco _{Zn0,05}	0.567 \pm 0.438 ^{ab}
Choco _{Zn0,2}	443.203 \pm 154.356 ^{abc}
Choco _{Zn0,5}	643.297 \pm 399.064 ^{abcd}
Choco _{Ag10}	2389.833 \pm 1460.037 ^{abcde}
Choco _{Ag30}	960.800 \pm 445.209 ^{abcdef}
Choco _{Ag50}	1726.150 \pm 259.491 ^{def}

*horní indexy znázorňují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi řádky

Reference

- Behbahani, B. A., Shahidi, F., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., & Mohebbi, M. (2017). Use of *Plantago major* seed mucilage as a novel edible coating incorporated with *Anethum graveolens* essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. *International journal of biological macromolecules*, *94*, 515-526.
- Das, G., Patra, J. K., Debnath, T., Ansari, A., & Shin, H. S. (2019). Investigation of antioxidant, antibacterial, antidiabetic, and cytotoxicity potential of silver nanoparticles synthesized using the outer peel extract of *Ananas comosus* (L.). *PLoS one*, *14*(8), e0220950.
- Indumathi, M. P., & Rajarajeswari, G. R. (2019). Mahua oil-based polyurethane/chitosan/nano ZnO composite films for biodegradable food packaging applications. *International journal of biological macromolecules*, *124*, 163-174.
- Jones, A., Pravadali-Cekic, S., Dennis, G. R., Bashir, R., Mahon, P. J., & Shalliker, R. A. (2017). Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) of antioxidants using reaction flow chromatography. *Analytica chimica acta*, *967*, 93-101.
- Kumarihami, H. P. C., Kim, Y. H., Kwack, Y. B., Kim, J., & Kim, J. G. (2022). Application of chitosan as edible coating to enhance storability and fruit quality of Kiwifruit: A Review. *Scientia Horticulturae*, *292*, 110647.
- Mareček, V., Mikyška, A., Hampel, D., Čejka, P., Neuwirthová, J., Malachová, A., & Cerkal, R. (2017). ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of cereal science*, *73*, 40-45.
- Martins, I. M., Macedo, G. A., & Macedo, J. A. (2020). Biotransformed grape pomace as a potential source of anti-inflammatory polyphenolics: Effects in Caco-2 cells. *Food Bioscience*, *35*, 100607.
- Nair, M. S., Tomar, M., Punia, S., Kukulka-Koch, W., & Kumar, M. (2020). Enhancing the functionality of chitosan-and alginate-based active edible coatings/films for the preservation of fruits and vegetables: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Paz-Yépez, C., Peinado, I., Heredia, A., & Andrés, A. (2019). Lipids digestibility and polyphenols release under in vitro digestion of dark, milk and white chocolate. *Journal of functional foods*, *52*, 196-203.
- Rui, L., Xie, M., Hu, B., Zhou, L., Yin, D., & Zeng, X. (2017). A comparative study on chitosan/gelatin composite films with conjugated or incorporated gallic acid. *Carbohydrate polymers*, *173*, 473-481.
- Sivaroban, T., Hettiarachchy, N. S., & Johnson, M. G. (2008). Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*, *41*(8), 781-785.
- Souza, V. G. L., Fernando, A. L., Pires, J. R. A., Rodrigues, P. F., Lopes, A. A., & Fernandes, F. M. B. (2017). Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants. *Industrial Crops and Products*, *107*, 565-572.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, *19*(6-7), 669-675.
- Tomadoni, B., Cassani, L., Ponce, A., Moreira, M. D. R., & Agüero, M. V. (2016). Optimization of ultrasound, vanillin and pomegranate extract treatment for shelf-stable unpasteurized strawberry juice. *LWT-Food Science and Technology*, *72*, 475-484.
- Vivek, K., & Subbarao, K. V. (2018). Effect of edible chitosan coating on combined ultrasound and NaOCl treated kiwi fruits during refrigerated storage. *International Food Research Journal*, *25*(1), 101-108.

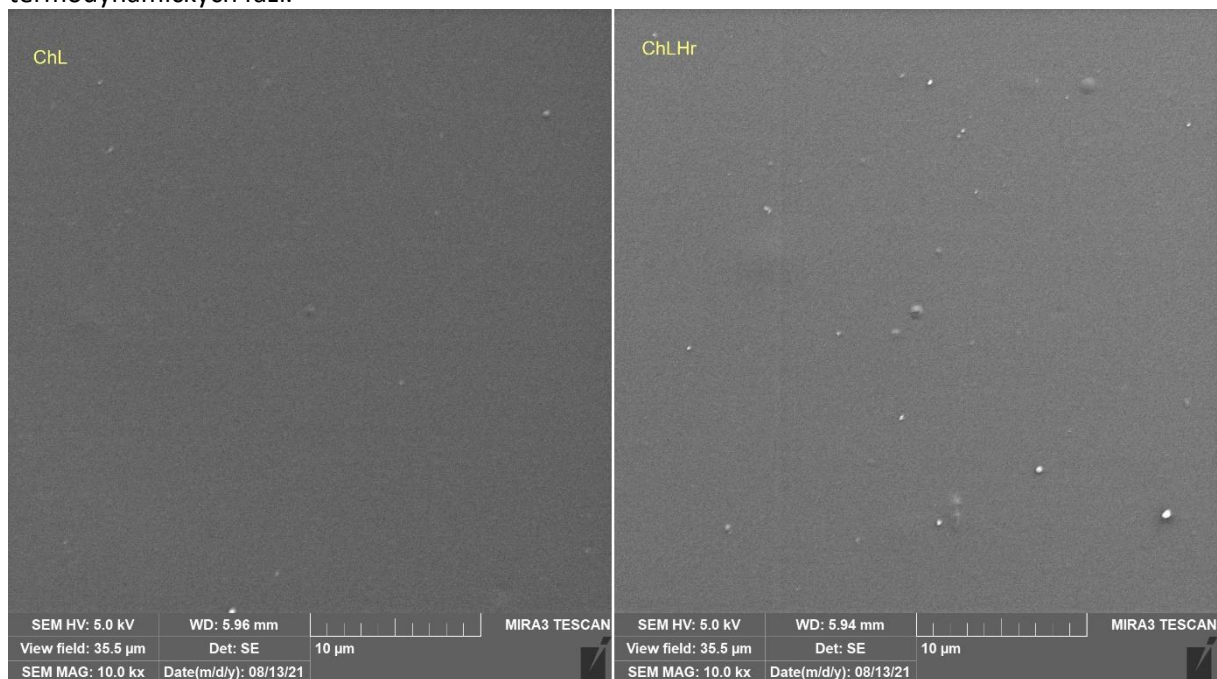
Hodnocení povrchu jedlých obalů

U jedlých obalů byl hodnocen povrch a lom. Hodnocení povrchu jedlého obalu bylo po vyformování gelu na vodivém terčíku tak aby byly minimalizovány změny povrchu způsobené ohybem nebo lomem při manipulaci.

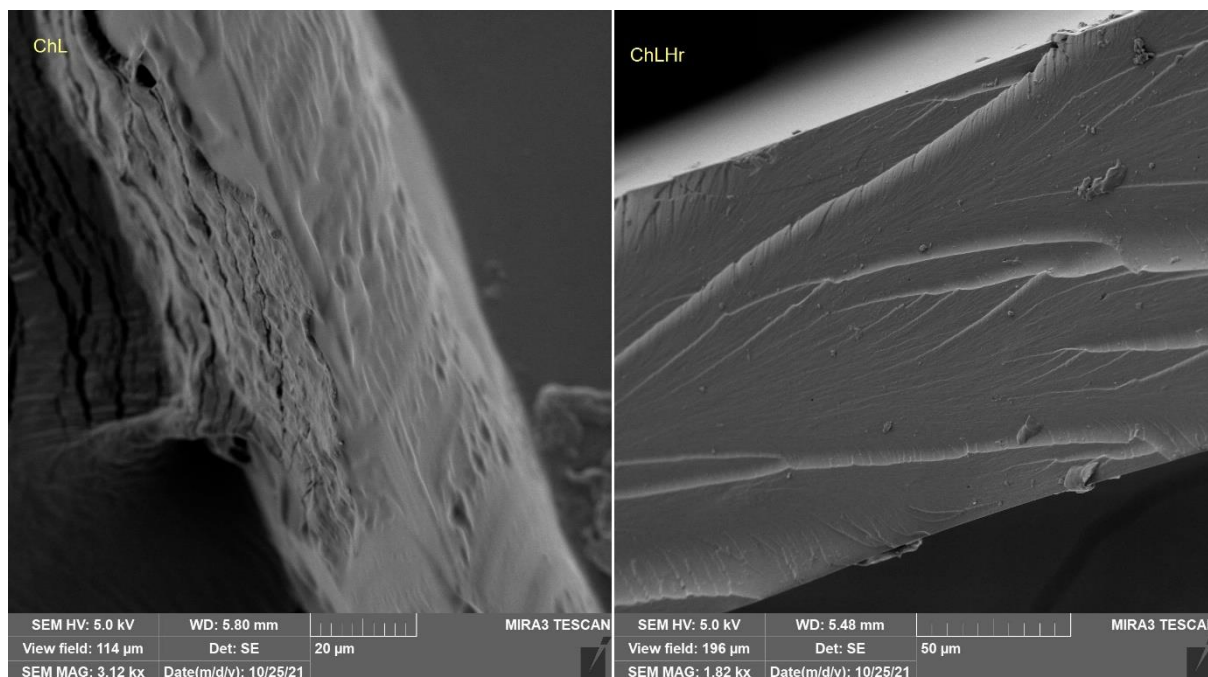
Pro analýzu lomu byl jedlý film zmrazen tekutým dusíkem a následně mechanicky zlomen. Fragmenty byly naneseny na uhlíkovou oboustranně lepivou pásku. Vzorky pozlaceny na zařízení Q150R ES (Quorum Technologies, United Kingdom) pro pokovování vzorků. Vzorky byly pozlaceny 10 nm a následně vyšetřeny mikroskopem MIRA3 TESCAN, při napětí 5.0 kV. Zvětšení 1kx, 8kx, 80 kx. Vzorky byly vyšetřovány v triplikátech. Snímky povrchu byly snímány 2 kx.

Výsledky a diskuse

Srovnání kontroly Ch_L (46/21) a kontroly s přidavkem hroznové šťávy Ch_{LHR} (47/21) vykazuje minimální rozdíly. U Ch_{LHR} je patrný malý výskyt nerozpustných částic hroznových extraktů potvrzených jak na ploše tak v lomu (Obr. 1A a 1B). Distribuce nerozpustného podílu je náhodná, a nedochází k oddělení termodynamických fází.

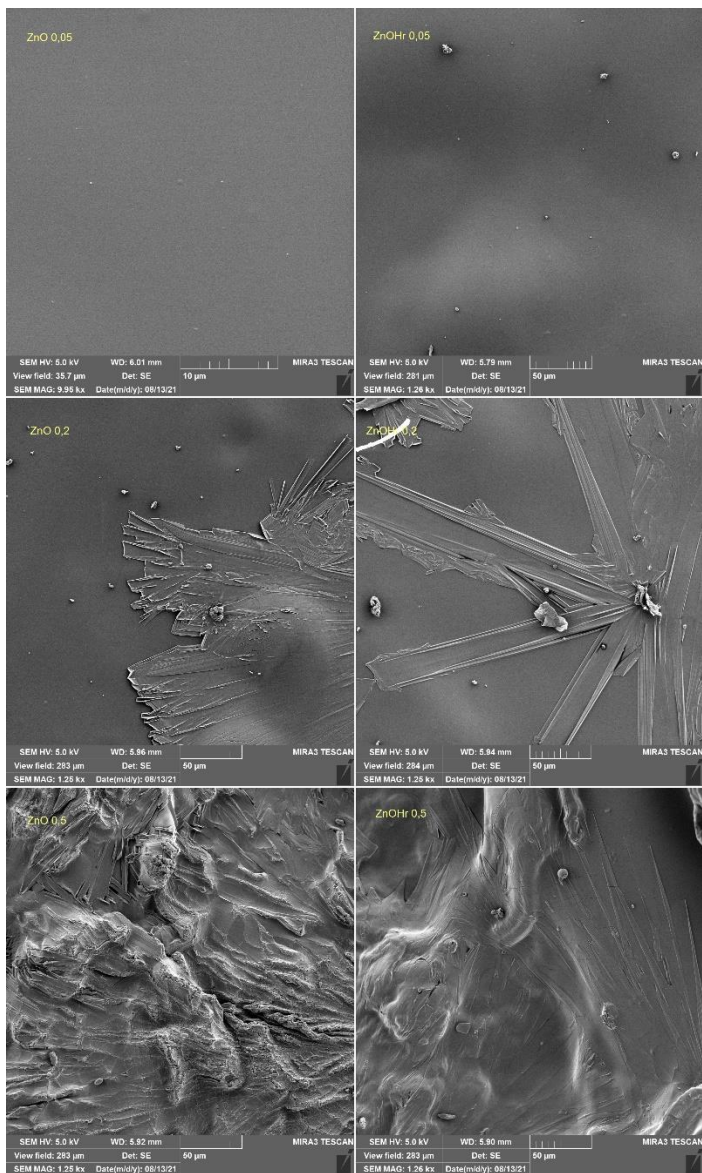


Obr. 1A Mikrostruktura na povrchu jedlého obalu vlevo (45/21) Ch_I , v pravo (46/21) Ch_{IHR}

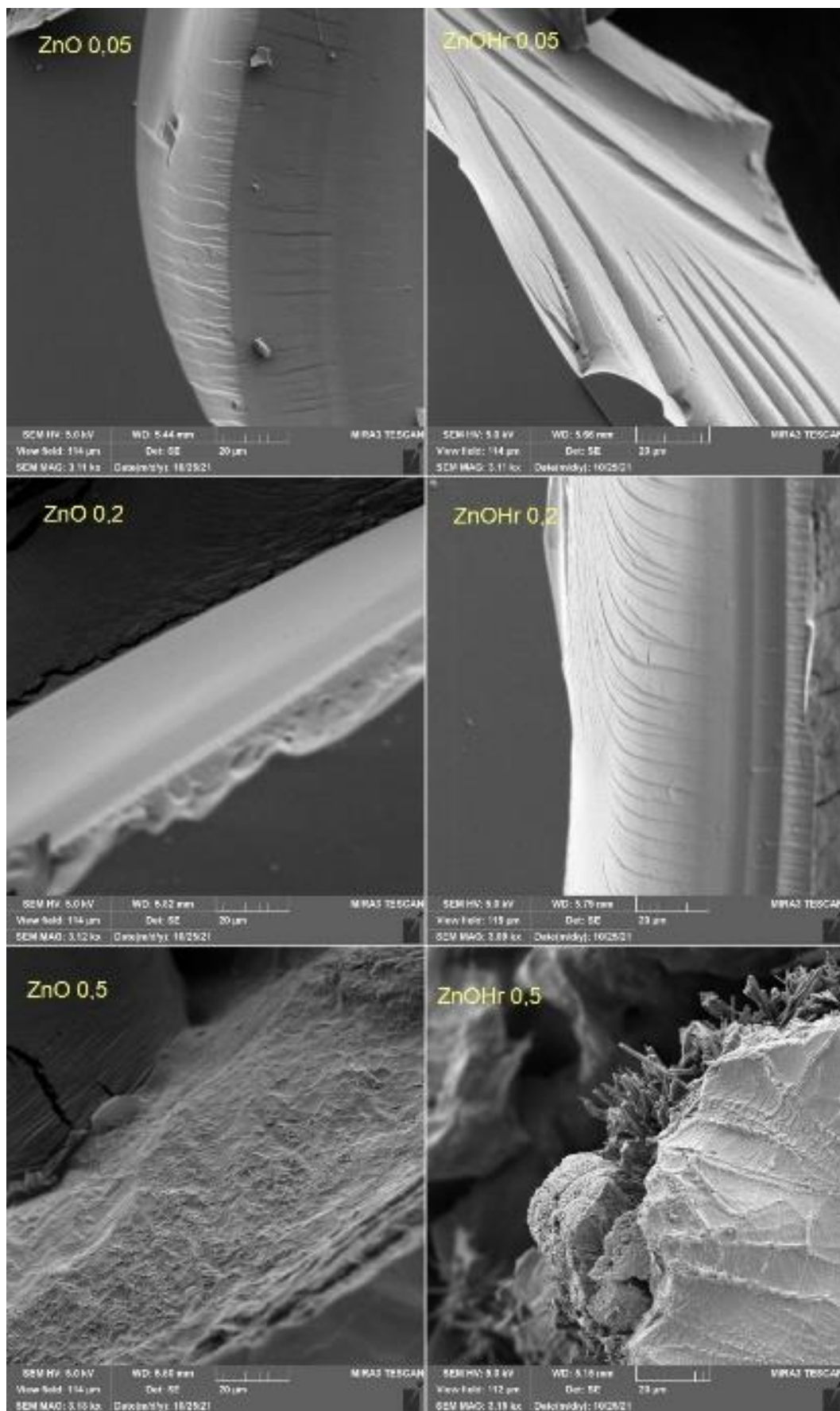


Obr. 1B Mikrostruktura na lomu jedlého obalu vlevo (45/21) Ch_L, vpravo (46/21) Ch_{LHr}

Přídavek ZnO do jedlého obalu se projevuje vznikem zdrsnění obalu ve srovnání s kontrolou (Obr. 2A a Obr. 2B). ZnO mají z pohledu mikrostruktury pravidelnou kruhovou strukturu (La et al. 2020) která se projevuje také na struktuře formovaného jedlého obalu. Toto zjištění je v souladu s dalšími studiemi kdy ZnO rovněž formuje nepravidelnou strukturu viditelnou v SEM a to od přídavku 0,1-1% (La et al. 2020). Přičemž při větším zvětšení je patrná kruhovitá struktura ZnO promenující na povrch. V některých případech ale může dojít k formování jiných struktur, například může docházet ke krystalickým výkvětům (Li et al. 2019) Naše studie potvrdila krystalické výkvěty zejména na povrchu obalů. Formování krystalů je doprovázeno fázovou segregací, která je způsobena termodynamickou neslučitelností běžně popisovanou u biofilmu (Gohargani et al. 2020). U vzorků ZnO a ZnO_{Hr} v koncentracích 0,2-0,5 % byly dále pozorovány štěrbinny porušující povrch jedlého obalu. Původ štěrbin je způsoben rozdílnými termodynamickými vlastnostmi obou materiálů. V lomu byly pozorovány krystaly a fázové segregace u vzorků ZnO_{Hr} 0,05 a 0,2 %. Vzorek ZnO_{Hr} 0,5 % byl charakterizován velkými nerovnoměrnými krystaly spolu s odlupujícími se částmi v důsledku fázové segregace. Distribuce částic byla nerovnoměrná na povrchu stejně tak i v lomu obalu, což je ve shodě s (La et al. 2020; Le et al. 2021).

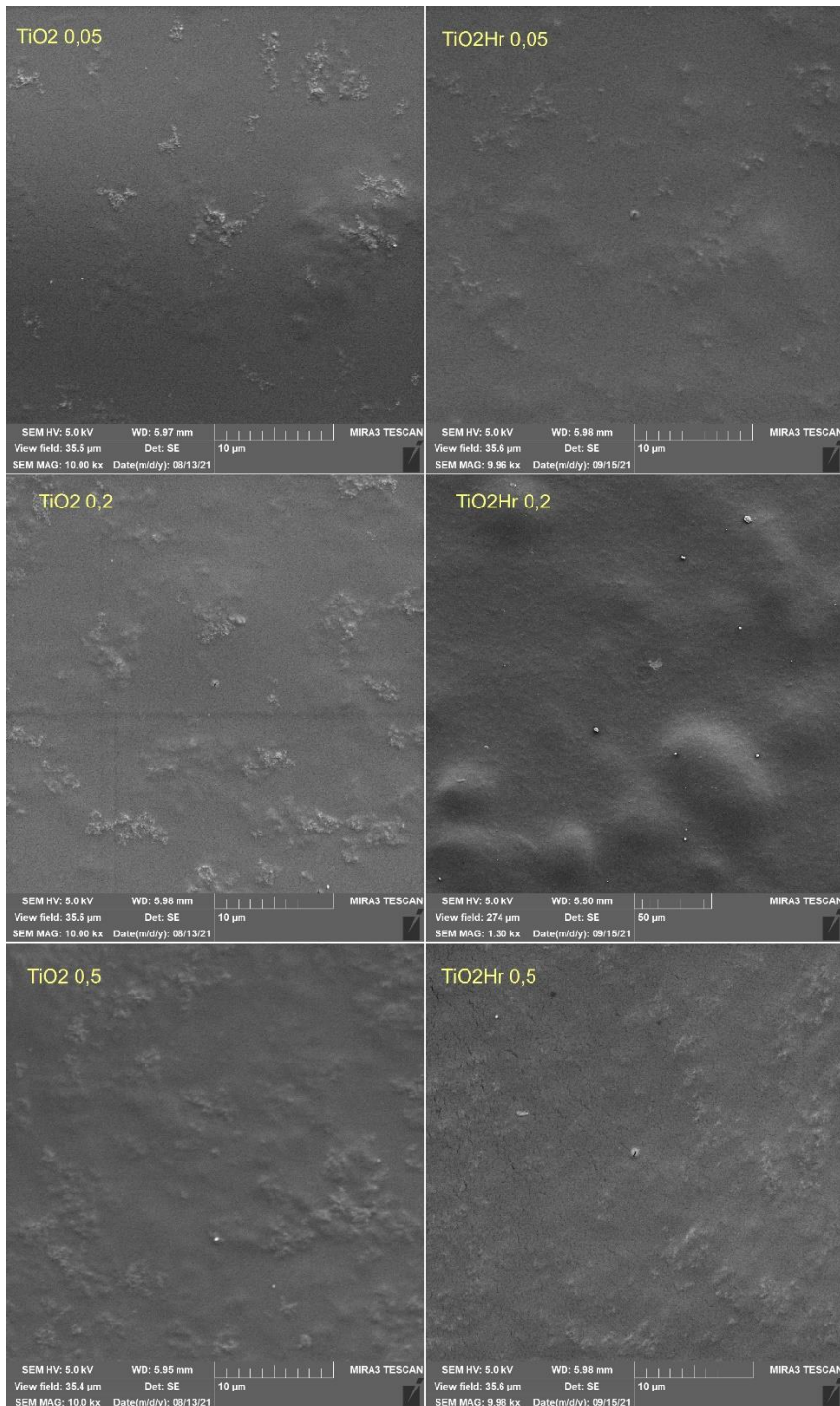


Obr. 2A Mikrostruktura na ploše jedlého obalu vlevo (47/21-49/21) ZnO, vpravo (50/21-52/21) ZnO_{Hr}

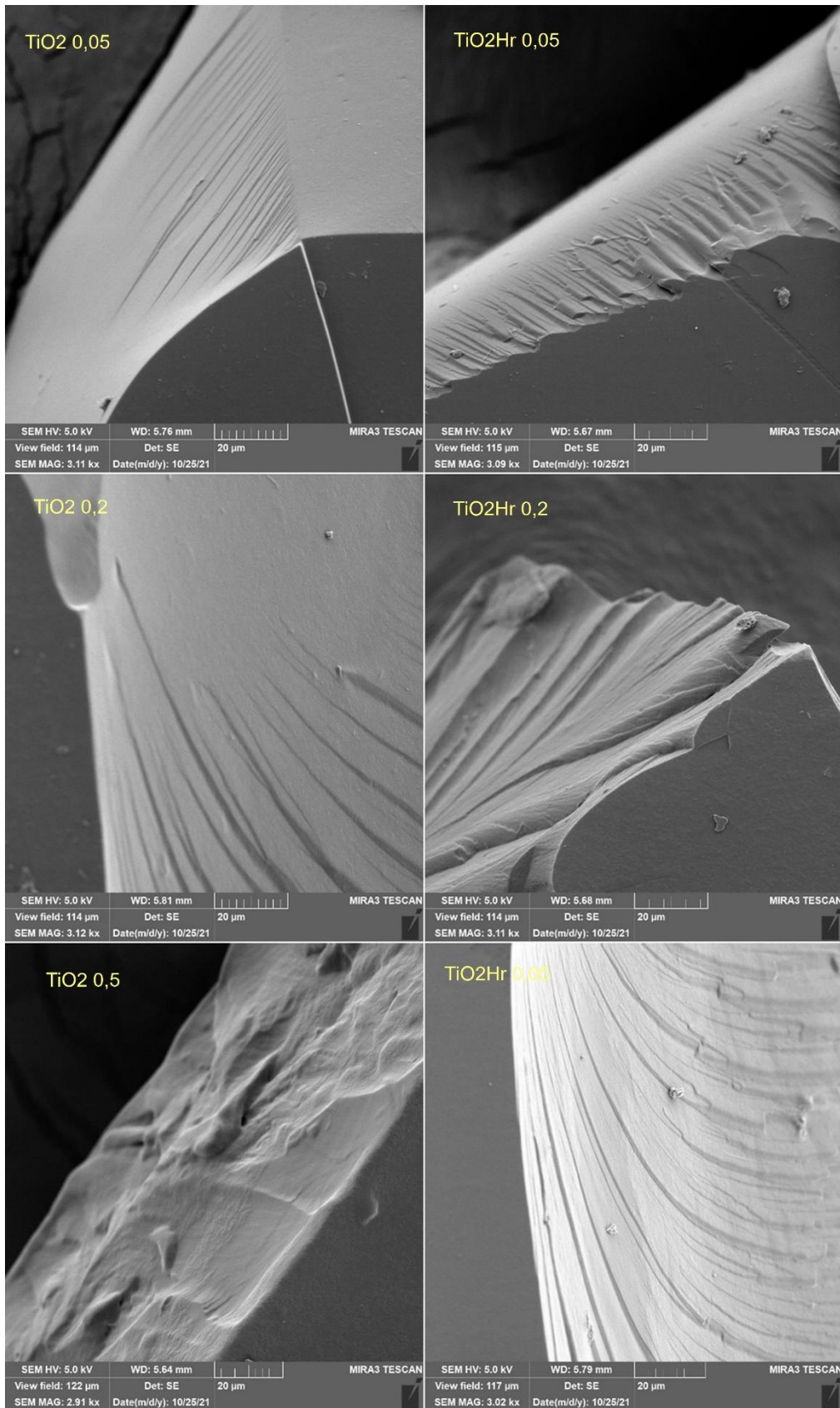


Obr. 2A Mikrostruktura na lomu jedlého obalu vlevo (47/21-49/21) ZnO, vpravo (50/21-52/21) ZnO_{Hr}

Přídavek TiO₂ byl na mikrosnímčích rovněž pozorován (Obr. 3A a Obr. 3B-Lom). Podle některých autorů TiO₂ formuje polygonální a oválné krystaly s průměrnou velikostí 1,84- 40um (Bakhy et al. 2018). V naší studii byly potvrzen tvar oválný. Formování krystalů bylo potvrzeno na povrchu ale také v lomu obalu. Tento výsledek je částečně ve shodě s (Feng et al. 2019), kdepotvrdili vznik krystalů pouze v lomu, přičemž na povrchu nebyli pozorováni. Rozdíl může být dán rozdílnou koncentrací, kdy v této studii byla použita jednotná koncentrace 1 % TiO₂ a v naší studii byly koncentrace nižší 0,05-0,5 %. Další autoři ale potvrzují naše výsledky, kdy k formování krystalů dochází v celém rozsahu biodegradovatelných filmů (Li et al. 2011).

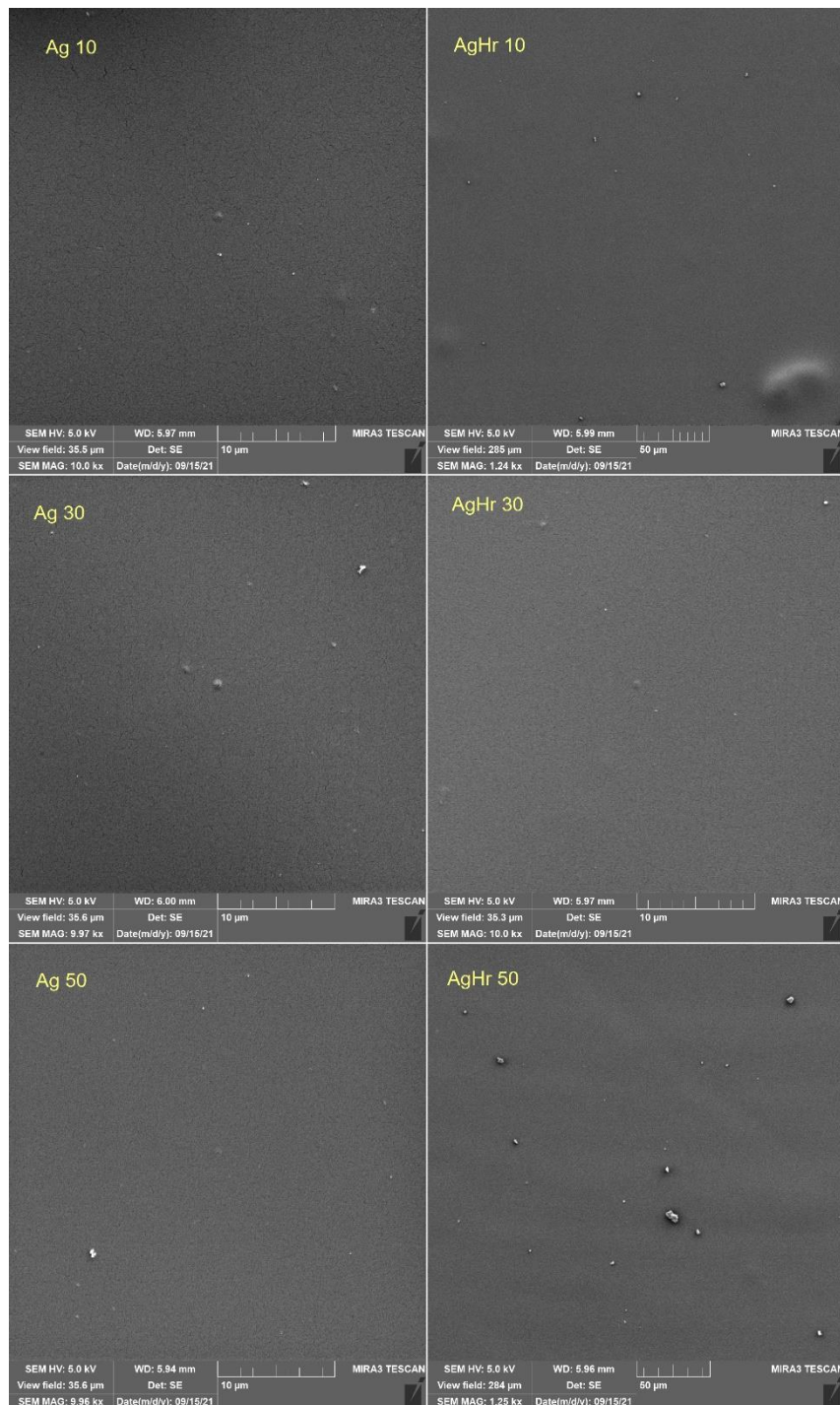


Obr. 3A Mikrostruktura na ploše jedlého obalu vlevo (53/21-55/21) TiO₂, vpravo (56/21-58/21) TiO₂Hr

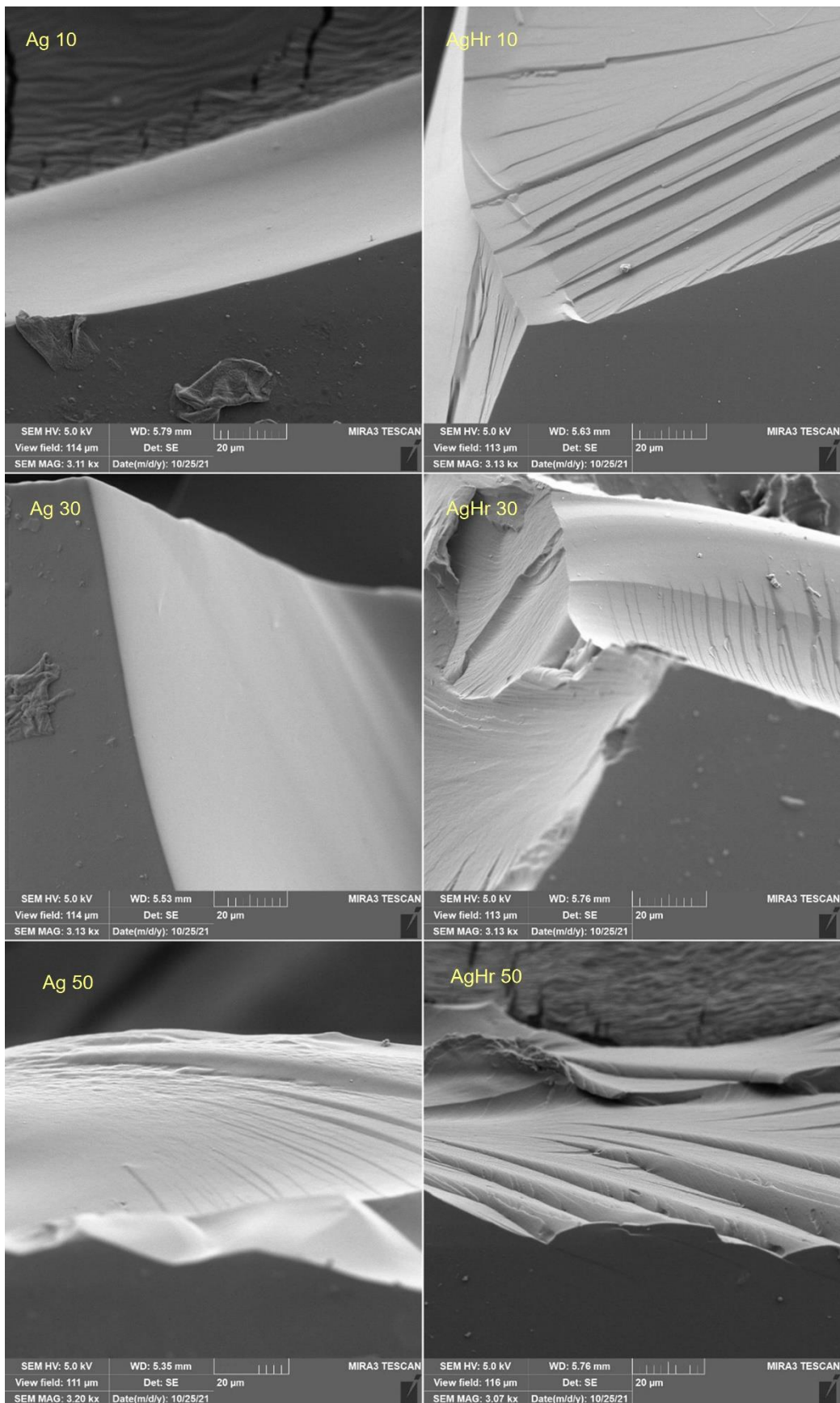


Obr. 3B Mikrostruktura na lomu jedlého obalu vlevo (53/21-55/21) TiO₂, vpravo (56/21-58/21) TiO₂Hr

Koloidní stříbro vytváří podobně jako další nanočástice struktury, které způsobují zdrsňení povrchu nebo jsou viditelné na lomu. Distribuce stříbra je přitom nerovnoměrná a silně adherována s chitosanovým gelem (Kumar et al. 2018). Další autoři popisují tvarovou charakteristiku nanostříbra jinak, kdy dokonce uvádí velikost stříbra 80-110 nm tedy nad zaužívaný termín nanočástic (do 100nm). V našem případě nebyla přítomnost koloidního stříbra potvrzena (Obr. 4A a Obr. 4B).



Obr. 4A Mikrostruktura na ploše jedlého obalu vlevo (59/21-61/21) Ag, vpravo (62/21-64/21)Ag



Obr. 4B Mikrostruktura na lomu jedlého obalu vlevo (59/21-61/21) Ag, vpravo (62/21-64/21) Ag
Rozdíly mezi vzorky s 10 % hroznovým extraktem a vzorky bez extraktu, byly potvrzeny ve všech vyšetřených vzorcích. U jedlé obaly z přídatkem hroznového extraktu byla potvrzena přítomnost bláže

neurčitelných struktur, které pochází z procesu extrakce. Jejich začlenění do chitosanové sítě ale bylo potvrzeno, jejich přítomnost způsobila prominanci biofilmu, která je způsobena adhezí chitosanu k rostlinným tkáním.

Závěr

Elektronová mikroskopie potvrdila rozdíly mezi kontrolou a jednotlivými vzorky. Rozdíly byli potvrzeny na povrchu a také v lomu jedlých obalů na bázi chitosanu. Rozdíly mezi vzorky s a bez přídavku hroznového extraktu byly potvrzeny. Dílčím výsledkem je také potvrzení dřívější studie (ITA 2020), že manipulace s obalem způsobuje strukturální změny a vhodnějším způsobem pro hodnocení je přímé formování gelu na vodivém terčíku.

Literární zdroje

- BAKHY, Eman Abdel, Nahla S ZIDAN a Hosam El Din ABOUL-ANEAN, 2018. The Effect of Nano Materials On Edible Coating and Films' Improvement. *International Journal of Pharmaceutical Research and Allied Sciences* [online]. **7**(3), 20–41 [vid. 2021-11-09]. ISSN 2277-3657. Dostupné z: www.ijpras.com
- FENG, Zhibiao, Lele LI, Qiannan WANG, Guangxin WU, Chunhong LIU, Bin JIANG a Jing XU, 2019. Effect of Antioxidant and Antimicrobial Coating based on Whey Protein Nanofibrils with TiO₂ Nanotubes on the Quality and Shelf Life of Chilled Meat. *International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 1184* [online]. **20**(5), 1184 [vid. 2021-11-09]. ISSN 14220067. Dostupné z: [doi:10.3390/IJMS20051184](https://doi.org/10.3390/IJMS20051184)
- GOHARGANI, Maryam, Hannan LASHKARI a Alireza SHIRAZINEJAD, 2020. Study on Biodegradable Chitosan-Whey Protein-Based Film Containing Bionanocomposite TiO₂ and Zataria multiflora Essential Oil. *Journal of Food Quality* [online]. **2020**. ISSN 17454557. Dostupné z: [doi:10.1155/2020/8844167](https://doi.org/10.1155/2020/8844167)
- KUMAR, Santosh, Ankita SHUKLA, Partha Pratim BAUL, Atanu MITRA a Dipankar HALDER, 2018. Biodegradable hybrid nanocomposites of chitosan/gelatin and silver nanoparticles for active food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life* [online]. **16**, 178–184 [vid. 2021-11-09]. ISSN 22142894. Dostupné z: [doi:10.1016/j.foodpack.2018.03.008](https://doi.org/10.1016/j.foodpack.2018.03.008)
- LA, Duc D, Phuong NGUYEN-TRI, Khoa H LE, Phuong TM NGUYEN, M DAC-BINH NGUYEN, Anh TK VO, Minh TH NGUYEN, S WOONG CHANG, Lam D TRAN, W JIN CHUNG, D DUC NGUYEN, Hoang QUOC VIET a Cau GIAY, 2020. Effects of antibacterial ZnO nanoparticles on the performance of a chitosan/gum arabic edible coating for post-harvest banana preservation [online]. [vid. 2021-11-09]. Dostupné z: [doi:10.1016/j.porgcoat.2020.106057](https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2020.106057)
- LE, Khoa Hai, Minh DAC-BINH NGUYEN, Lam DAI TRAN, Hong PHUONG, Nguyen THI, Chinh VAN TRAN, Khanh VAN TRAN, Hoai PHUONG, Nga Dinh THI, Y Soo YOON, D DUC NGUYEN a D DUC LA, 2021. A novel antimicrobial ZnO nanoparticles-added polysaccharide edible coating for the preservation of postharvest avocado under ambient conditions. *Progress in Organic Coatings* [online]. **158**, 106339 [vid. 2021-11-09]. Dostupné z: [doi:10.1016/j.porgcoat.2021.106339](https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2021.106339)
- LI, Jianmei, Qi SUN, Ying SUN, Baorong CHEN, Xiaoling WU a Tao LE, 2019. Improvement of banana postharvest quality using a novel soybean protein isolate/cinnamaldehyde/zinc oxide bionanocomposite coating strategy. *Scientia Horticulturae* [online]. **258** [vid. 2021-11-09]. ISSN 03044238. Dostupné z: [doi:10.1016/j.scienta.2019.108786](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108786)
- LI, Yanxia, Yanfeng JIANG, Fei LIU, Fazheng REN, Guanghua ZHAO a Xiaojing LENG, 2011. Fabrication and characterization of TiO₂/whey protein isolate nanocomposite film. *Food Hydrocolloids* [online]. **25**(5), 1098–1104. ISSN 0268005X. Dostupné z: [doi:10.1016/j.foodhyd.2010.10.006](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.10.006)

Alergenicitá obalů

Korýši jsou jedním z nejvýznamnějších zdrojů potravinových alergií a jejich hlavním alergenem je bílkovina tropomyosin (Shibahara et al., 2007). Tropomyosin je ve vodě rozpustný, tepelně stabilní protein s molekulovou hmotností v rozmezí od 36 do 38 kDa a je spojován s přecitlivělostí zprostředkovanou protilátkami imunoglobuliny E (IgE) (Werner et al., 2007). U citlivých jedinců se mohou alergické příznaky po požití objevit už během několika minut a to ve formě nevolnosti, zvracení, kopřivky, astmatu až po anafylaktický šok (Poms et al., 2004; Davis et al., 2020). Skupina korýšů zahrnuje zejména krevety, garnáty, kraby, raky a humry (Wild and Lehrer, 2005; Davis et al., 2020). Z exoskeletu korýšů se získává chitosan (Dutta, 2017), což je polysacharid (ne protein), který může fungovat také jako potravinový alergen a to z důvodu své molekulové hmotnosti a obecných vlastností (Kato et al., 2005). Jsou zaznamenány případy alergie na chitosan po perorálním požití, kdy se vyvinula systémová kopřivka a potíže s dýcháním (Kato et al., 2005).

Alergičtí jedinci se musí vyhýbat potravinám obsahujícím korýše, což vyžaduje vysoce citlivé a přesné detekční metody (Eischeid et al., 2021). Vhodnou metodou pro detekci alergenů korýšů v potravinách je sendvičová ELISA (Poms et al., 2004; Shibahara et al., 2007; Yu et al., 2019; Eischeid et al., 2021).

Chitosan je přírodní bioaktivní polysacharid s vnitřní antimikrobiální aktivitou. Díky jeho výjimečným fyzikálně-chemickým vlastnostem, které jsou dané polysacharidovou kostrou, je chitosan přirozenou alternativou k chemicky syntetizovaným antimikrobiálním polymerům (van den Broek et al., 2015). Chitosan má unikátní vlastnosti jako je biologická rozložitelnost, biokompatibilita, netoxicitá a obnovitelnost (Barikani et al., 2014), proto ho lze použít jako alternativu k výrobě potravinových obalů (Motelica et al., 2020).

Materiál a metodika:

Příprava vzorku vycházela z návodu, který byl součástí komerčního kitu Veratox® for Crustacea Allergen, č. 8520 (Neogen, GB). Veratox® for Crustacea Allergen je sendvičový enzymatický imunosorbentní test (S-ELISA), kde protilátky testu reagují s proteiny korýšů (polyklonální protilátky).

Příprava extraktu vzorku:

1 g vzorku upraveného na požadovanou velikost byl navážen do plastové zkumavky o objemu 50 ml. Ke každému vzorku bylo přidáno extrakční aditivum a 25 ml extrakčního roztoku o teplotě 30 °C. Zkumavka byla uzavřena a vzorek byl extrahován ve vodní lázni při 30 °C po dobu 30 minut za občasného protřepávání. Po vyjmutí zkumavek z vodní lázně se vzorky nechaly stát po dobu 5 minut a poté byly odstředěny na centrifuze CF-10 (Witeg, Germany) při 13 500 otáčkách po dobu 10 minut. K dalšímu stanovení byl použit získaný supernatant.

Kvantifikace:

150 µl kalibračních roztoků a vzorků bylo pipetováno do červeně označených jamek, z nichž bylo následně převedeno 100 µl kalibračních roztoků a vzorků do neoznačených (ne červených) jamek s protilátkou. Vzorky se standardy byly míchány po dobu 30 s a inkubovány při laboratorní teplotě 10 minut, poté byl obsah jamek vyprázdněn. Následně byly vzorky a standardy 5x promyty promývacím pufrem a po vyprázdnění obsahu jamek bylo přidáno 100 µl konjugátu, mícháno 30 s a inkubováno při laboratorní teplotě 10 minut. Po vyprázdnění obsahu byly jamky opět 5x promyty promývacím pufrem a po opětovném vyprázdnění obsahu jamek bylo přidáno 100 µl substrátu, který byl opět 30 s míchán a inkubován 10 minut při laboratorní teplotě. Následně byl ukončen vývoj barvení přidáním 100 µl činidla Red Stop, následovalo 30 s míchání a měření do 20 minut od přidavku zastavovacího roztoku (Red Stop). Měření probíhalo při vlnové délce 650 nm na spektrofotometru Infinite M Nano (Tecan, Rakousko). Výsledky byly vyjádřeny jako ppm alergenního proteinu korýšů. Měření bylo provedeno u každého vzorku 3x.

Limit kvantifikace: 2,5 ppm korýšů

Rozsah kvantifikace: 2,5–25 ppm korýšů

Statistika:

Ke statistickému vyhodnocení byl použit software SPSS (verze 23.0 SPSS, Chicago, IL, USA). Výsledky byly vyhodnoceny pomocí one-way analýzy (ANOVA). Na základě homogenity byly rozptyly určeny $p < 0,05$ jako statisticky významný rozdíl. Pro hodnoty $p < 0,05$ byly použity neparametrické Games–Howellovy testy. Pro $p > 0,05$ byl zvolen parametrický Tukey test.

Výsledky a diskuze:

Metodou sendvičového enzymatického imunosorbentního testu (ELISA) byl zjišťován obsah bílkovin s alergenním potenciálem v obalech, jejichž součástí byl chitosan a u poloviny vzorků také hroznová mouka ve stejné koncentraci. Vzorky dále obsahovaly přídavek nanočástic zinku (ZnO), titanu (TiO_2) nebo koloidní roztok stříbra (Ag) v různých koncentracích. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Koncentrace antigenních proteinů v ppm u jednotlivých druhů obalů s přídavkem a bez přídavku hroznové mouky.

Bez přídavku hroznové mouky			S přídavkem hroznové mouky		
vzorek	koncentrace antigenu (ppm)	přepočten na čistý protein (ppm)	vzorek	koncentrace antigenu (ppm)	přepočten na čistý protein (ppm)
Ch	27,49±0,04	6,05±0,01	Ch Hr	11,09±0,05	2,44±0,01
Ch Zn 0,05 %	33,67±0,60	7,41±0,13	Ch Zn Hr 0,05 %	1,70±0,01	0,37±0,00
Ch Zn 0,2 %	44,55±2,77	9,80±0,61	Ch Zn Hr 0,2 %	2,17±0,03	0,48±0,01
Ch Zn 0,5 %	44,61±3,87	9,81±0,85	Ch Zn Hr 0,5 %	2,76±0,05	0,61±0,01
Ch Ti 0,05 %	35,87±1,70	7,89±0,37	Ch Ti Hr 0,05 %	3,59±0,02	0,79±0,00
Ch Ti 0,2 %	30,97±0,31	6,81±0,07	Ch Ti Hr 0,2 %	2,47±0,04	0,54±0,01
Ch Ti 0,5 %	20,26±0,04	4,46±0,01	Ch Ti Hr 0,5 %	0,08±0,02	0,02±0,00
Ch Ag 10 ppm	25,90±0,96	5,70±0,21	Ch Ag Hr 10 ppm	3,98±0,05	0,88±0,01
Ch Ag 30 ppm	21,10±0,32	4,64±0,07	Ch Ag Hr 30 ppm	10,19±0,04	2,24±0,01
Ch Ag 50 ppm	15,85±0,12	3,49±0,03	Ch Ag Hr 50 ppm	25,98±1,30	5,72±0,29

Ch – chitosan, Hr – hroznová mouka, nano ZnO – oxid zinečnatý, nano TiO_2 – oxid titaničitý, Ag – koloidní stříbro.

Výsledky vyjádřené jako protein byly vynásobeny faktorem 0,22 (v průměru korýši obsahují 22 % bílkovin)*.

*Zdroj: USDA National Nutrient Database for Standard Reference Release 28, #15270 - Crustaceans, shrimp, raw; #15271 - Crustaceans, shrimp, cooked.

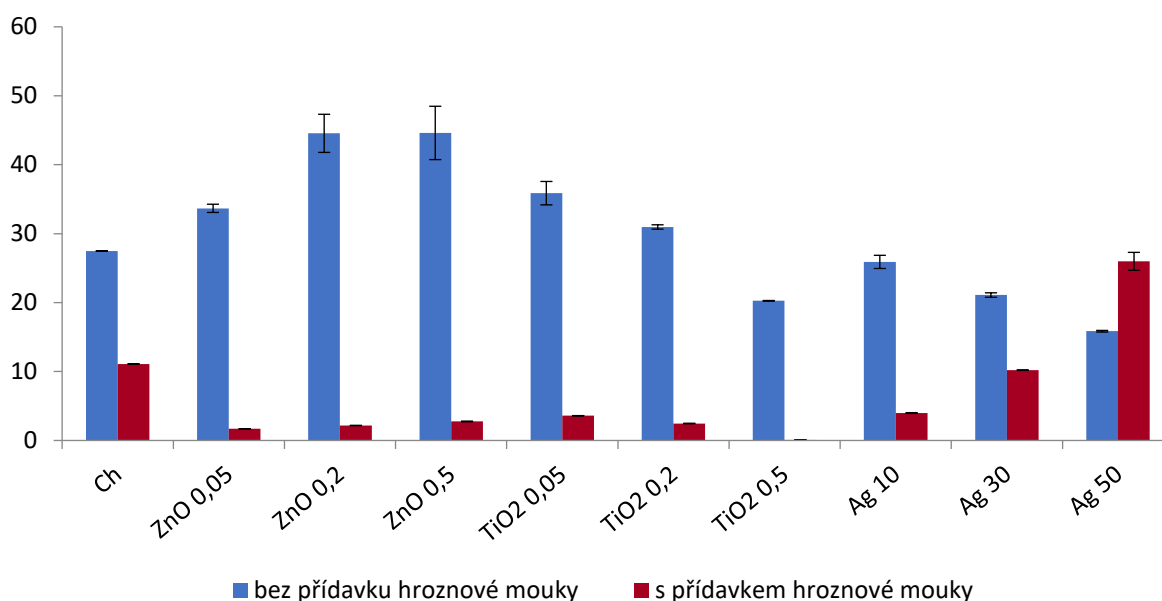
Námi analyzovaný kontrolní vzorek chitosanu bez přídavku hroznové mouky vykazoval statisticky významně ($p \leq 0,05$) vyšší reaktivitu (27,49±0,04 ppm) než kontrolní vzorek chitosanu s přídavkem hroznové mouky (11,09±0,05 ppm). Antigenní reaktivita ve vzorcích obohacených nanočásticemi oxidu zinečnatého bez přídavku hroznové mouky stoupala se zvyšující se koncentrací oxidu zinečnatého (33,67±0,60 ppm pro 0,05 ZnO; 44,55±2,77 ppm pro 0,2 ZnO a 44,61±3,87 ppm pro 0,5 ZnO), podobně jako u vzorků s obsahem hroznové mouky (1,70±0,01 ppm pro 0,05 ZnO; 2,17±0,03 ppm pro 0,2 ZnO a 2,76±0,05 ppm pro 0,5 ZnO), kdy reaktivita antigenů měla také vzrůstající tendenci.

Se zvyšujícím se obsahem nanočástic oxidu titaničitého ve vzorcích se snižovala reaktivita antigenů, jak ve vzorcích obohacených hroznovou moukou (3,59±0,02 ppm pro 0,05 TiO₂; 2,47±0,04 ppm pro 0,2 TiO₂ a 0,08±0,02 ppm pro 0,5 TiO₂), tak i ve vzorcích bez hroznové mouky (35,87±1,70 ppm pro 0,05 TiO₂; 30,97±0,31 ppm pro 0,2 TiO₂ a 20,26±0,04 ppm pro 0,5 TiO₂).

Jiná situace byla zjištěna u vzorků obalů s obsahem koloidního stříbra a hroznové mouky, kdy se reaktivita antigenů zvyšovala se zvyšující se koncentrací koloidního Ag (3,98±0,05 ppm pro 10 Ag; 10,19±0,04 ppm pro 30 Ag a 25,98±1,30 ppm pro 50 Ag), zatímco u vzorků bez přídavku hroznové mouky se zvyšující se koncentrací koloidního Ag se reaktivita snižovala (25,90±0,96 ppm pro 10 Ag; 21,10±0,32 ppm pro 30 Ag a 15,85±0,12 ppm pro 50 Ag).

Rozdíly mezi vzorky stejné koncentrace s přídavkem a bez přídavku hroznové mouky byly ve všech případech statisticky významné ($p \leq 0,05$).

Graf 1: Obsah antigenů v závislosti na přídavku ZnO, TiO₂, Ag a hroznové mouky.



Hrozny jsou bohaté na fenolické sloučeniny a přibližně 75 % polyfenolů se nachází v semenech a slupkách, které se dále využívají k výrobě hroznové mouky (Ghafoor et al. 2009; Lorenzo et al. 2014; Antonić et al. 2020). U polyfenolů byla dobře zdokumentována antibakteriální aktivita (Xie et al., 2017; Özkan et al., 2003). Je také známo, že fenolické sloučeniny tvoří rozpustné a nerozpustné komplexy s proteiny (Chung and Champagne, 2009) a dále byla popsána také interakce mezi proteiny a fenolickými látkami a změna proteinové imunoreaktivity (Zhang et al., 2018). Naše výsledky rovněž potvrdily změnu imunoreaktivity následkem přídavku zdroje fenolických látek (hroznová mouka). Všechny vzorky s přídavkem hroznové mouky vykazovaly nižší imunoreaktivitu než vzorky bez přídavku, s výjimkou vzorků s přídavkem 50 ppm koloidního stříbra. U koloidního stříbra s přídavkem hroznové mouky je pozorována opačná závislost než u vzorků bez přídavku. Tento vztah může být vysvětlen reakcí fenolických látek s koloidním stříbrem.

Nguyen (2012) se ve své práci zaměřil na charakterizaci možných reziduálních alergenních proteinů v chitosanu. Metodou inhibiční ELISA byla potvrzena imunoreaktivita reziduí proteinu ve vzorcích chitosanu, konkrétně tropomyosinu specifického pro korýše. To je v souladu s pozorovanými alergickými reakcemi, ke kterým dochází při expozici produktů obsahujících chitosan. Naše výsledky jsou v souladu s touto studií ve všech vzorcích.

Z literatury je dle Ravindranathan et al. (2016) zřejmé, že existuje řada nesrovnalostí souvisejících s imunoreaktivitou po aplikaci chitosanu. Chitosany vyrobené různými způsoby mohou indukovat různé imunitní reakce (Ravindranathan et al., 2016). Z tohoto důvodu je potřebné, aby varování a informace o přítomnosti tropomyosinu v produktech obsahujících chitosan byla k dispozici pro spotřebitele, kteří mohou být citliví vůči koryšům (Nguyen, 2012).

Závěr:

Obaly vyrobené z chitosanu s přídavkem hroznové mouky vykazovaly nižší antigenní reaktivitu ELISA testem v porovnání se vzorky obalů bez obsahu hroznové mouky. Výjimkou byly vzorky s obsahem 50 ppm koloidního stříbra, kde byla reaktivita nejvyšší u vzorků s přídavkem hroznové mouky. Vzorky s přídavkem hroznové mouky se statisticky významně ($p \leq 0,05$) lišily od vzorků bez přídavku hroznové mouky při porovnání vzorků stejných koncentrací přídavků ZnO, TiO₂ a koloidního Ag.

Reference:

- Shibahara, Y; Oka, M; Tominaga, K; Ii, T; Umeda, M; Uneo, N; Abe, A; Ohashi, E; Ushio, H; Shiomi, K. Determination of crustacean allergen in food products by sandwich ELISA. *JOURNAL OF THE JAPANESE SOCIETY FOR FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NIPPON SHOKUHIN KAGAKU KOGAKU KAISHI*. **2007**, 54, 280-286.
- Poms, R. E., Klein, C. L., & Anklam, E. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food additives and contaminants*, **2004**, 21(1), 1-31.
- Davis, C.M., Gupta, R.S., Aktas, O.N., Diaz, V., Kamath, S.D.; Lopata, A.L. Clinical Management of Seafood Allergy. *J Allergy Clin Immunol Pract*. **2020**, 8(1), 37-44. doi: 10.1016/j.jaip.2019.10.019. PMID: 31950908.
- Wild LG, Lehrer SB. Fish and shellfish allergy. *Curr Allergy Asthma Rep* **2005**; 5:74-9.
- Dutta, A.S. P.K. Extraction of Chitin-Glucan Complex from *Agaricus bisporus*: Characterization and Antibacterial Activity. *J. Polym. Mater.* **2017**, 34, 1–9.
- Kato, Y., Yagami, A., & Matsunaga, K. A case of anaphylaxis caused by the health food chitosan. *Arerugi=[Allergy]*, **2005**, 54(12), 1427-1429.
- Eischeid AC, Stadig SR, Rallabhandi P. Comparison of real-time PCR and ELISA for the detection of crustacean shellfish allergens. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2021 Apr;38(4):563-572. doi: 10.1080/19440049.2021.1874061. Epub 2021 Feb 22. PMID: 33617420.
- Yu, Z., Wang, Y., Li, Z., Pramod, S. N., Zhang, L., & Lin, H. Development of ELISA method for detecting crustacean major allergen tropomyosin in processed food samples. *Food Analytical Methods*, **2019**, 12(12), 2719-2729.
- van den Broek, L. A., Knoop, R. J., Kappen, F. H., & Boeriu, C. G. Chitosan films and blends for packaging material. *Carbohydrate polymers*, **2015**, 116, 237-242.
- Barikani, M., Oliaei, E., Seddiqi, H., & Honarkar, H. Preparation and application of chitin and its derivatives: A review. *Iranian Polymer Journal*, **2014**, 23(4), 307–326.
- Motelica, Ludmila; Ficai, Denisa; Ficai, Anton; Oprea, Ovidiu Cristian; Durmuş Alpaslan Kaya; et al. *Foods; Basel* Sv. 9, Čís. 10, **2020**, 1438. DOI:10.3390/foods9101438
- Werner, M.T., Faeste, C.K., Egaas, E. Quantitative sandwich ELISA for the determination of tropomyosin from crustaceans in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**, 55(20), 8025–8032. [Crossref. PubMed](#)
- Ghafoor, K.; Choi, Y. H.; Jeon, J. Y.; Jo, I. H. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from Grape (*Vitis Vinifera*) Seeds. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57 (11), 4988–4994. <https://doi.org/10.1021/jf9001439>
- Lorenzo, J.M.; Sineiro, J.; Amado, I.R.; Franco, D. Influence of natural extracts on the shelf life of modified atmosphere-packaged pork patties. *Meat Sci.* **2014**, 96, 526–534.

Antonić, B.; Jančíková, S.; Dordević, D.; Tremlová, B. Grape Pomace Valorization: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Foods*. **2020**, 9 (11), 1627. doi: 10.3390/foods9111627. PMID: 33171832; PMCID: PMC7695143.

Garcia-Lomillo, J.; Luisa Gonzalez-SanJose, M. Applications of Wine Pomace in the Food Industry: Approaches and Functions. *Compr. Rev. FOOD Sci. FOOD Saf.* **2017**, 16 (1), 3–22. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12238>.

Özkan, G.; Sağdıç, O.; Göktürk-Baydar, N. Antibacterial effect of narince grape (*Vitis vinifera L.*) pomace extract. *Selcuk J. Agr. Food Sc.*, **2003**, 17, 53-56.

Xie, Y; Chen, J; Xiao, A; Liu, L. Antibacterial Activity of Polyphenols: Structure-Activity Relationship and Influence of Hyperglycemic Condition. *Molecules*. **2017**, 22, 1913. doi:10.3390/molecules22111913

Zhang, Y., Liu, C., Su, M., Roux, K. H., & Sathe, S. K. Effect of phenolics on amandin immunoreactivity. *LWT*, **2018**, 98, 515-523.

Nguyen, M.X.H. Characterization of allergenic and antimicrobial properties of chitin and chitosan and formulation of chitosan-based edible film for instant food casing. *School of Applied Sciences*. **2012**, RMIT University, Melbourne, Australia.

Chung, S.-Y., Champagne, E.T. Reducing the allergenic capacity of peanut extracts and liquid peanut butter by phenolic compounds. *Food Chemistry*, **2009**, 115, 4, 1345–1349.

Ravindranathan, S., Koppolu, B.P., Smith, S.G., Zaharoff, D.A. Effect of chitosan properties on immunoreactivity. *Marine drugs*, 2016, 14, 5, 91.

Senzorická analýza obalů

Metodika

Kvantitativní deskriptivní analýza

Kvantitativní deskriptivní analýza i hédonická analýza byly provedeny na Ústavu hygieny a technologie potravin rostlinného původu FVHE VETUNI. Na kvantitativní deskriptivní analýze se podílel panel 14 školených hodnotitelů, který měl předchozí zkušenost s hodnocení jedlých obalů. Pro účely kvantifikace atributů byly využity 9-ti stupňové kategorové ordinální stupnice s popsányi extrémy od 1 (minimální intenzita) do 9 (nejvyšší intenzita). Hodnocené deskriptory zahrnovaly intenzitu barvy, intenzitu vůně, charakter povrchu, flexibilitu, lepivost a celkové hodnocení. Kvantitativní deskriptivní analýza byla provedena dvakrát.

Hedonická analýza

Na základě výsledků analýzy provedené školeným panelem bylo z celkem 20 vzorků vyselektováno 11 vzorků, které dosáhly v celkovém hodnocení průměrné skóre vyšší než 5. Těchto 11 vyselektovaných vzorků bylo následně hodnoceno hedonickou analýzou, na které se podílelo 65 neškolených hodnotitelů z řad studentů a zaměstnanců FVHE VETUNI. Deskriptory zahrnující příjemnost vzhledu, příjemnost vůně, příjemnost textury a celkové hodnocení byly hodnoceny pomocí 9-ti místní kategorové ordinální hedonické stupnice, kde 1 znamenalo extrémně nepříjemný vjem, 5 znamenalo neutrální vjem a 9 nejvyšší míru příjemnosti.

Hodnocení pravděpodobnosti nákupu potravinářských komodit v jedlém obalu

V rámci hédonického hodnocení byla hodnocena také pravděpodobnost nákupu výrobků typu ovoce, zelenina, masné výrobky, pekařské výrobky a mléčné výrobky (sýry) v jednotlivých vzorcích jedlých obalů. Pro účely hodnocení byla využita 5-ti bodová stupnice, kde 1 znamenalo nejnižší ochotu konzumovat výrobek v daném jedlém obalu, 3 znamenalo neutrální postoj a 5 znamenalo, že by byl hodnotitel určitě ochoten konzumovat danou komoditu v daném obalu.

Statistická analýza

Výsledky byly vyhodnoceny statistickým softwarem R (The R Foundation for Statistical Computing, Vídeň, Rakousko) pomocí balíčku SensoMineR. Data ze senzorické analýzy byly zpracovány metodou analýzy základních komponent (PCA).

Výsledky a diskuze

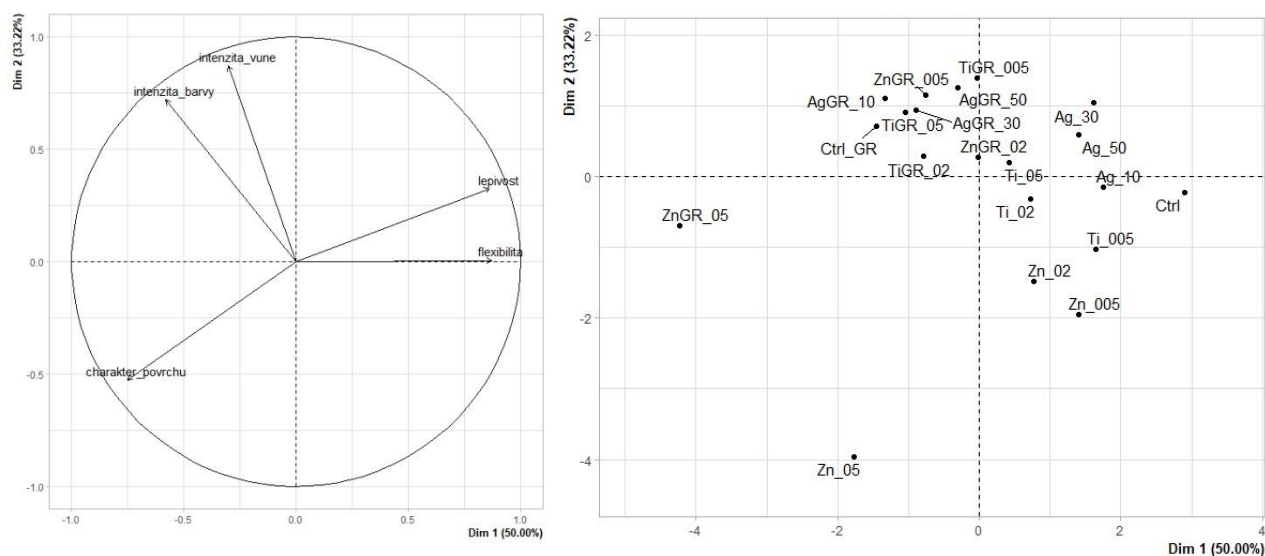
Kvantitativní deskriptivní analýza

Analýzou faktorů (Obrázek 1a) bylo potvrzena úzká korelace mezi intenzitou barvy a intenzitou vůně. Naopak mezi deskriptory charakter povrchu (hodnoty se pohybují od nejnižších pro hladký povrch po nejvyšší pro drsný povrch) a lepivost byla potvrzena záporná korelace. Graf výsledků analýzy hlavních komponent vysvětluje 83,22 % variability použitím dvou hlavních komponent, přičemž první komponenta vysvětluje 50,00 % a druhá komponenta 33,22 % variability. Z mapy vzorků (Obrázek 1b) i z Tabulky 1 zobrazující statisticky významné ($p > 0.05$) rozdíly mezi jednotlivými jedlými obaly je vidět, že mezi jednotlivými vzorky jedlých obalů existovala řada statisticky významných rozdílů. Na mapě vzorků se jednoznačně vyčlenil odlehlý vzorek Zn_05 charakteristický vysokou drsností povrchu a současně velmi nízkými hodnotami intenzity barvy, intenzity vůně, lepivosti i flexibility. Druhým odlehlým vzorkem byl vzorek ZnGR_05 charakteristický rovněž vysokou drsností povrchu, nízkou lepivostí a flexibilitou, ale současně statisticky významně vyšší intenzitou vůně i barvy. Vzorky obsahující hroznový extrakt patřily obecně ke vzorkům charakteristickým intenzivnější barvou i vůní, a to z důvodu přítomnosti typických antokyanových barviv a řady charakteristických těkavých aromatických látek (Wu *et al.*, 2019; Zifkin *et al.*, 2012). Výrazně se lišil také kontrolní vzorek bez obsahu nano-kovů a rovněž bez obsahu hroznového extraktu, který byl charakteristický hladkým povrchem, nízkou intenzitou barvy i vůně, vyšší lepivostí i flexibilitou. Podle Marvizadeh *et al.* (2017), zvyšování podílu nanočástic oxidů zinku i titanu způsobovalo snižování flexibility jedlých obalů, nicméně obaly vykazovaly hladký povrch bez pórů či trhlin. Co se týče vzorků analyzovaných v rámci této studie, hodnoty flexibility vzorků s obsahem nano-kovů, avšak bez přidaného hroznového extraktu vykazovaly spíše vyšší flexibilitu, srovnatelnou s kontrolním vzorkem. Charakter povrchu se pohyboval v širším intervalu od 1,89 do 8,49. Podle Marvizadeh *et al.* (2017) přídavek nano-kovů rovněž přispěl ke změně instrumentálně stanovené barvy v systému CIELab, a to výrazným snížením hodnot L^* a současně zvýšením hodnot a^* and b^* , což se projevilo mírným načervenalým a nažloutlým nádechem. V rámci naší studie byla sensoricky hodnocena intenzita barvy obalů, která byla u většiny vzorků bez obsahu hroznového extraktu mírně vyšší ve srovnání s kontrolním vzorkem.

Tabulka 26 Ošetřené průměry hodnocení v rámci kvantitativní deskriptivní analýzy jedlých obalů

	flexibilita	lepivost	intenzita_vune	intenzita_barvy	charakter_povrchu
Ctrl	8.041	4.625	3.636	2.618	2.986
Ag_10	8.005	3.63	4.216	3.158	2.592
Ti_005	7.605	3.83	3.416	3.658	3.592
Ag_30	8.205	4.33	5.216	4.458	3.092
Zn_005	6.705	3.33	3.016	1.858	3.592
Ag_50	8.705	4.33	4.616	5.858	4.092
Zn_02	7.705	2.83	3.916	2.058	4.492
Ti_02	7.905	3.13	3.716	6.358	3.492
Ti_05	7.605	3.13	4.116	6.758	3.592
ZnGR_02	7.705	2.73	4.616	6.558	3.992
TiGR_005	4.405	3.43	4.616	7.958	1.892
AgGR_50	5.205	3.33	4.816	8.958	3.192
ZnGR_005	4.905	3.13	4.916	7.658	3.492
TiGR_02	6.605	2.93	4.416	8.558	5.192
AgGR_30	4.305	3.33	4.616	8.658	3.892
TiGR_05	6.305	2.73	5.116	8.558	4.792
Zn_05	4.005	2.03	2.516	2.858	8.392
Ctrl_GR	3.405	3.13	4.816	7.758	4.292
AgGR_10	4.605	3.23	5.416	8.058	4.692
ZnGR_05	1.705	1.63	5.316	7.358	8.492

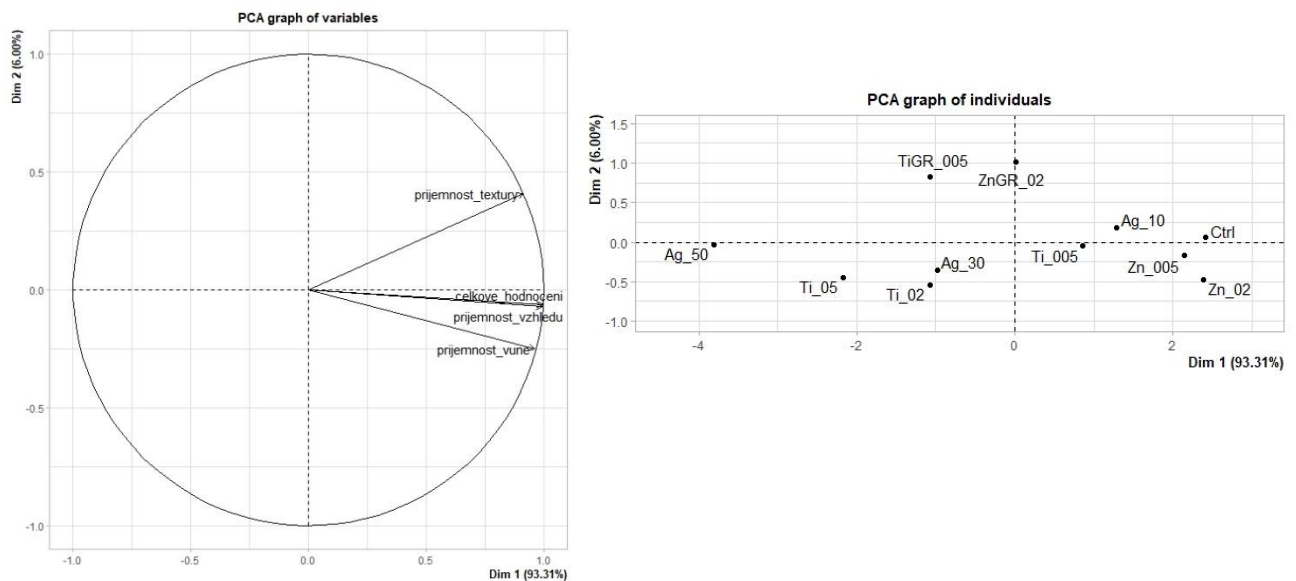
Obrázek 1 Výsledky PCA analýzy dat z kvantitativní deskriptivní analýzy jedlých obalů: (a) Graf proměnných. (b) Mapa vzorků.



Hedonická analýza

Analýzou faktorů (Obrázek 2a) bylo potvrzena úzká korelace mezi celkovým hodnocením a příjemností vzhledu, poté příjemností vůně. Graf výsledků analýzy hlavních komponent vysvětluje 99,31 % variability použitím dvou hlavních komponent, přičemž první komponenta vysvětluje 93,31 % a druhá komponenta pouze 6,00 % variability. Z mapy vzorků (Obrázek 2b) i z Tabulky 2 zobrazující statisticky významné ($p > 0.05$) rozdíly mezi jednotlivými jedlými obaly je vidět, že mezi jednotlivými vzorky jedlých obalů existovala řada statisticky významných rozdílů.

Obrázek 2 Výsledky PCA analýzy dat z hedonické analýzy jedlých obalů: (a) Graf proměnných. (b) Mapa vzorků.



Na mapě vzorků se jednoznačně vyčlenil odlehlý vzorek Ag_50 charakteristický nejnižšími hodnotami příjemnosti ve všech hodnocených deskriptorech. Druhým odlehlým a nejhůře hodnoceným vzorkem byl vzorek Ti_05. Nejlépe hodnoceným byl kontrolní vzorek bez obsahu nano-kovů a hroznového extraktu, který však byl těsně následován vzorky s obsahem nano-zinku v koncentracích 0,2 a 0,05 %. Všechny tyto vzorky dosahovaly nízkých hodnot v intenzitě barvy a vůně a vyznačovaly se hladkým povrchem s vysokou flexibilitou. Vysoké skóre v celkovém hodnocení tedy souviselo s jejich neutrálním charakterem, který je u jedlých obalů preferován (Mantilla *et al.*, 2013; Zhao and McDaniel, 2005). Z tohoto důvodu dosahovaly obecně vyšších hodnot vzorky neobsahující hroznový extrakt, nicméně u vzorku ZnGR_02 bylo dosaženo průměrných hodnot a byl vyhodnocen jako celkově přijatelný. Přídavek nano-kovů je významný z funkčního hlediska a umožňuje výrobu obalů s antimikrobiální aktivitou (Marchiore *et al.*, 2017). Vzorky s vyšší koncentrací přídavku nano-kovu však dosahovaly nižší příjemnosti.

Tabulka 2 Ošetřené průměry hodnocení v rámci hedonické analýzy jedlých obalů

	prijemnost_textury	prijemnost_vune	prijemnost_vzhledu	celkove_hodnoceni
Ag_50	5.8	4.708	3.031	4.569
Ti_05	6	5.123	4.185	5.262
TiGR_005	6.677	5.031	4.785	5.708
Ti_02	6.215	5.385	4.815	5.723
Ag_30	6.308	5.369	4.785	5.769
ZnGR_02	7.031	5.308	5.215	6
Ti_005	6.754	5.538	6.262	6.723
Ag_10	6.954	5.631	6.415	6.769
Zn_005	6.985	5.815	7.138	7.262
Zn_02	6.938	5.954	7.323	7.323
Ctrl	7.169	5.908	7.031	7.246

Hodnocení pravděpodobnosti nákupu potravinářských komodit v jedlém obalu

Výsledky analýzy pravděpodobnosti nákupu různých skupin potravinových komodit zabalených do jednotlivých jedlých obalů jsou zobrazeny v Tabulce 3. Jelikož většina hodnot bylo nižších než 3, je patrné, že hodnotitelé si nedokázali představit využití analyzovaných jedlých obalů pro skupiny komodit, jako jsou masné výrobky, mléčné výrobky (sýry), pekařské výrobky či ovoce a zelenina. Nejvyšších hodnot a tudíž i nejvyšší pravděpodobnosti nákupu potravin dosáhl kontrolní vzorek neobsahující hroznový extrakt ani nano-kov. Ze vzorků obsahujících nano-kovy bylo pro hodnotitele nejlépe představitelné využití vzorků s 0,05% a 0,2% koncentrací nano-zinku, a to pro všechny hodnocené typy komodit, poté vzorku Ti_005, a to pro balení ovoce, zeleniny a mléčných výrobků.

Tabulka 27 Ošetřené průměry hodnocení pravděpodobnosti nákupu vybrané komodity v jedlém obalu

	masne_vyroby	mlečne_vyroby	pekarske_vyroby	ovoce	zelenina
Ag_50	1.865	1.676	1.703	1.595	1.595
ZnGR_02	3.081	2.027	2.27	2.189	2.162
Ti_05	2.351	3.351	2.081	2.162	2.162
TiGR_005	3.459	1.946	2.162	2.243	2.081
Ag_30	2.676	2.324	2.514	2.432	2.405
Ti_02	2.27	3.378	2.351	2.514	2.459
Ag_10	2.946	2.784	2.649	2.919	3
Ti_005	2.973	3.405	2.973	3.216	3.27
Ctrl	3	3.405	2.649	3.676	3.459
Zn_02	3.703	3.595	3.378	4	3.838
Zn_005	3.73	3.811	3.432	4.324	4.297

Závěry

Přídavek hroznového extraktu obecně způsoboval snížení flexibility vzorků a současné zvýšení intenzity vůně i barvy, a to do té míry, že pouze dva vzorky s obsahem tohoto extraktu a současně obsahující přídavek nano-kovů dosáhly uspokojující skóre v rámci celkového hodnocení. Z hlediska vlivu přídavku různých koncentrací nano-kovů na kvantitativně deskriptivně hodnocené deskriptory nebyl patrný jasný trend. Nicméně hedonické hodnocení odhalilo, že přídavek nano-kovů a jejich zvyšující se koncentrace obecně způsobovala zhoršení přijemnosti vzorků. Přesto u 9 z celkového počtu 18 vzorků s obsahem nano-kovů bylo dosaženo celkové hodnocení vyšší než 5. Ze sensorického hlediska se jako nejpriznivější ze všech nano-kovů jevil přídavek nano-zinku v koncentracích 0,2 a 0,05 %.

Reference

- Marchiore, N.G., Manso, I.J., Kaufmann, K.C., Lemes, G.F., de Oliveira Pizolli, A.P., Droval, A.A., Bracht, L., Gonçalves, O.H. and Leimann, F.V., 2017. Migration evaluation of silver nanoparticles from antimicrobial edible coating to sausages. *LWT-Food Science and Technology*, 76, pp.203-208. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.013>
- Marvizadeh, M.M., Oladzabbasabadi, N., Nafchi, A.M. and Jokar, M., 2017. Preparation and characterization of bionanocomposite film based on tapioca starch/bovine gelatin/nanorod zinc oxide. *International journal of biological macromolecules*, 99, pp.1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.067>
- Zhao, Y., McDaniel, M. Sensory quality of foods associated with edible film and coating systems and shelf-life extension. *Innovations in Food Packaging* 2005, s. 434-453. doi:10.1016/B978-012311632-1/50056-5

Mantilla, N., M.E. Castell-Perez, C. Gomes A R.G. Moreira. Multilayered antimicrobial edible coating and its effect on quality and shelf-life of fresh-cut pineapple (*Ananas comosus*). *LWT - Food Science and Technology* 2013, 51(1), 37-43. doi:10.1016/j.lwt.2012.10.010

Wu, Y., Zhang, W., Yu, W., Zhao, L., Song, S., Xu, W., Zhang, C., Ma, C., Wang, L. and Wang, S., 2019. Study on the volatile composition of table grapes of three aroma types. *LWT*, 115, p.108450. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108450>

Zifkin, M., Jin, A., Ozga, J.A., Zaharia, I., Scherthner, J.P., Gesell, A., Abrams, S., Kennedy, J.A. and Constabel, C.P., 2011. Gene expression and metabolite profiling of developing highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruit indicates transcriptional regulation of flavonoid metabolism and activation of abscisic acid metabolism. *Plant Physiology*, pp.pp-111. doi: 10.1104/pp.111.180950

Jedlé obaly – hodnocení barvy a barevných vlastností obalů

V současné době existuje celá řada umělých nanočástic, které se přidávají do obalů potravin jako funkční složka. V odborné literatuře se můžeme setkat s použitím nanočástic stříbra, nanojílů, nanooxidu zinečnatého (nano-ZnO), nano-oxid titaničitý (nano-TiN) (Bumbudsanpharoke and Ko, 2015). Důkazy ukázaly, že nanočástice oxidů kovů jako nano-Ag zlepšují mechanické a bariérové vlastnosti biodegradabilních filmů.

Jedním z důležitých parametrů jedlých obalů je barva a jejich průhlednost. Ty jsou důležité pro celkový vzhled obalu a pozitivní reakci spotřebitelů (Bahrami et al., 2019).

Materiál a metodika

Vzorky byly umístěny do 150 mm petriho misek. Digitální snímky všech vzorků byly získány systémem počítačového vidění. Snímání bylo prováděno za standardních světelných podmínek, které byly zajištěny 2 Lampami Osram Delux L – 1 x 18 W (Germany) a snímáním v temné komoře. Jednotlivé snímky byly pořízeny fotoaparátem Canon EOS 600D (Japan), umístěném na stativu (Fomei CS 920, Czech Republic) na bílém a černém pozadí. Režim focení byl v manuálním nastavení: doba expozice 1/15, clona F 8.0, velikost snímků L, citlivost ISO 100 (Acevedo et al., 2012). Každý vzorek byl snímán 10 krát.

Následně byly snímky zpracovány programem Nikon Imaging Software NIS-Elements BR 4.13.04 (Japan). Pro hodnocení v rámci NIS-Elements byla vybrána vždy stejná plocha kruhu (ROI - region of interest). Následně byly změřeny barevné charakteristiky MeanRed, MeanGreen a MeanBlue, které byly poté převedeny to CIEL*a*b* systému, kde L * znamená světlost, a* označuje polohu na červeno-zelené ose a b* na žluto-modré ose.

Byl sledován rozdíl mezi vzorky a kontrolou (ΔE). Tento parametr byl vypočítán pomocí rovnice CIE ΔE_{2000} (Luo et al., 2001; Sharma, 2003).

Dalším sledovaným parametrem byla Opacity (neprůhlednost) obalů. Ta byla získána výpočtem dle rovnice:

$$\% \text{ Opacity} = \frac{(L^*_{black})}{(L^*_{white})} * 100,$$

kde L* black byla získána z hodnot měření snímků pořízených na černém pozadí a L* white na bílém pozadí. Hodnota 100 % označuje obal neprůhledný a hodnota 0 % označuje průhledný obal (Navarro et al., 2016).

Dalším parametrem byl Whiteness index (index bělosti), která byla získána výpočtem uvedeného v práci Li et al. (2019):

$$\text{Whitness index} = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}}$$

kde L^* je hodnota získaná z výpočtů z měření na bílém pozadí, a^* označuje polohu na červeno-zelené ose a b^* na žluto-modré ose.

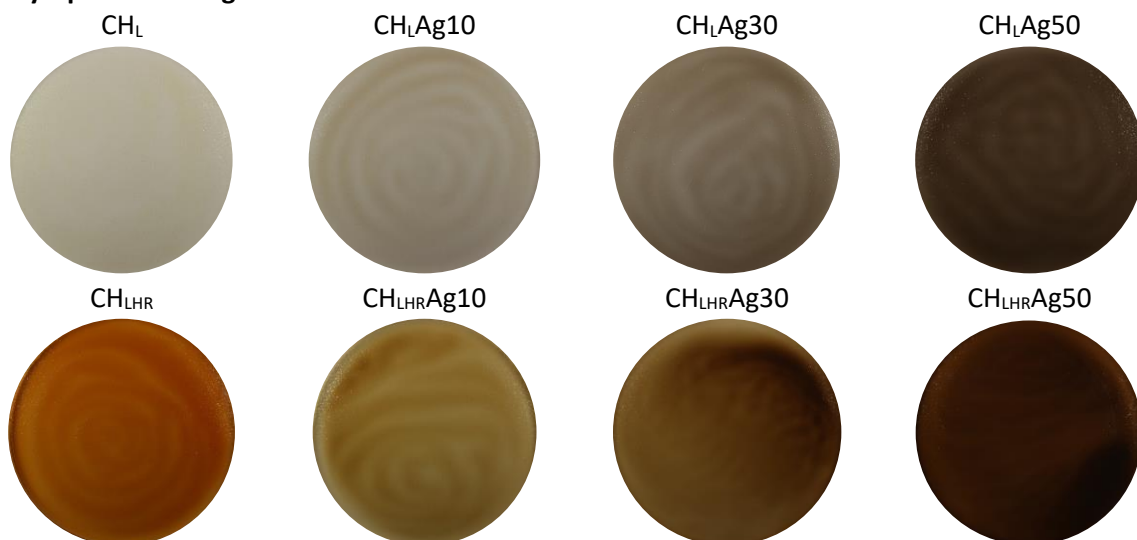
Saberi et al. (2016) použili k hodnocení parametr Yellowness index, který se získává výpočtem:

$$\text{Yellowness index} = \frac{142,86 b^*}{L^*}$$

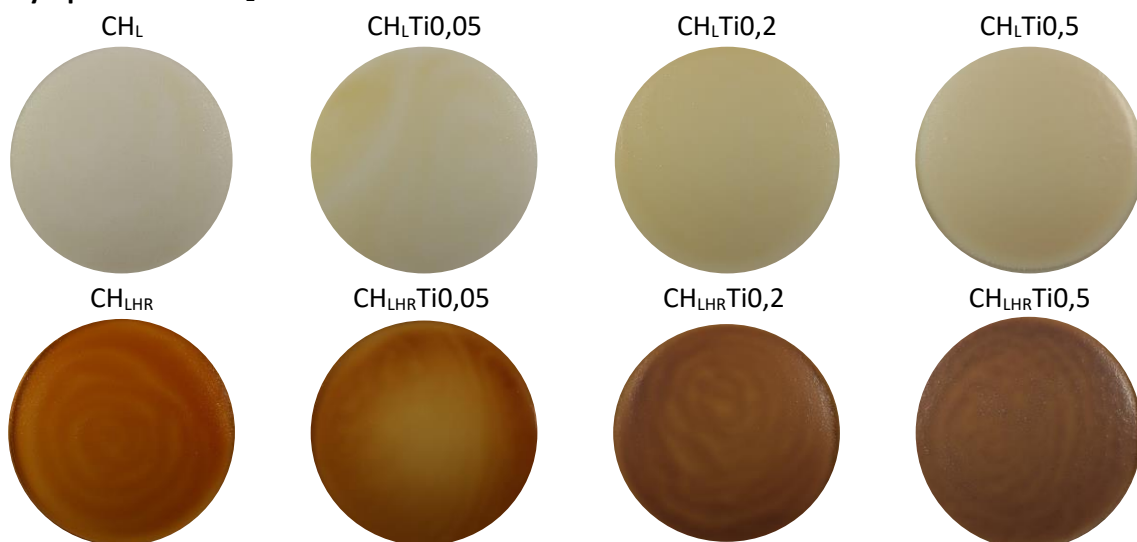
kde L^* je hodnota získaná z výpočtů z měření na bílém pozadí, b^* označuje polohu na žluto-modré ose.

Výsledky srovnání vzorků s jednotlivými přísadkami

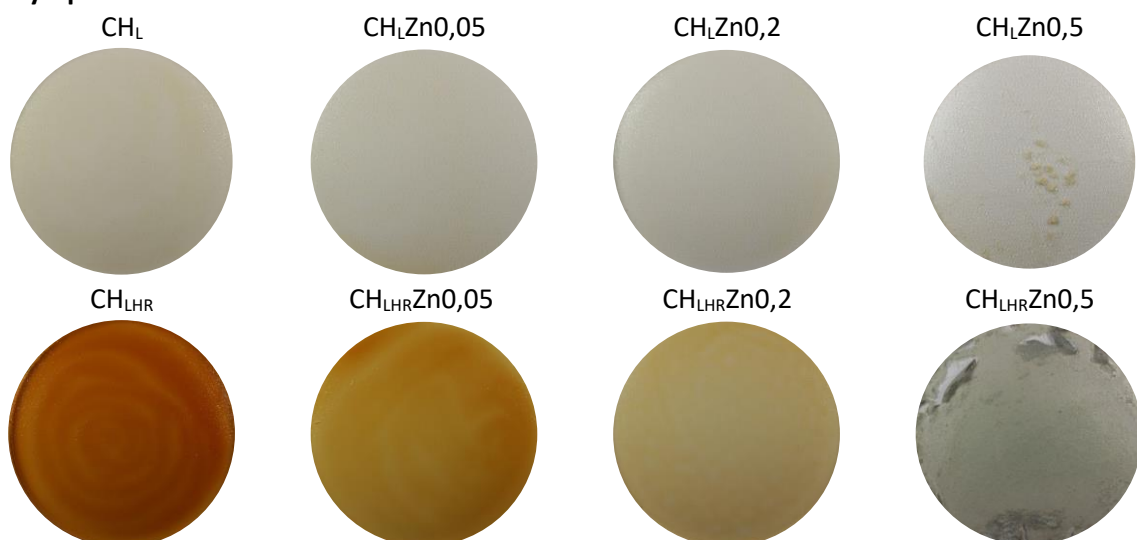
Obaly s přísadkou Ag



Obaly s přísadkou TiO₂



Obaly s přísadkou ZnO

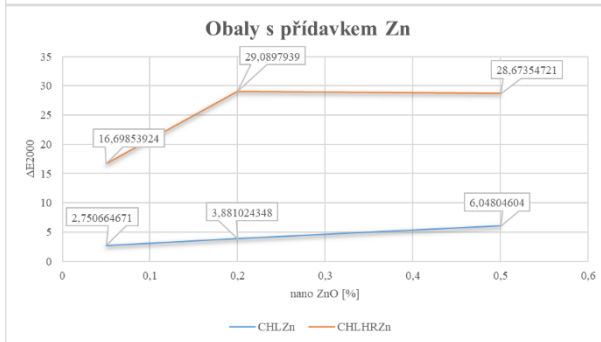
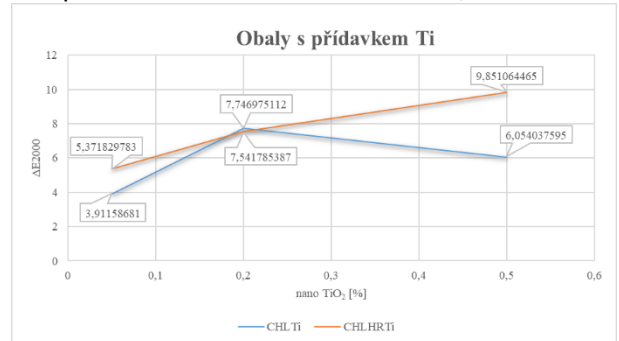
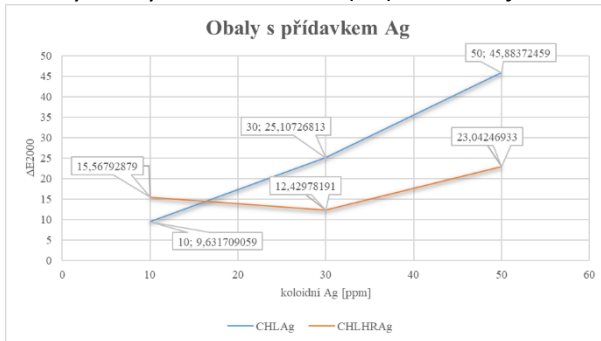


ΔE2000

Tabulka: Výsledky měření vzorků obalů s přísávkou nanočástic

Položka	Prům. červená	Prům. zelená	Prům. modrá	L	a	b	ΔL	Δa	Δb	ΔE00
CH _L Ag10	143,83±0,55	133,64±0,54	113,12±0,51	56,15±0,21	0,56±0,05	11,90±0,08	10,77±0,39	1,97±0,04	0,37±0,12	9,63±0,31
CH _L Ag30	110,03±0,48	95,45±0,43	75,02±0,30	41,36±0,18	2,66±0,02	13,44±0,09	25,56±0,42	4,08±0,03	1,91±0,15	25,11±0,36
CH _L Ag50	55,30±0,62	39,08±0,47	23,88±0,36	17,19±0,24	5,43±0,05	12,77±0,09	49,72±0,34	6,85±0,08	1,23±0,15	45,88±0,41
CH _L Ti0.05	164,82±0,70	157,12±0,67	125,25±0,80	64,66±0,25	2,20±0,12	17,12±0,24	2,25±0,35	0,79±0,12	5,58±0,19	3,91±0,13
CH _L Ti0.2	166,22±0,73	153,21±0,74	108,88±0,80	63,41±0,28	1,76±0,05	24,51±0,09	3,50±0,51	0,35±0,05	12,98±0,08	7,75±0,18
CH _L Ti0.5	168,82±0,94	154,92±0,97	117,46±1,04	64,26±0,36	0,51±0,02	20,96±0,09	2,65±0,46	0,91±0,03	9,42±0,14	6,05±0,19
CH _L Zn0.05	171,01±0,95	167,01±0,96	151,16±0,93	68,42±0,36	1,07±0,05	8,03±0,05	1,50±0,60	0,34±0,06	3,50±0,09	2,75±0,25
CH _L Zn0.2	171,05±1,01	167,63±1,06	154,53±1,15	68,66±0,39	0,82±0,08	6,52±0,09	1,75±0,46	0,59±0,09	5,02±0,10	3,88±0,17
CH _L Zn0.5	174,94±1,10	171,92±1,14	162,76±1,21	70,33±0,42	0,28±0,03	4,38±0,10	3,41±0,58	1,13±0,04	7,15±0,07	6,05±0,22
CH _{LHR} Ag10	124,01±0,82	95,30±0,66	38,65±0,42	42,26±0,28	5,33±0,12	35,58±0,16	8,37±0,44	22,15±0,20	8,33±0,38	15,57±0,17
CH _{LHR} Ag30	81,02±0,94	50,74±1,11	16,32±0,76	24,11±0,45	10,32±0,24	26,30±0,16	9,78±0,51	17,17±0,14	17,61±0,35	12,43±0,23
CH _{LHR} Ag50	42,74±0,64	19,63±0,30	5,86±0,07	9,06±0,20	10,45±0,14	11,32±0,30	24,83±0,48	17,03±0,29	32,59±0,49	23,04±0,40
CH _{LHR} Ti0.05	121,82±0,87	70,38±0,70	12,764±0,20	35,16±0,30	17,93±0,08	40,17±0,23	1,27±0,38	9,56±0,13	3,74±0,31	5,37±0,17
CH _{LHR} Ti0.2	105,42±0,74	61,32±0,58	29,70±0,40	30,62±0,26	16,42±0,05	26,91±0,11	3,27±0,61	11,07±0,20	16,99±0,42	7,54±0,27
CH _{LHR} Ti0.5	107,67±0,87	69,92±0,69	45,24±0,55	33,41±0,31	13,46±0,07	21,08±0,13	0,61±0,38	14,02±0,17	22,83±0,34	9,85±0,11
CH _{LHR} Zn0.05	145,91±0,89	103,72±0,92	25,95±0,61	47,00±0,35	10,09±0,15	46,77±0,20	13,11±0,64	17,40±0,14	2,86±0,49	16,70±0,44
CH _{LHR} Zn0.2	156,03±1,07	137,56±1,11	88,82±0,93	57,89±0,42	0,16±0,10	28,16±0,09	23,99±0,62	27,32,16	15,75±0,34	29,09±0,49
CH _{LHR} Zn0.5	126,19±0,86	124,99±0,90	110,20±0,90	52,11±0,35	2,08±0,04	7,70±0,06	18,23±0,53	29,57±0,19	36,21±0,35	28,67±0,29
CH _L	168,78±0,93	162,98±0,99	141,00±1,08	66,91±0,37	1,41±0,03	11,54±0,10				
CH _{LHR}	130,03±1,37	59,73±0,94	1,26±0,14	33,89±0,43	27,49±0,18	43,91±0,34				

Graf: Výsledky měření rozdílu (ΔE) vzorků v jednotlivých skupinách od kontrolního vzorku CH_L/CH_{LHR}



Tabulka: Výsledky Tukey-HSD testu pro ΔE u obalů CH_L/CH_{LHR}

Group	CH _L Zn0.0 5	CH _L Zn0.2	CH _L Ti0.05	CH _L Zn0.5	CH _L Ti0.5	CH _L Ti0.2	CH _L Ag10	CH _L Ag30	CH _L Ag50
CH _L Zn0.05		**	**	**	**	**	**	**	**
CH _L Zn0.2	**			**	**	**	**	**	**
CH _L Ti0.05	**			**	**	**	**	**	**
CH _L Zn0.5	**	**	**			**	**	**	**
CH _L Ti0.5	**	**	**			**	**	**	**
CH _L Ti0.2	**	**	**	**	**		**	**	**
CH _L Ag10	**	**	**	**	**	**		**	**
CH _L Ag30	**	**	**	**	**	**	**		**
CH _L Ag50	**	**	**	**	**	**	**	**	
Group	CH _{LHR} Ti0. 05	CH _{LHR} Ti0. 2	CH _{LHR} Ti0. 5	CH _{LHR} Ag3 0	CH _{LHR} Ag1 0	CH _{LHR} Zn0, 05	CH _{LHR} Ag5 0	CH _{LHR} Zn0, 5	CH _{LHR} Zn0, 2
CH _{LHR} Ti0.05		**	**	**	**	**	**	**	**
CH _{LHR} Ti0.2	**		**	**	**	**	**	**	**
CH _{LHR} Ti0.5	**	**		**	**	**	**	**	**
CH _{LHR} Ag30	**	**	**		**	**	**	**	**
CH _{LHR} Ag10	**	**	**	**		**	**	**	**
CH _{LHR} Zn0,05	**	**	**	**	**		**	**	**
CH _{LHR} Ag50	**	**	**	**	**	**		**	**
CH _{LHR} Zn0,5	**	**	**	**	**	**	**		
CH _{LHR} Zn0,2	**	**	**	**	**	**	**		
	Neporovnávají se								
	Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi vzorky								

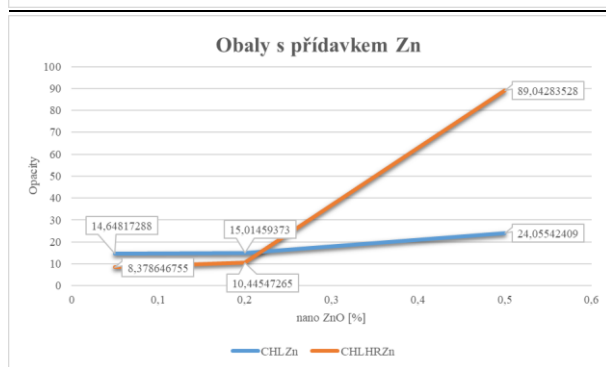
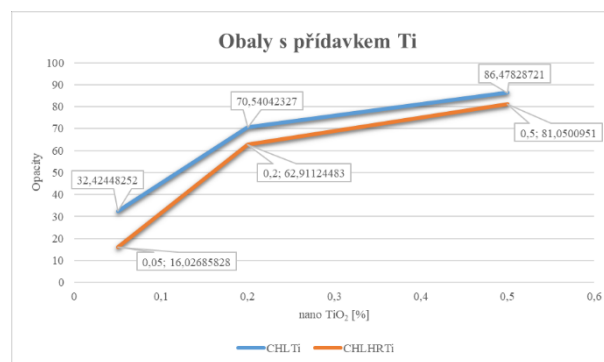
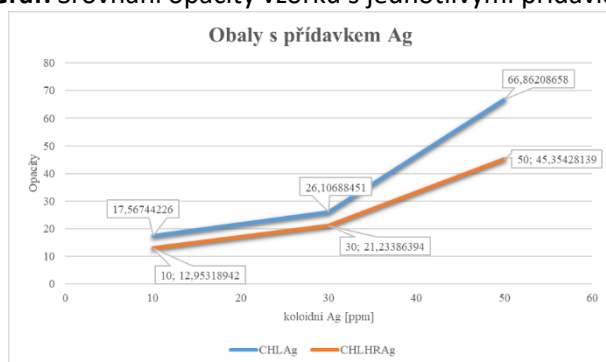
Při srovnávání výsledků měření a vypočítaného parametru ΔE byl prokázán statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$). Pouze mezi vzorky CH_LTi0.05 a CH_LZn0.2, mezi vzorky CH_LTi0,5 a CH_LZn0,5 a mezi CH_{LHR}Zn0,2 a CH_{LHR}Zn0,5 statisticky významný rozdíl nebyl prokázán. Se zvyšováním koncentrace jednotlivých přísad se také zvyšoval rozdíl (ΔE) mezi vzorky a kontrolním vzorkem bez přísady.

Opacity

Tabulka: Výsledky měření opacity vzorků obalů s přidávkou nanočástic

Vzorek	Opacity [%]	Vzorek	Opacity [%]
CH _L	14,13±0,55	CH _{LHR}	7,59±0,20
CH _L Ag10	17,56±0,37	CH _{LHR} Ag10	12,95±0,13
CH _L Ag30	26,11±0,47	CH _{LHR} Ag30	21,23±1,03
CH _L Ag50	66,86±1,67	CH _{LHR} Ag50	45,352±1,27
CH _L Ti0,05	32,42±0,32	CH _{LHR} Ti0,05	16,03±0,35
CH _L Ti0,2	70,54±0,49	CH _{LHR} Ti0,2	62,91±1,01
CH _L Ti0,5	86,48±0,85	CH _{LHR} Ti0,5	81,055±0,96
CH _L Zn0,05	14,65±0,22	CH _{LHR} Zn0,05	8,3796±0,176
CH _L Zn0,2	15,01±0,29	CH _{LHR} Zn0,2	10,45±0,20
CH _L Zn0,5	24,06±0,76	CH _{LHR} Zn0,5	89,04±0,82

Graf: Srovnání opacity vzorků s jednotlivými přidávkami



Tabulka: Výsledky Tukey-HSD testu pro opacity u obalů CH_L/CH_{LHR}

Group	CH _L	CH _L Zn0,05	CH _L Zn0,2	CH _L Ag10	CH _L Zn0,5	CH _L Ag30	CH _L Ti0,05	CH _L Ag50	CH _L Ti0,2	CH _L Ti0,5
CH _L				**	**	**	**	**	**	**
CH _L Zn0,05				**	**	**	**	**	**	**
CH _L Zn0,2				**	**	**	**	**	**	**
CH _L Ag10	**	**	**		**	**	**	**	**	**
CH _L Zn0,5	**	**	**	**		**	**	**	**	**
CH _L Ag30	**	**	**	**	**		**	**	**	**
CH _L Ti0,05	**	**	**	**	**	**		**	**	**
CH _L Ag50	**	**	**	**	**	**	**		**	**
CH _L Ti0,2	**	**	**	**	**	**	**	**		**
CH _L Ti0,5	**	**	**	**	**	**	**	**	**	
Group	CH _{LHR}	CH _{LHR} Zn0,05	CH _{LHR} Zn0,2	CH _{LHR} Ag10	CH _{LHR} Ti0,05	CH _{LHR} Ag30	CH _{LHR} Ag50	CH _{LHR} Ti0,2	CH _{LHR} Ti0,5	CH _{LHR} Zn0,5
CH _{LHR}			**	**	**	**	**	**	**	**
CH _{LHR} Zn0,05			**	**	**	**	**	**	**	**
CH _{LHR} Zn0,2	**	**		**	**	**	**	**	**	**
CH _{LHR} Ag10	**	**	**		**	**	**	**	**	**
CH _{LHR} Ti0,05	**	**	**	**		**	**	**	**	**
CH _{LHR} Ag30	**	**	**	**	**		**	**	**	**
CH _{LHR} Ag50	**	**	**	**	**	**		**	**	**
CH _{LHR} Ti0,2	**	**	**	**	**	**	**		**	**
CH _{LHR} Ti0,5	**	**	**	**	**	**	**	**		**
CH _{LHR} Zn0,5	**	**	**	**	**	**	**	**	**	
	Neporovnávají se									
	Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi vzorky									

Při hodnocení průhlednosti obalů, která se získala výpočtem z hodnoty L získané ze snímků na bílém a černém pozadí.

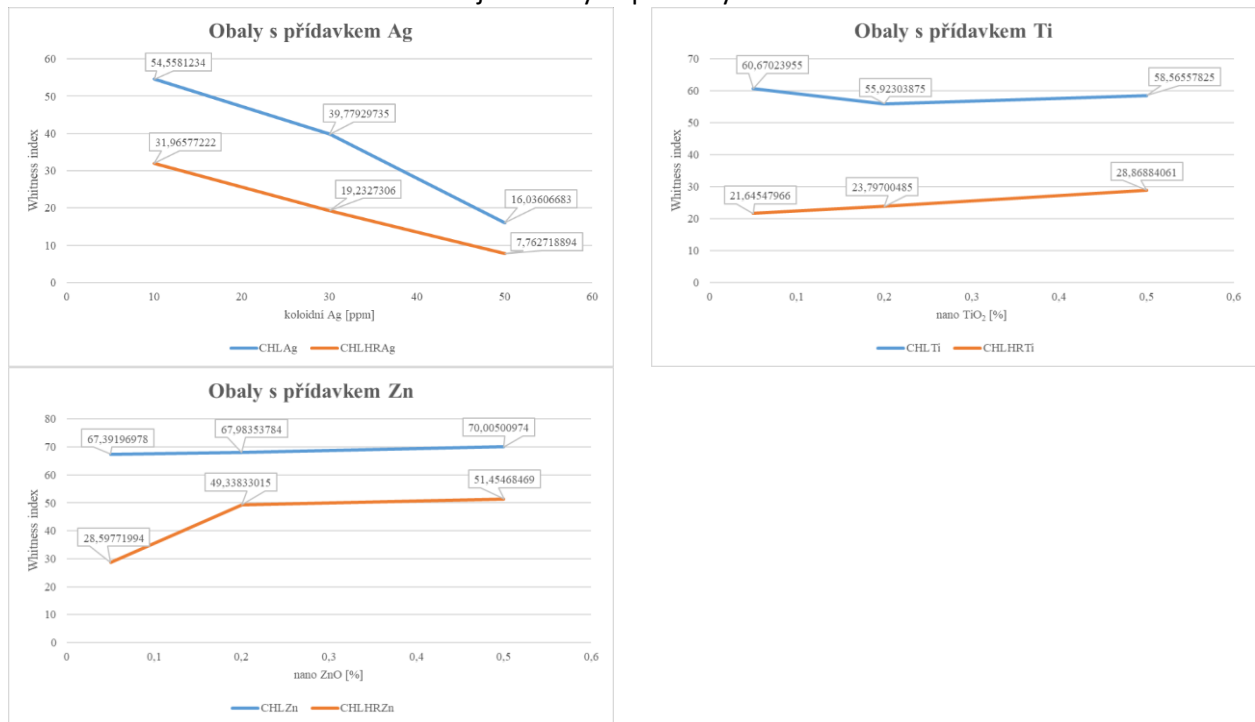
Nejnižší hodnot opacity dosáhly kontrolní vzorky (CH_L/CH_{LHR}). Všechny ostatní vzorky měly vyšší hodnotu, která se zvyšující koncentrací stoupala. Z toho vyplývá, že byly vzorky méně průhledné. Mezi vzorky byl prokázán statisticky významný rozdíl, pouze mezi vzorkem CH_LZn0,05, CH_LZn0,2 a CH_L, mezi vzorkem CH_LZn0,05 a CH_LZn0,2 a mezi vzorkem CH_{LHR}Zn0,05 a CH_{LHR} (kontrola) nebyl prokázán.

Whitness index

Tabulka: Výsledky měření Whitness indexu vzorků obalů s přísádky nanočástic

Vzorek	Whitness index	Vzorek	Whitness index
CH _L	64,93±0,37	CH _{LHR}	16,01±0,16
CH _L Ag10	54,56±0,20	CH _{LHR} Ag10	31,97±0,17
CH _L Ag30	39,78±0,16	CH _{LHR} Ag30	19,02±0,42
CH _L Ag50	16,04±0,22	CH _{LHR} Ag50	7,76±0,14
CH _L Ti0,05	60,67±0,26	CH _{LHR} Ti0,05	21,65±0,13
CH _L Ti0,2	55,92±0,26	CH _{LHR} Ti0,2	23,80±0,20
CH _L Ti0,5	58,57±0,35	CH _{LHR} Ti0,5	28,87±0,26
CH _L Zn0,05	67,39±0,34	CH _{LHR} Zn0,05	28,60±0,20
CH _L Zn0,2	67,98±0,40	CH _{LHR} Zn0,2	49,34±0,32
CH _L Zn0,5	70,01±0,42	CH _{LHR} Zn0,5	51,45±0,35

Graf: Srovnání Whitness indexu vzorků s jednotlivými přísádky



Tabulka: Výsledky Tukey-HSD testu pro Whittness index u obalů CH_L/CH_{LHR}

Group	CHLAg50	CHLAg30	CHLAg10	CHLTi0.2	CHLTi0.5	CHLTi0.05	CHL	CHLZn0.05	CHLZn0.2	CHLZn0.5
CHLAg50		**	**	**	**	**	**	**	**	**
CHLAg30	**		**	**	**	**	**	**	**	**
CHLAg10	**	**		**	**	**	**	**	**	**
CHLTi0.2	**	**	**		**	**	**	**	**	**
CHLTi0.5	**	**	**	**		**	**	**	**	**
CHLTi0.05	**	**	**	**	**		**	**	**	**
CHL	**	**	**	**	**	**		**	**	**
CHLZn0.05	**	**	**	**	**	**	**		**	**
CHLZn0.2	**	**	**	**	**	**	**	**		**
CHLZn0.5	**	**	**	**	**	**	**	**	**	
Group	CHLHRAg50	CHLHR	CHLHRAg30	CHLHRTi0.05	CHLHRTi0.2	CHLHRZn0.05	CHLHRTi0.5	CHLHRAg10	CHLHRZn0.2	CHLHRZn0.5
CHLHRAg50		**	**	**	**	**	**	**	**	**
CHLHR	**		**	**	**	**	**	**	**	**
CHLHRAg30	**	**		**	**	**	**	**	**	**
CHLHRTi0.05	**	**	**		**	**	**	**	**	**
CHLHRTi0.2	**	**	**	**		**	**	**	**	**
CHLHRZn0.05	**	**	**	**	**		**	**	**	**
CHLHRTi0.5	**	**	**	**	**	**		**	**	**
CHLHRAg10	**	**	**	**	**	**	**		**	**
CHLHRZn0.2	**	**	**	**	**	**	**	**		**
CHLHRZn0.5	**	**	**	**	**	**	**	**	**	
	Neporovnávají se									
	Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi vzorky									

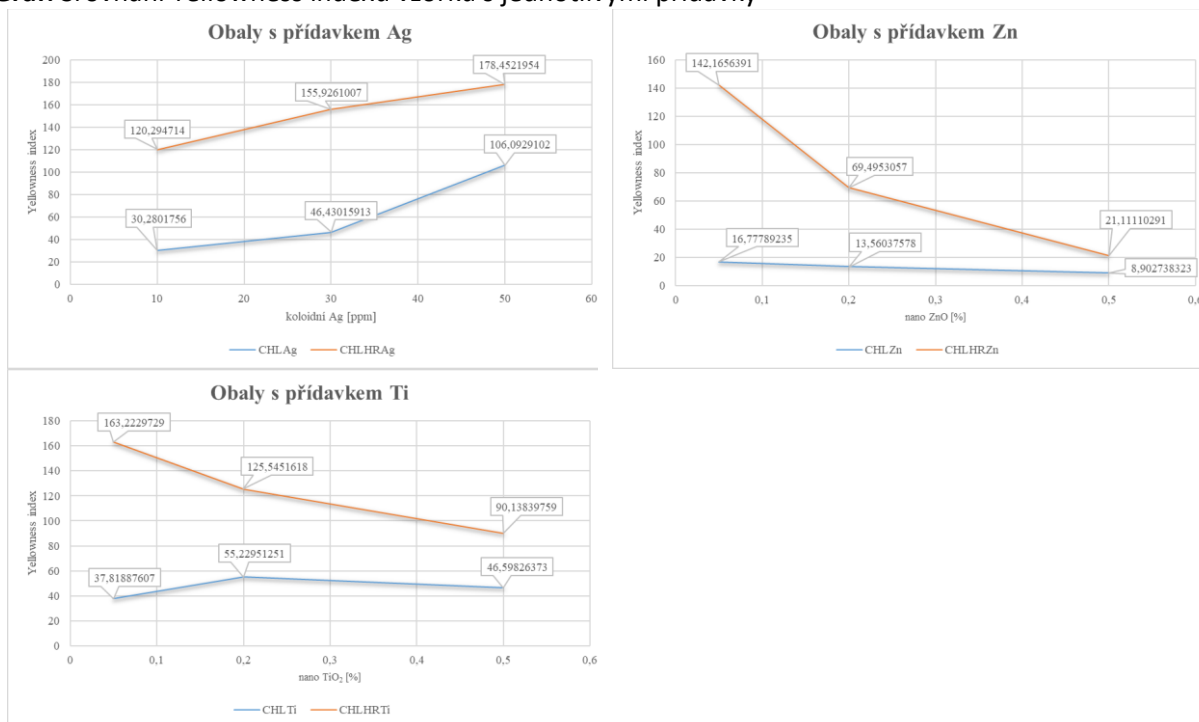
Vzorky obsahující 10% hroznový přídatek měly Whittness index nižší. Li et al. (2019) ve své studii uvádí, že snížení bělosti je pravděpodobně způsobeno tvorbou tmavých sloučenin vznikajících během Maillardovy reakce. Mezi vzorky byl prokázán statisticky významný rozdíl, pouze mezi vzorkem CH_{LHR}Ti0.5 a vzorkem CH_{LHR}Zn0.05 nebyl prokázán. Vzorky s přidavkem hroznového extraktu měli tento index nižší než vzorky bez přídatku.

Yellowness index

Tabulka: Výsledky měření Yellowness indexu vzorků obalů s přidavky nanočástic

Položka	Yellowness index	Položka	Yellowness index
CH _L	24,63±0,32	CH _{LHR}	185,12±0,96
CH _L Ag10	30,28±0,21	CH _{LHR} Ag10	120,29±0,45
CH _L Ag30	46,43±0,16	CH _{LHR} Ag30	155,93±2,38
CH _L Ag50	106,09±0,87	CH _{LHR} Ag50	178,45±0,99
CH _L Ti0,05	37,82±0,56	CH _{LHR} Ti0,05	163,23±0,47
CH _L Ti0,2	55,23±0,40	CH _{LHR} Ti0,2	125,55±0,59
CH _L Ti0,5	46,60±0,45	CH _{LHR} Ti0,5	90,14±0,60
CH _L Zn0,05	16,78±0,14	CH _{LHR} Zn0,05	142,17±0,70
CH _L Zn0,2	13,56±0,25	CH _{LHR} Zn0,2	69,50±0,42
CH _L Zn0,5	8,90±0,22	CH _{LHR} Zn0,5	21,11±0,25

Graf: Srovnání Yellowness indexu vzorků s jednotlivými přidavky



Tabulka: Výsledky Tukey-HSD testu pro Yellowness index u obalů CH_L/CH_{LHR}

Group	CH _L Zn0.5	CH _L Zn0.2	CH _L Zn0.05	CH _L	CH _L Ag10	CH _L Ti0.05	CH _L Ag30	CH _L Ti0.5	CH _L Ti0.2	CH _L Ag50
CH _L Zn0.5		**	**	**	**	**	**	**	**	**
CH _L Zn0.2	**		**	**	**	**	**	**	**	**
CH _L Zn0.05	**	**		**	**	**	**	**	**	**
CH _L	**	**	**		**	**	**	**	**	**
CH _L Ag10	**	**	**	**		**	**	**	**	**
CH _L Ti0.05	**	**	**	**	**		**	**	**	**
CH _L Ag30	**	**	**	**	**	**		**	**	**
CH _L Ti0.5	**	**	**	**	**	**	**		**	**
CH _L Ti0.2	**	**	**	**	**	**	**	**		**
CH _L Ag50	**	**	**	**	**	**	**	**	**	
Group	CH _{LHR} Zn0.5	CH _{LHR} Zn0.2	CH _{LHR} Ti0.5	CH _{LHR} Ag10	CH _{LHR} Ti0.2	CH _{LHR} Zn0.05	CH _{LHR} Ag30	CH _{LHR} Ti0.05	CH _{LHR} Ag50	CH _{LHR}
CH _{LHR} Zn0.5		**	**	**	**	**	**	**	**	**
CH _{LHR} Zn0.2	**		**	**	**	**	**	**	**	**
CH _{LHR} Ti0.5	**	**		**	**	**	**	**	**	**
CH _{LHR} Ag10	**	**	**		**	**	**	**	**	**
CH _{LHR} Ti0.2	**	**	**	**		**	**	**	**	**
CH _{LHR} Zn0.05	**	**	**	**	**		**	**	**	**
CH _{LHR} Ag30	**	**	**	**	**	**		**	**	**
CH _{LHR} Ti0.05	**	**	**	**	**	**	**		**	**
CH _{LHR} Ag50	**	**	**	**	**	**	**	**		**
CH _{LHR}	**	**	**	**	**	**	**	**	**	
	Neporovnávají se									
	Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi vzorky (p<0,01)									

Mezi vzorky byl prokázán statisticky významný rozdíl, pouze mezi vzorkem CHLTi0,5 a CHLAg30 nebyl prokázán. Vzorky s přidavkem hroznového extraktu měli index žlutosti vyšší než vzorky bez tohoto přídatku.

Diskuse

U vzorků s přidavkem stříbra došlo oproti kontrolním vzorkům (CH_L a CH_{LHR}) ke snížení parametru L, naopak u parametrů a* a b* došlo ke zvýšení (v závislosti na přidané koncentraci). Také byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi kontrolními vzorky a vzorky s přidavky stříbra (ΔE). Průhlednost obalů se se zvyšujícími koncentracemi snižovala. Stejně se také snižoval index bělosti. Výsledky ukazují, že ve vzorcích s přidavkem Ag byla snížena průhlednost a bělost. Snížení jasu (L) lze navíc připsat neprůhlednosti nanočástic stříbra (Bahrami et al., 2019). Dle studie Rhima et al. (2013), který sledoval vliv přídatků nanočástic stříbra se zvyšuje parametr ΔE a mění se barva obalů až na tmavě hnědou v závislosti na koncentraci nanočástic stříbra. V naší studii jsme dosáhly obdobných výsledků.

U vzorků obalů s přísávkem nanočástic TiO₂ se ΔE zvyšovala a whiteness index se také díky jejich přítomnosti zvýšil, to odpovídá výsledkům obdobné studie Dashe et al. (2019). Obaly obsahující TiO₂ by měly mít se zvyšující se koncentrací také vyšší parametr L, b*, ΔE i Whiteness index (Hou et al., 2019). V naší studii jsme dosáhly obdobných výsledků.

Wardana et al. (2018) ve studii uvádí, že se zvyšování přísávku nanočástic ZnO se zvyšuje ΔE, čemuž odpovídají naše výsledky.

Literatura

- Acevedo, Cristian A., et al. "Using RGB image processing for designing an alginate edible film." *Food and Bioprocess Technology* 5.5 (2012): 1511-1520.
- Bahrami, A., Mokarram, R. R., Khiabani, M. S., Ghanbarzadeh, B., & Salehi, R. (2019). Physico-mechanical and antimicrobial properties of tragacanth/hydroxypropyl methylcellulose/beeswax edible films reinforced with silver nanoparticles. *International journal of biological macromolecules*, 129, 1103-1112.
- Bumbudsanpharoke, N., & Ko, S. (2015). Nano-Food Packaging: An overview of market, migration research, and safety regulations. *Journal of food science*, 80(5), R910-R923.
- Dash, K. K., Ali, N. A., Das, D., & Mohanta, D. (2019). Thorough evaluation of sweet potato starch and lemon-waste pectin based-edible films with nano-titania inclusions for food packaging applications. *International journal of biological macromolecules*, 139, 449-458.
- Hou, X., Xue, Z., Liu, J., Yan, M., Xia, Y., & Ma, Z. (2019). Characterization and property investigation of novel eco-friendly agar/carrageenan/TiO₂ nanocomposite films. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(10), 47113.
- Li, C., Wang, L., & Xue, F. (2019). Effects of Conjugation between Proteins and Polysaccharides on the Physical Properties of Emulsion-Based Edible Films. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 96(11), 1249-1263.
- Luo, M. R., Cui, G., & Rigg, B. (2001). The development of the CIE 2000 colour-difference formula: CIEDE2000. *Color Research & Application: Endorsed by Inter-Society Color Council, The Colour Group (Great Britain), Canadian Society for Color, Color Science Association of Japan, Dutch Society for the Study of Color, The Swedish Colour Centre Foundation, Colour Society of Australia, Centre Français de la Couleur*, 26(5), 340-350.
- Navarro, R., Arancibia, C., Herrera, M. L., & Matiacevich, S. (2016). Effect of type of encapsulating agent on physical properties of edible films based on alginate and thyme oil. *Food and Bioprocess Processing*, 97, 63-75.
- Rhim, J. W., Wang, L. F., & Hong, S. I. (2013). Preparation and characterization of agar/silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 327-335.
- Saberi, B., Thakur, R., Vuong, Q. V., Chockchaisawasdee, S., Golding, J. B., Scarlett, C. J., & Stathopoulos, C. E. (2016). Optimization of physical and optical properties of biodegradable edible films based on pea starch and guar gum. *Industrial Crops and Products*, 86, 342-352.
- Sharma, G. (2017). *Color fundamentals for digital imaging*. In *Digital color imaging handbook* (pp. 1-114). CRC press.
- Wardana, A. A., Suyatma, N. E., Muchtadi, T. R., & Yuliani, S. (2018). Influence of ZnO nanoparticles and stearic acid on physical, mechanical and structural properties of cassava starch-based bionanocomposite edible films. *International Food Research Journal*, 25(5).

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2021
(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu: 2021ITA25

2. Název projektu:

Vybrané mikrobiologické aspekty zdravotní nezávadnosti a kvality potravin a pokrmů

3. Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

Fakulta/celoškolské pracoviště: Fakulta veterinární hygieny a ekologie

E-mail: bursovas@vfu.cz

Telefon: 541 562 710, 739 034 507

4. Řešitelský kolektiv:

složení řešitelského týmu: (akademickí pracovníci a jejich příslušnost k ústavům nebo klinikám fakulty nebo výzkumným skupinám CEITEC, studenti DSP) a forma zapojení každého člena řešitelského týmu

doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; hlavní řešitelka – koncepce a koordinace projektu a dílčích aktivit, kontrola splnění požadavků schváleného návrhu projektu, odpovědnost za čerpání finančních prostředků, příprava rešeršního (mikrobiologicko-biochemického) zázemí pro sepsání publikace, mikrobiologické vyšetření, analýza a statistické hodnocení získaných výsledků, příprava publikace (Aktivita 1), vypracování Závěrečné zprávy projektu o řešení projektu a účast na obhajobě projektu v rámci obhajob projektů ITA VETUNI

doc. MVDr. Hana Buchtová, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitelka – koncepce a koordinace Aktivita 1, odpovědnost za čerpání finančních prostředků, zajištění a příprava vzorků, chemické laboratorní vyšetření, analýza a statistické hodnocení získaných výsledků, příprava publikace (Aktivita 1)

Ing. Fouad Ali Abdullah Abdullah, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitel – zajištění a příprava vzorků, chemické laboratorní vyšetření, analýza a statistické hodnocení získaných výsledků, příprava publikace (Aktivita 1)

Ing. Klára Bartáková, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitelka – laboratorní stanovení pH a aktivity vody, analýza a statistické hodnocení získaných výsledků, příprava publikace (Aktivita 1)

doc. MVDr. Lenka Necedová, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, úvazek 1,0; spoluřešitelka – příprava rešeršního (mikrobiologicko-biochemického) zázemí pro sepsání publikace, mikrobiologické vyšetření, analýza a statistické hodnocení získaných výsledků, příprava publikace (Aktivita 1)

MVDr. Navrátilová P., Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitelka – koncepce a koordinace Aktivita 2, odpovědnost za čerpání finančních prostředků, podíl na praktické realizaci projektové metodiky, analýza získaných výsledků, podíl na realizaci publikace (Aktivita 2)

MVDr. Štástková Zora, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 0,5; spoluřešitelka – podíl na praktické realizaci projektové metodiky, analýza získaných výsledků, podíl na realizaci publikace (Aktivita 2)

MVDr. Bednářová Ivana, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 0,75; spoluřešitelka – podíl na praktické realizaci projektové metodiky, analýza získaných výsledků, podíl na realizaci publikace (Aktivita 2)

prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitelka – příprava rešeršního zázemí pro připravovanou publikaci, podíl na realizaci publikace (Aktivita 2)

doc. MVDr. Josef Kameník, CSc., MBA, akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitel – koncepce a koordinace Aktivity 3, odpovědnost za čerpání finančních prostředků, odběr vzorků, komunikace s dodavateli vzorků, podíl na realizaci publikace (Aktivita 3)

Mgr. Marta Dušková, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitelka – analýza vzorků, identifikace izolátů, charakterizace izolovaných kmenů bakterií, molekulárně-biologické analýzy, podíl na realizaci publikace (Aktivita 3)

MVDr. Helena Veselá, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 0,5; spoluřešitelka – mikrobiologická analýza vzorků, podíl na realizaci publikace (Aktivita 3)

Mgr. Kateřina Dorotíková, student DSP FVHE VETUNI – prezenční forma, 4. rok studia, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE; spoluřešitelka – analýza vzorků, identifikace izolátů, charakterizace izolovaných kmenů bakterií, molekulárně-biologické analýzy, podíl na realizaci publikace (Aktivita 3), výběr a příprava referenčních kmenů a izolátů z pokrmů pro validaci esejí, příprava publikací (Aktivita 4)

Mgr. Petra Furmančíková, student DSP FVHE VETUNI – prezenční forma, 3. rok studia, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE; spoluřešitelka – mikrobiologická analýza vzorků, podíl na realizaci publikace (Aktivita 3)

Mgr. Radka Hulánková, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitelka – koncepce a koordinace Aktivity 4, odpovědnost za čerpání finančních prostředků, analýza a vyhodnocování výsledků, statistická analýza výsledků, zpracování výsledků, příprava a kontrola publikací (Aktivita 4)

Ing. Michaela Nesvadbová, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 1,0; spoluřešitelka – koordinace úkolu, příprava molekulárně-genetických esejí, analýza a vyhodnocování výsledků, příprava publikací (Aktivita 4)

MVDr. Irena Svobodová, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, úvazek 0,5; spoluřešitelka – zpracování výsledků, příprava a kontrola publikací (Aktivita 4)

5. V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu:

Projekt byl řešen na Ústavu hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie Fakulty veterinární hygieny a ekologie Veterinární univerzity Brno.

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Předmětem řešení projektu byla problematika zdravotní nezávadnosti a kvality potravin a pokrmů živočišného původu, která je vysoce aktuálním tématem spojeným nejen se změnami životního stylu obyvatel, změnami ve stravovacích návycích a způsobech stravování, ale také s globalizací potravinového řetězce. Náplň projektu plně odpovídala výzkumnému zaměření Ústavu hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie a naplňovala jednu ze stanovených priorit soutěže – problematika zdravotní nezávadnosti, hygieny a technologie potravin.

Projekt navazoval na předchozí úspěšně řešené projekty. Realizované dílčí aktivity obsahově naplňovaly výzkumné zaměření Sekce hygieny a technologie potravin a stanovené priority výzkumu na FVHE VETUNI, a to zejména co se týče problematiky zdravotní nezávadnosti, hygieny a kvality potravin a výzkumu patogenních agens a původců alimentárních onemocnění v potravinách. Realizovaný výzkum byl také plně v souladu s národními prioritami orientovaného výzkumu, které identifikují oblast bezpečnosti potravin jako jednu z klíčových priorit výzkumu EU a ČR.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Cílem projektu bylo posouzení vybraných mikrobiologických parametrů v kontextu zajištění zdravotní nezávadnosti a kvality potravin a pokrmů živočišného původu. U ready-to-eat pokrmu – marinovaný a kořeněný losos Gravad lax, byla sledována dynamika růstu *Listeria monocytogenes* a doprovodné mikroflóry a změn relevantních fyzikálně chemických parametrů po ošetření ochranným biologicky účinným přípravkem SafePro®NovaLox, a to v závislosti na podmínkách skladování. Zjišťována byla také četnost výskytu bakterie *Helicobacter pylori* ve vzorcích nebovinných mlék pomocí metody Nested-PCR. Dalším dílčím cílem byla charakterizace skupin bakterií zodpovědných za kažení tepelně opracovaných potravin, a to se záměrem navrhnout preventivní a nápravná opatření pro výrobce za účelem zvýšení kvality a bezpečnosti finálních produktů. Posledním dílčím cílem byl vývoj, zavedení a optimalizace TaqMan real-time PCR eseje pro detekci a kvantifikaci významného původce alimentárních onemocnění *Bacillus cereus* a jeho faktorů virulence.

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany):

Aktivita 1: Vliv potravinářské kultury, marinovacího a kořenícího přípravku na mikrobiální profil filetu lososa

Připravené kontrolní (čerstvý filet) a experimentální vzorky (filet marinovaný: sůl 13,33 %, cukr 13,33 % kopr 3,33 %; filet marinovaný s přísadkou 0,2 % SafePro®NovaLox) byly inkubovány při teplotách 35, 30, 25, 20, 15 a 10 °C po dobu 0, 3, 6 a 9 hodin (simulace možné manipulace s filety v prostředí společenských akcí pořádaných v různých ročních obdobích). Vzorky byly připraveny vždy ve 3 paralelách. Vliv teploty a doby skladování byl hodnocen na základě mikrobiologického vyšetření (počet *Listeria monocytogenes*, počet mezofilních bakterií mléčného kvašení) a fyzikálně chemických analýz (aw, pH, celkové těkavé dusíkaté báze TVBN, antioxidační kapacita, volné mastné kyseliny v % celkových lipidů jako kyselina olejová, obsah malondialdehydu TBARS). Výsledky analýz byly zpracovány (průměr ± SD) a statisticky vyhodnoceny (Unistat 6.0 a Statistica verze 13).

Aktivita 2: Stanovení výskytu *Helicobacter pylori* v nebovinných druzích mlék

Vlastní odběry mléka zahrnovaly individuální vzorky nebovinných druhů mlék (mléko kozí n = 45 a ovčí n = 119). Vzorek (2-3 stříky mléka z každého struku) byl odebrán do sterilní vzorkovnice před dojením po odstříknutí prvních stříků. Vzorky byly přepravovány a skladovány při teplotě 4-6 °C a v laboratoři vyšetřeny nejpozději do 24 hodin po odběru. Z mléka byla přímo vyextrahována DNA pomocí QIAamp® DNA Blood Mini Kitu (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Přítomnost *H. pylori* ve vzorcích byla potvrzena detekcí genu *glmM* metodou Nested-PCR, která se primárně používá v případech, kdy je vstupní množství DNA velmi malé. Pro zvýšení specificity se u této reakce využívají dva páry primerů (jeden pár vnějších primerů a jeden pár vnitřních primerů). Vnitřní

primery nasedají na sekvenci, která je ohraničena vnějšími primery. Nejprve se provede reakce s vnějšími páry primerů a vzniklý produkt je využit jako templát pro reakci s vnitřními primery. Tím se zvýší pravděpodobnost amplifikace pouze daného specifického úseku. Metoda umožňuje zachytit i kokoidní nekultivovatelnou formu bakterie.

Aktivita 3: Vliv bakteriální kontaminace surovin na bezpečnost a údržnost potravin po tepelné úpravě

V provozních dílnách zvoleného průmyslového zpracovatele masa bylo uskutečněno 5 odběrů vzorků, které zahrnovaly vrchní šály z vepřové kýty. Následující den byly odebrány vzorky identické šarže masa, ale po provedeném nástřiku láku a vymasírování v tumblerech. Po dalších 3 dnech byly odebrány vzorky finálních dušených šunek připravených z mas vzorkovaných v předešlých dnech. Šunky ze třetího odběru a šest dalších vzorků šunek z jiné šarže byly po odběru dílčích vzorků na bakteriologické vyšetření vakuově zabaleny a inkubovány v termostatu při 15 °C po dobu 7 dnů. Následně byly vzorky šunek podrobeny bakteriologické analýze. U odebraných vzorků byl stanoven celkový počet aerobních mikroorganismů (CPM), počet bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* a bakterií mléčného kvašení (BMK). Vzhledem k charakteru odebraných vzorků byly živné půdy inkubovány při 6,5 °C/12 dnů (CPM a BMK), 6,5 °C/6 dnů (*Enterobacteriaceae*), 15 °C/6 dnů (CPM a BMK) a 15 °C/3 dny (*Enterobacteriaceae*). V případě vzorků vakuově balených šunek podrobených termostátové zkoušce (inkubace vzorků 7 dní při 15 °C) byly naočkované Petriho misky inkubovány pouze při teplotě 15 °C. Izoláty BMK byly druhově identifikovány pomocí metody MALDI TOF-MS.

Aktivita 4: Real-time PCR identifikace a detekce *Bacillus cereus* a jeho faktorů virulence v potravinách

Metodicky byl dílčí úkol založen na využití technologie TaqMan real-time PCR. Na základě *in silico* analýzy genomu *B. cereus* bylo vybráno několik vhodných genetických markerů pro samotnou druhovou identifikaci daného patogenu a jeho faktorů virulence. Primery a TaqMan sondy byly navrženy pomocí programu OLIGO 7 primer analysis software. Byla získána a extrahována DNA ze 6 referenčních kmenů *B. cereus* s různým toxigenním profilem, z referenčních kmenů *B. cereus sensu lato* (*B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus*) a dalších zástupců rodu *Bacillus*. Dále byla pro ověření použita DNA z potravinových izolátů ze sbírky ústavu. DNA vzorků byla extrahována pomocí NucleoSpin Microbial DNA Mini kit (MACHEREY-NAGEL) dle obvyklého protokolu výrobce. Analýza vzorků byla provedena pomocí přístroje pro real-time PCR Rotor-Gene Q (Qiagen). Byly optimalizovány reakční podmínky multiplexních esejí a byl testován vhodný poměr reakčních komponent včetně koncentrace primerů a TaqMan sond. V rámci vývoje multiplexní diagnostické soupravy byla provedena analýza exkluzivity a inkluzivity navržených esejí. Ještě bude stanoven limit detekce (LOD) reakcí a vyvinuté diagnostické postupy budou použity ke genotypizaci izolátů ze sbírky Ústavu hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, u nichž již byla provedena částečná toxintypizace za použití multiplexní PCR.

Dosažené výsledky projektu (max. 1/2 strany):

Aktivita 1: Vliv potravinářské kultury, marinovacího a kořenícího přípravku na mikrobiální profil filetu lososa

Počet *Listeria monocytogenes* ve filetech lososa byl ovlivněn způsobem úpravy, teplotou i délkou skladování (faktorová ANOVA, vliv úpravy: $F(2,180) = 337,892$, $P < 0,001$; vliv teploty: $F(5,180) = 15,349$, $P < 0,001$; vliv délky kultivace: $F(4,180) = 5,171$, $P = 0,001$). V čerstvých filetech se při teplotách 10, 15 a 20 °C počet *L. monocytogenes* při různé délce kultivace nezměnil, při vyšších teplotách (25, 30 a 35 °C) došlo v průběhu 9 hodin skladování ke statisticky významnému zvýšení a to přibližně o 2 řády. V marinovaných filetech zůstalo množství *L. monocytogenes* v podstatě konstantní, mírný pokles počtu v čase byl při teplotách 25 °C a 35 °C statisticky významný. U vzorků marinovaných filetů s přidavkem ochranné kultury byl zaznamenán statisticky významný pokles počtu *L. monocytogenes*, který byl výraznější při vyšší teplotě skladování (25, 30 a 35 °C). Souhrnně lze konstatovat, že významné rozdíly v počtu *L. monocytogenes* u čerstvých a marinovaných filetů byly zaznamenány při vyšších teplotách skladování a delší době skladování. Proces marinování má

tedy významný vliv na omezení růstu a množení *L. monocytogenes* v rybích filetech. Tento vliv byl ještě umocněn přidávkem ochranné kultury. V čerstvých filetech nebyly zaznamenány výraznější změny v hodnotě pH či aktivity vody, marinování se naopak projevilo poklesem těchto hodnot.

Ve srovnání s kontrolou (čerstvý fileť) byla hmotnost filetů marinovaných úpravou Gravad lax nižší následkem uvolnění obsahu masové šťávy. Výtěžnost marinovaného filetu ($90,33 \pm 0,96$ %) byla ve srovnání s filetem s NovaLoxem ($85,03 \pm 1,91$ %) průkazně ($P < 0,05$) vyšší. Rozdíly hodnot obsahu TVBN v závislosti na úpravě filetů marinováním, teplotě a době inkubace nebyly zjištěny ($P > 0,05$), hodnoty parametru hodnotícího stabilitu/labilitu proteolytických procesů byly poměrně stabilní u všech hodnocených vzorků a pohybovaly se v rozmezí 17 až 21 mg N/100 g. Intenzita lipolytických procesů byla všemi inkubačními teplotami a zejména prodlužující se dobou inkubace negativně ovlivněna u všech vzorků. Nejvýraznější zvyšování hodnot volných mastných kyselin v % celkových lipidů jako kyseliny olejové v závislosti na době skladování byl pozorován u kontrolních vzorků při působení teplot nad 15 °C. Marinováním byly tyto procesy spíše inhibovány, a to výrazněji u marinovaných filetů s NovaLoxem. Oxidace tuků probíhala v opačném trendu. Při teplotách inkubace nad 15 °C se jako stabilnější jevil tuk obsažený v čerstvých filetech ve srovnání s filety marinovanými, u kterých byly zjišťovány průkazně ($p < 0,05$) vyšší hodnoty obsahu malondialdehydu. Jednoznačně nejvýrazněji se podmínky experimentu u všech vzorků projevíly na hodnotách antioxidační kapacity, kdy výrazně vyšší hodnoty % inhibice ve srovnání s kontrolou byly zjišťovány u marinovaných filetů bez ohledu na teplotu a délku inkubace vzorků.

Aktivita 2: Stanovení výskytu *Helicobacter pylori* v nebovinných druzích mlék

Individuální vzorky mléka byly odebírány na farmách zaměřených na chov ovcí a koz s produkcí mléka. Vzorky byly získány celkem ze sedmi farem, 3 farmy se nacházely na území Jihomoravského kraje, 1 farma v kraji Vysočina, 2 farmy ve Zlínském kraji a 1 farma v Jihočeském kraji. Celkem bylo odebráno 164 individuálních vzorků mléka, z toho 45 vzorků kozího mléka a 119 vzorků ovčího mléka. Mezi jednotlivými farmami byly velké rozdíly v počtu pozitivních vzorků (7,7 až 88,9 %). Souhrnně lze konstatovat, že pozitivní záchyt *H. pylori* byl zjištěn u každého čtvrtého odebraného vzorku mléka (kozí mléko 11 vzorků, tj. 24,4 %; ovčí mléko 33 vzorků, tj. 27,7 %; celkem 44 pozitivních vzorků, tj. 26,8 %).

Aktivita 3: Vliv bakteriální kontaminace surovin na bezpečnost a údržnost potravin po tepelné úpravě

Celkem bylo mikrobiologicky vyšetřeno 50 dílčích vzorků masa, 50 dílčích vzorků vymasírovaného masa a 50 dílčích vzorků dušených šunek. Celkový počet aerobních mikroorganismů byl stanoven při 6,5 a 15 °C. Při porovnání výsledků zjištěných u vzorků masa a vymasírovaného masa bylo zaznamenáno statisticky významné zvýšení průměrného CPM o přibližně 1 logaritický řád (6,5 °C: z 3,18 na 4,11 log KTJ.g⁻¹, resp. 15 °C: z 3,35 na 4,34 log KTJ.g⁻¹). Podobně tomu bylo i v případě bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* (6,5 °C: z 0,51 na 1,00 log KTJ.g⁻¹, resp. 15 °C: z 1,07 na 2,14 log KTJ.g⁻¹). Bakterie mléčného kvašení byly nejvíce zastoupeny u vzorků vymasírovaného masa (6,5 °C: průměrná hodnota 2,60 log KTJ.g⁻¹, 15 °C: průměrná hodnota 3,17 log KTJ.g⁻¹). U těchto vzorků bylo zachyceno poměrně široké spektrum druhů: *Lactobacillus curvatus*, *L. fuchuensis*, *L. sakei*, *Leuconostoc carnosum*, *Leuc. gelidum*, *Leuc. inhae*, *Leuc. mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Pancilactobacillus oligofermentans*, *Lentilactobacillus kefir*, *Lentil. otakiensis*, *Dellaglioa algida*. U neošetřeného masa byl záchyt BMK ojedinělý, ve většině případů byl zjištěný počet pod detekčním limitem použité metody. Zachyceny byly následující druhy: *Lactobacillus curvatus*, *L. sakei*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuc. carnosum*, *Enterococcus gilvus*. U vzorků dušené šunky byla zjištěná hodnota CPM, počtu *Enterobacteriaceae* i BMK vždy pod detekčním limitem použité metody. Zajímavé je zjištění v případě dušených šunek vyšetřených po termostátové zkoušce (15 °C/7 dní) – průměrná hodnota CPM 3,64 log KTJ.g⁻¹, *Enterobacteriaceae* 1,31 log KTJ.g⁻¹ a BMK 3,18 log KTJ.g⁻¹. Zachyceny byly druhy: *Leuconostoc carnosum*, *Leuc. gelidum*, *Leuc. mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus curvatus*, *L. sakei*.

Bylo prokázáno, že tepelné opracování není vždy účinné k usmrcení BMK přítomných ve výrobní surovině. Termostatová zkouška finálních výrobků (15 °C/7 dní) dokáže obnovit subletálně poškozené BMK, které primokultivace neodhalí. Pro výrobky skladované v chladírenských teplotách je vhodné použít při bakteriologickém vyšetření teploty inkubace 15 °C. Při 6,5 °C je růst bakterií pomalejší a efektivita záchytu nižší, než je tomu při 15 °C. Na druhé straně 15 °C nedokáže odhalit některé striktně psychrofilní BMK.

Aktivita 4: Real-time PCR identifikace a detekce Bacillus cereus a jeho faktorů virulence v potravinách

Jako vhodná metodika řešení daného dílčího úkolu byla zvolena metoda TaqMan real-time PCR, která je vysoce spolehlivá, citlivá a umožňuje provádět spolehlivé multiplexní analýzy až 5 cílů. Byl nalezen vhodný genetický marker v oblasti genomové DNA pro samotnou druhovou identifikaci daného patogenu. Stejně tak na základě analýzy sekvencí genů kódujících nejvýznamnější faktory virulence byly pomocí programu OLIGO 7 primer analysis software navrženy primery a TaqMan sondy, které umožňují detekci nejvýznamnějších toxinů produkovaných *B. cereus* – cereulidu (gen *ces*), cytotoxinu (gen *cytK*), nehemolytických enterotoxinů (geny *nhe*) a hemolyzinů (geny *hbl*). V rámci projektu byla získána a extrahována DNA referenčních kmenů o izolátů z potravin a tyto vzorky byly následně použity pro ověření specifity navržených esejí. Exkluzivita eseje byla posouzena s využitím kmenů především blízce příbuzných bakteriálních druhů. Vzhledem k dlouhodobé pracovní neschopnosti klíčového řešitele (Dr. Nesvadbová) došlo ke zpoždění v řešení projektu a validace panelu tak bude dokončena až na začátku roku 2022 – bude stanoven LOD pomocí modelových vzorků a bude provedena genotypizace izolátů ze sbírky Ústavu hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie.

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Očekávaný přínos projektu lze spatřovat v přínosech realizace jednotlivých aktivit, a to následovně: Realizací **Aktivity 1** byly získány nové informace o vlivu ochranné kultury SafePro®NovaLox na růst *L. monocytogenes* v marinovaných filetech lososa a zhodnocen vliv Gravad lax úpravy z hlediska zdravotní nezávadnosti a kvality, mikrobiologického profilu a změn vnitřního prostředí. Hlavním přínosem realizace **Aktivity 2** bylo získání poznatků o výskytu patogenní bakterie *H. pylori* v nebovinných druzích mlék produkovaných za účelem zpracování na mléčné výrobky. Poznatky zjištěné při řešení **Aktivity 3** budou využity k doporučení postupů prodloužení údržnosti finálních výrobků a také specifikaci podmínek jejich mikrobiologického vyšetření. **Aktivita 4** – projekt umožnil optimalizaci a zavedení moderní a vysoce spolehlivé molekulárně-genetické metody, která je přímo aplikovatelná v oblasti veterinárně-hygienické. Díky využití multiplexní TaqMan real-time PCR je současně možná identifikace genů, které jsou zodpovědné za produkci faktorů virulence, což poskytne komplexní přehled o daném bakteriálním kmenu a jeho toxigenním profilu.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Prezentace výsledků rozšíří informovanost odborné i vědecké veřejnosti, a to jejich prezentací ve vědeckém časopise s IF, odborných časopisech, a dále pak na tuzemských konferencích. Současně jsou výsledky využitelné při výuce studentů FVHE VETUNI a také přímo v laboratorní praxi při analýzách potravin skladovaných při chladírenských teplotách. Zavedení nové metody rozšíří analytické možnosti pracoviště a umožní lepší analýzu vzorků v budoucích letech v rámci příštích výzkumných projektů.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány, nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

Influence of Gravad lax treatment of salmon fillets (*Salmo salar*) on antioxidant capacity and changes in proteins and fats (*Foods*; Q2)

Effect of SafePro®NovaLox protective culture on the growth of *L. monocytogenes* in Gravad lax salmon fillets (*LWT – Food Science and Technology*; Q1)

The occurrence of *Helicobacter pylori* in non-bovine milks (*Zoonoses and Public Health*; Q1)

Fresh pork or factory production environment? Influence of partial technological steps on the development of bacterial contamination of cooked hams. (*Food Control*; Q1)

Development of a real-time PCR assay for rapid detection of *Bacillus cereus* and its virulence factors (*Food Control*; Q1)

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	829 632,00	829 628,00
Služby	35 000,00	30 059,58
Cestovné	13 000,00	0,00
Další provozní náklady	713 248,00	731 192,42
Doplňkové náklady	238 632,00	238 632,00
Celkem	1 829 512,00	1 829 512,00

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

(komentář k čerpání finančních prostředků na řešení projektu – slovní popis v členění jednotlivých položek nákladů a konkrétní výčet, na co byly prostředky využity, komentář a zdůvodnění případných změn a rozdílů oproti schválenému rozpočtu projektu)

Přidělené finanční prostředky byly čerpány v plné výši, tj. **1 829 512,00 Kč**. V rámci jednotlivých položek došlo k přesunu finančních prostředků v částce 13 000,- Kč z položky *Cestovné* do položky *Další provozní náklady*. Důvodem pro přesun byla nepříznivá epidemiologická situace související s pandemií COVID-19 a s tím zejména v první polovině roku 2021 spojené omezené cestování. Dále došlo k přesunu částky 4 940,42 Kč z položky *Služby* do položky *Další provozní náklady*. Důvodem byl nižší finální částka za provedený servis přístrojů oproti předběžné nabídce. V rámci *Osobních nákladů* došlo k nedočerpání částky 4,00 Kč, o kterou byla navýšena položka *Další provozní náklady*.

Osobní náklady:

Osobní náklady byly čerpány v rámci odměn pro zapojené akademické pracovníky (detailní popis míry zapojení je uveden v části 4 Řešitelský kolektiv), a to v celkové výši **754 628,00 Kč** (odměny – 564 000,00 Kč; zdravotní pojištění 50 759, 00 Kč; sociální pojištění 139 869,00 Kč). Nevyčerpaná částka 4,00 Kč byla převedena do položky *Další provozní náklady*. Stipendia pro studentky DSP byla čerpána v plánované výši **75 000,00 Kč**.

Služby:

Finanční prostředky z položky *Služby* byly čerpány na jazykovou korekturu textu článku v anglickém jazyce a nezbytnou opravu a servis použitých laboratorních přístrojů. Celkem bylo v rámci položky *Služby* vyčerpano **30 059,58 Kč**, nevyčerpaná částka 4 940,42 Kč byla převedena do položky *Další provozní náklady*.

Cestovné:

Finanční prostředky z položky *Cestovné* 13 000,00 Kč byly v plné výši přesunuty do položky *Další provozní náklady*.

Další provozní náklady:

V položce *Další provozní náklady* byly čerpány finanční prostředky v celkové výši **731 192,42 Kč**. Tato položka byla oproti návrhu projektu navýšena o prostředky z položky *Cestovné* (13 000,00 Kč), *Služby* (4 940,42 Kč) a *Osobní náklady* (4,00 Kč).

Finanční prostředky byly využity pro nákup vzorků a dalších potravin (mléko, filety, maso, cukr, kopr, sůl); nákup materiálu pro provedení mikrobiologických analýz: kultivační média, suplementy, vyvíječe pro mikroaerofilní a anaerobní kultivaci, homogenizační sáčky s filtrem, konfirmační testovací soupravy a jednorázový plastový spotřební materiál (Petriho misky, špičky k automatickým pipetám, mikrozkuhavky); nákup materiálu pro provedení molekulárně-biologických metod: izolační kity pro získání DNA; ethanol pro izolaci DNA, oligonukleotidy, mastermixy, DNA markery, PCR agaróza a dále laboratorní pomůcky a ostatní spotřební materiál pro izolaci DNA a qPCR (mikrozkuhavky, mikrodestičky pro qPCR, špičky s filtrem, rukavice); nákup materiálu pro provedení chemických analýz: kyselina trichloroctová p.a., ethanol 96% p.a., kyselina sírová p.a., kyselina octová p.a. Další finanční prostředky byly vynaloženy na laboratorní potřeby a další pomůcky (filtrační papíry, laboratorní sklo, nástroje na odběr vzorků, ochranné rukavice, hliníková folie s držákem, průtažná folie, zatavovací vaničky na balení vzorků, atd.) a kancelářské potřeby.

Doplňkové náklady:

Doplňkové náklady byly čerpány ve výši **238 632,00 Kč** (15 % režie VETUNI).

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě doložte výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

9. Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VETUNI bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu:

10. 1. 2021 doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu **odpovědného za čerpání prostředků:**

10. 1. 2021 doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

Přednosta ústavu nebo kliniky, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu nebo klinice, respektive celoškolském pracovišti, které řídí.

Datum, jméno a podpis

přednosty ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

10. 1. 2021 doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:

10. 1. 2021 Ing. Luděk Vítoslavský

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

10. 1. 2021 doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2021
(vyplní řešitel)

1. **Identifikační číslo projektu:** 2021ITA26

2. **Název projektu:** *Dynamické změny v biotopech – od radioizotopové zátěže, přes migrace zvířat, až k šíření nákaz.*

3. **Řešitel projektu:**

Titul, jméno a příjmení: prof. MVDr. **Pavel Široký**, Ph.D.

Fakulta/celoškolské pracoviště: FVHE

E-mail: sirokyp@vfu.cz

Telefon: +420 727 954 256

4. **Řešitelský kolektiv:**

složení řešitelského týmu: (akademičtí pracovníci a jejich příslušnost k ústavům nebo klinikám fakulty nebo výzkumným skupinám CEITEC, studenti DSP) a forma zapojení každého člena řešitelského týmu

Akademičtí pracovníci

Populační struktura, šíření a kompetence klíšťat jako vektorů nákaz zvířat i lidí

Prof. MVDr. Pavel Široký, Ph.D. (úvazek VFU Brno, 2150, AP 1.0)

MVDr. Branka Bilbija, Ph.D. (úvazek VFU Brno, 2150, AP 1.0)

Mgr. Ivo Papoušek, Ph.D. (úvazek VFU Brno, 2150, AP 1.0)

Genetická struktura a hybridizace luňáků

Prof. MVDr. Ivan Literák, CSc. (úvazek VFU Brno, 2150, AP 1.0)

RNDr. Dana Rymešová, Ph.D. (úvazek VFU Brno, 2150, AP 0.5)

Morfometrie, parazito-hostitelské vazby a geografické rozšíření ektoparazitů volně žijících ptáků

Prof. RNDr. Oldřich Sychra, Ph.D. (úvazek VFU Brno, 2150, AP 1.0)

Možnosti eliminace radiocesie z kontaminovaného drůbežího masa

Prof. MVDr. Petr Dvořák, CSc. (úvazek VFU Brno, 2150, AP 1.0)

Studenti DSP

Populační struktura, šíření a kompetence klíšťat jako vektorů nákaz zvířat i lidí

Mgr. Nikola Kašpárková (3. roč. DSP FVHE, 2150)

Genetická struktura a hybridizace luňáků

MVDr. Lenka Rozsypalová (3. roč. DSP FVHE, 2150)

5. V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu:

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Dynamika globálních změn akceleruje geografické šíření mnoha rezervoárových druhů, vektorů, a vektory přenášených patogenů. Studium biologie hostitelských druhů a jejich parazitů včetně klíšťat a klíšťaty přenášených infekcí je tradičně silnou částí výzkumu na VETUNI. Analýza dynamiky areálů vybraných hostitelů (zde migrující ptáci) a jejich populační struktury, analýza populační struktury a šíření klíšťat v návaznosti na strukturu populace hostitelů jsou východiskem mnoha epidemiologických studií a jejich konzistentní součástí. Základem studie byla kombinace tradičních metod s pokročilými postupy a diagnostikou. Participace jednotlivých laboratoří ústavu vytvořila silný mezioborový tým a umožnila dosažení unikátních výsledků dostupných pro vědeckou i laickou veřejnost, veterinární sektor a jejich následné využití v praxi a v navazujícím výzkumu. Projekt konzistentně zapadá do rámce výzkumu VETUNI.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

- Definovat genetickou strukturu populací luňáků hnědých *Milvus migrans migrans*, *Milvus migrans lineatus* a luňáků červených *Milvus milvus* a zjistit rozsah mezi- a vnitrodruhové hybridizace.
- Odhalit konektivitu populací luňáků.
- Analyzovat populační strukturu klíštěte *Hyalomma aegyptium* a spektrum jím přenášených patogenů.
- Detekovat původce nákaz v sérech koní a v klíšťatech.
- Revidovat všenky u volně žijících ptáků.
- Definovat úpravu snižující aktivitu ¹³⁷Cs v drůbežím mase.

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany):

•Sbírka izolátů byla rozšířena z 300 na 440 vzorků izolované DNA z juvenilního peří luňáků obou druhů i jejich hybridů z Česka a dalších evropských zemí včetně asijské oblasti Ruska. Na DNA izolátech z luňáků bylo testováno 33 mikrosatelitových lokusů, z nichž polymorfni amplifikovatelné lokusy byly následně využity k analýze všech dostupných vzorků. Vlastní fragmentační analýza proběhla na sekvenátoru ABI 3130. Výsledky byly hodnoceny pomocí software PEAK SCANNER v. 1. Genetická rozmanitost byla analyzována programem ARLEQUIN 3.5.2.2. K získání vhledu do genetické struktury populace a zjištění, zda geografický původ odpovídá genetickým skupinám, byl využit program STRUCTURE 2.3.4. K sledování časoprostorových aktivit luňáka hnědého, luňáka červeného a jejich hybridů byli mladí luňáci na hnízdech ve střední a východní Evropě vybaveni telemetrickými záznamníky GPS/GSM. Ptáci byli následně sledováni vysílačkami Ornitela (20 g, Ornitela, Litva). V letech 2018 až 2021 byli na Slovensku a na Ukrajině osazeni vysílačkami hybridů ze dvou hnízd smíšených párů luňáka červeného a luňáka hnědého. GPS pozice sledovaných jedinců jsou zpracovávány v programu ArcGIS 10.1 (Esri, Redlands, USA) a jeho volně dostupných extenzích HRT a ARCMET.

•K analýze populační struktury klíštěte *Hyalomma aegyptium* bylo použito 928 jedinců (42 lokalit, 11 států). Vyizolovaná DNA posloužila k otestování vhodnosti mikrosatelitových lokusů. Z genomické knihovny obsahující celkem 130 mikrosatelitových markerů byl vybrán subset 82 markerů, které byly podrobeny gradientové PCR a následné agarózové gelové elektroforóze u omezeného souboru 8 vzorků pro stanovení ideálního teplotního profilu PCR. Takto bylo vybráno 19 nejslibnějších markerů (8 dinukleotidových, 8 trinukleotidových a 3 tetranukleotidové) pro následnou vlastní analýzu širšího souboru vzorků. Pro fragmentační analýzu s fluorescenčně značenými primery byl tento set rozdělen do čtyř paralelně testovaných multiplexů. Fragmentační analýza byla prováděna

v automatickém sekvenátoru ABI PRISM 3130. Získaná data o délkách alel byla odečtena pomocí programu GeneMapper. Doposud takto byla získána genotypová data 164 vzorků z pěti států (Írán, Turecko, Rumunsko, Maroko, Alžírsko). Jako doplňková informace pro posouzení genetické struktury populací bylo využito sekvenování vybraných mitochondriálních a jaderných markerů (COI, 16S rRNA, 18S rRNA a ITS2). Souběžně s tím byly pomocí PCR metody vzorky diagnostikovány na přítomnost vybraných patogenů. •Serologické metody (ELISA) byly použity k detekci protilátek proti *T. equi*, *B. caballi* a *Trichinella* spp. u 115 sér koní a 24 sér oslů z Nigérie. Dále bylo vyšetřeno 262 krevních sér koní z ČR na přítomnost protilátek proti *B. burgdorferi* nepřímým sendvičovým enzymatickým imunisorbentním testem. Výsledky byly statisticky zpracovány s cílem vyhodnotit rizikové faktory infekce. Diagnostika rickettsií pomocí PCR byla provedena u 854 klíšťat (zástupci rodů *Amblyomma*, *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus*) pocházejících z Jižní Afriky z let 2014-2019. Výsledky byly nebo budou dále statisticky vyhodnoceny a publikovány. •Byla provedena morfologická a morfometrická analýza vybraných skupin všenek pocházejících jak z ČR, tak ze zahraničí. Hodnoceni byli zejména luptouši z druhového komplexu *Myrsidea quadrifasciata* a to jak s použitím vlastních starších sběrů, tak materiálu zapůjčeného ze světových muzeí. Byly hodnoceny parazitologické parametry (prevalence, intenzita) a také význam geografického rozšíření pro výskyt těchto ektoparazitů na volně žijících pěvcích. Pro potvrzení morfologické determinace byly zpracovány dostupné informace o genetické variabilitě založené na parciálních sekvencích genů *COI*, *EF-1 α* uložených v databázi GenBank. •Gammaspektrometrickými trasami byla stanovena hmotnostní aktivita ^{137}Cs u vzorků drůbežního masa před a po tepelné tlakové úpravě. Prsní svalovina byla rozdělena na dvě poloviny, kdy levá byla použita pro vývar z destilované vody a pravá pro vývar s přídavkem NaCl nebo KCl. V hmotnostním poměru 1:10 nebo 1:5 (svalovina:voda) byl odměřen objem horké deionizované H_2O . Poté byl tento objem převeden do tlakového hrnce spolu se vzorkem masa. Ke vzorkům, u kterých byl sledován vliv přídavku NaCl nebo KCl na uvolňování ^{137}Cs , byla před uzavřením přidána taková hmotnost NaCl nebo KCl, která odpovídala vzniku 0,5% roztoku. Po stanovení byla provedena korekce na objem a měrnou hmotnost. U vývaru byla použita standardní geometrie Marinelliho nádoby 450 ml.

Dosažené výsledky projektu (max. 1/2 strany):

•Bylo vybráno 19 amplifikovatelných a dostatečně polymorfních mikrosatelitových lokusů vhodných pro genetickou analýzu populační struktury luňáků. Z nich 14 je dinukleotidových, tři trinukleotidové a dva tetranukleotidové. Detailně byla zanalyzována disperze luňáků červených pocházejících ze střední Evropy (Česko, Rakousko, Slovensko) a bylo zjištěno, že rozsah a časování disperzních pohybů včetně migračního chování závisí na věku a pohlaví studovaných jedinců. Studium filopatrie luňáků červených pocházejících ze střední Evropy bylo zjištěno, že část ptáků zimuje v hnízdní oblasti, zatím co ostatní migrují na zimoviště ležící v jižní Evropě v širokém pásu od Pyrenejského poloostrova po Balkán. Migrační cesty byly signifikantně delší u samic než u samců. Migrační cesty se s věkem sledovaných ptáků zkracovaly. Hnízdní filopatrie byla signifikantně vyšší u jedinců, jejichž předcházející hnízdění bylo úspěšné v porovnání s jedinci, jejichž předcházející hnízdění bylo neúspěšné. •Také u klíšťat *H. aegyptium* bylo vybráno 19 amplifikovatelných a polymorfních mikrosatelitů, jejichž analýza probíhá. Ze sekvenčních dat se jako dostatečně vnitrodruhově variabilní a fylogeneticky informativní ukázal pouze gen pro *COI*, jehož analýza dělí populaci *H. aegyptium* do 3 (případně 4) evolučních linií, z nichž 2 (příp. 3) vykazují geografický pattern, zatím co zbývající evoluční linie je široce rozšířená. Z analyzovaných patogenních agens byla v klíšťatech nalezena takřka všudypřítomná *Borrelia turcica*, v menší míře *Rickettsia aeschlimannii* a *R. africae*, další druhově neurčená rickettsie a zástupce Anaplasmataceae, podobný *A. phagocytophilum*. Použitá sekvence 16S byla na přesné určení anaplasmu nedostatečná a analýza tak bude doplněna. *Coxiella burnetii* nebyla nalezena ani v jednom vzorku. •Z nigerijských koňovitých byly protilátky proti *T. equi* detekovány u 34 % koňovitých (47/139) a to u 41 % (47/115) koní a 0 % (0/24) oslů, protilátky proti *B. caballi* u 9 % (12/139) koňovitých a to u

8 % (9/115) koní a 13 % (3/24) oslů a protilátky proti *Trichinella* spp. u 4 % (5/139) koňovitých a to u 4 % (5/115) koní a 0 % (0/24) oslů. Koinfekce *T. equi* a *B. caballi* byla zjištěna u 1 koně a koinfekce *T. equi* a *Trichinella* spp. u 3 koní. Všechna zvířata byla klinicky zdravá. Vzorky sér z České republiky pocházely od 247 klinicky zdravých koní a 15 koní hospitalizovaných pro symptomy meningoencefalitidy. Protilátky proti *B. burgdorferi* byly detekovány u 66 klinicky zdravých koní a u 3 koní s klinickými příznaky nemoci. DNA rickettsií byla přítomna ve 144 vzorcích jihoafrických klíšťat, z toho bylo 41/230 (18 %) samic, 64/479 samců (13 %), 26/99 nymf (26%) a 13/46 larev (18 %). Pozitivní vzorky budou nyní sekvenovány a druhová diagnostika rickettsií bude provedena analýzou získaných sekvencí. •V rámci revize druhového komplexu *Myrsidea quadrifasciata* bylo hodnoceno 167 samic a 90 samců 10 druhů lupťoušů ze 49 druhů ptáků 7 čeledí 4 zoogeografických oblastí. Výsledky morfometrické analýzy, podpořené i dostupnými genetickými daty, vedly k synonymizaci sledovaných taxonů a potvrdily, že druh *M. quadrifasciata* tedy představuje prakticky kosmopolitně rozšířeného generalistu. Výsledky jsou z pohledu všenek, které jsou považovány za vysoce hostitelsky specifické ektoparazity, zajímavé a ukazují, že naše znalosti o hostitelské specifitě všenek jsou neúplné a vyžadují další komplexnější studium. Ve slovenských sběrech bylo diagnostikováno 255 druhů všenek. Celkem bylo hodnoceno 366 parazito-hostitelských vazeb zaznamenaných u 171 druhů ptáků 21 řádů a dalších 8 vazeb u 8 druhů savců. Z Chile byl popsán nový druh lupťouše *Myrsidea danielalfonsoi* z drozda falklandského (*Turdus falcklandii*). •Delší doba varu ani poměr svaloviny k vodě (1:10 a 1:5) nevedou ke snížení aktivity ^{137}Cs v mase. Přídavek 0,5 % NaCl do vody před dosažením varu vede pouze k nevýznamnému snížení aktivity ^{137}Cs , zatím co použití 0,5 % KCl vede ke statisticky významnému snížení aktivity ^{137}Cs v mase.

Přínos projektu (max. 5 řádků):

•Ověřili jsme metodiku a použili ji k analýze populační struktury, disperze a filopatrie luňáků ve střední Evropě, kde se migrační strategie liší od migrace v západní Evropě. •Klíště *H. aegyptium* má zřetelnou genetickou populační strukturu a je nosičem mnoha patogenů. •Byla získána nová data o prevalenci vybraných patogenů u koní a klíšťat. •Rozšířili jsme znalosti o diverzitě, hostitelské specifitě a rozšíření všenek volně žijících ptáků. •Některé gastronomické úpravy vedou ke snížení aktivity ^{137}Cs .

Využití výsledků (max. 5 řádků):

•Poznání časoprostorových aktivit ptáků žijících se rizikovou potravou je nezbytné ke zhodnocení jejich významu v šíření bakterií, včetně kmenů rezistentních k antibiotikům. •Populační struktura klíšťat souvisí s disperzí a šířením klíšťatových nákaz. •Prevalenční studie na koňovitých a klíšťatech nabízí nová epidemiologická data. •Přispěli jsme k objasnění parazito-hostitelských vazeb ektoparazitů u volně žijících ptáků. •Tepelná úprava může snížit aktivitu ^{137}Cs v drůbežím mase až o 57 %.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány, nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

Časopisy s IF:

Dosud přijaté

- KAMANI, J., BÁRTOVÁ, E., KAŠPÁRKOVÁ, N., MOHAMMED, J. S., BUDÍKOVÁ, M., SEDLÁK, K. Seroprevalence of *Theileria equi*, *Babesia caballi*, and *Trichinella* spp. infection in horses and donkeys from Nigeria, West Africa. *Tropical Animal Health and Production* 2021, 53 (3): 338 doi: 10.1007/s11250-021-02737-9.
- LITERÁK, I., RAAB, R., ŠKRÁBAL, J., VYHNAL, S., DOSTÁL, M., MATUŠÍK, H., MAKOŇ, K., MADERIČ, B., SPAKOVŠZKY, P. Dispersal and philopatry in Central European red kites. *Journal of Ornithology*, 2022, in press (accepted on 29 November 2021)

- OŠLEJŠKOVÁ, L., KRIŠTOFÍK, J., TRNKA, A., SYCHRA, O. An annotated checklist of chewing lice (Phthiraptera: Amblycera, Ischnocera) from Slovakia. *Zootaxa*, 2021, vol. 5069, no. 1, p. 1–80. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5069.1.1>
- SYCHRA, O., KOLENČÍK, S., PAPOUŠEK, I., BILBIJA, B., LITERÁK, I. *Myrsidea quadrifasciata* (Phthiraptera: Amblycera) – a unique host generalist among highly host-specific chewing lice. *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 2021, vol. 79, p. 379–400. <https://doi.org/10.3897/asp.79.e63975>
- SYCHRA, O., PALMA, R. L. A new species of *Myrsidea* (Insecta: Phthiraptera: Menoponidae) from Chile. *Zootaxa*, 2021, vol. 5016, no. 3, p. 441–447. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5016.3.9>

V procesu

- BILBIJA, B., PAPOUŠEK, I., FRITZ, U., MIKULÍČEK, P., JANDZIK, D., TIAR, G., JAVANBAKHT, H., SHARIFI, M., ŠIROKÝ, P. Population structure of host-specific tortoise tick *Hyalomma aegyptium* and its implications for epidemiology of selected tick-borne diseases. *Parasites & Vectors*
- BEŇOVÁ, K., HAVELKOVÁ A., DVOŘÁK, P., Selected Aspects of Caesium-137 Contamination in Wild Boars. *Acta Veter.*
- KAŠPÁRKOVÁ, N., BÁRTOVÁ, E., SEDLÁK, K., BUDÍKOVÁ, M., ŽÁKOVSKÁ, A. *Borrelia burgdorferi sensu lato* in two groups of horses (healthy and sick).
- KAŠPÁRKOVÁ, N., BÁRTOVÁ, E., HALAJIAN, A., BUDÍKOVÁ, M., ŽÁKOVSKÁ, A. Molecular detection of zoonotic tick-borne pathogens from ticks collected from wild animals in South Africa.

Konference:

- KAŠPÁRKOVÁ, N., BÁRTOVÁ, E., HALAJIAN, A., ŽÁKOVSKÁ, A. Ticks from wildlife animals in South Africa: molecular detection of *Rickettsia* sp. In *Sborník XXXX. Tomáškovy dny mladých mikrobiologů 2021, Brno: Masarykova univerzita Brno, červen 2021, p. 47. ISBN 978-80-210-9882-4*
- KAŠPÁRKOVÁ, N., BÁRTOVÁ, E., HALAJIAN, A., ŽÁKOVSKÁ, A. Molecular detection of *Rickettsia* sp. in ticks from wildlife animals living in six provinces of South Africa. In *Sborník příspěvků XXIII. Konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí, Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 14. 6. 2021, p. 87-89. ISBN 978-80-7305-851-7*

Časopisy bez IF:

- Beňová, K., Gašpareková, I., Dvořák, P., Havelková A. Contamination of Slovak Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) With Radiocaesium 137Cs In Selected Slovak Locations. *Folia Veter.* 62, 2021, No. 2, pp. 48-57.

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	400 000	400 000
Služby	150 227	146 358
Cestovné	124 500	52 705
Další provozní náklady	852 000	927 664
Doplňkové náklady	229 009	229 009
Celkem	1 755 736	1 755 736

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

(komentář k čerpání finančních prostředků na řešení projektu – slovní popis v členění jednotlivých položek nákladů a konkrétní výčet, na co byly prostředky využity, komentář a zdůvodnění případných změn a rozdílů oproti schválenému rozpočtu projektu)

Osobní náklady (400 tis.), čerpány přesně podle schváleného návrhu

Prof. MVDr. Pavel Široký, Ph.D. – odměna AP – 50 000 Kč

Prof. MVDr. Ivan Literák, CSc. odměna AP – 50 000 Kč

Prof. RNDr. Oldřich Sychra, Ph.D. odměna AP – 45 000 Kč

Prof. MVDr. Petr Dvořák, CSc. odměna AP – 80 000 Kč

MVDr. Branka Bilbija, Ph.D. – odměna AP – 50 000 Kč

Mgr. Ivo Papoušek, Ph.D. – odměna AP – 50 000 Kč

Mgr. Dana Rymešová, Ph.D. – odměna AP – 20 000 Kč

MVDr. Lenka Rozsypalová – stipendium – 30 000 Kč

Mgr. Nikola Kašpárková – stipendium – 25 000 Kč

vyplaceno u všech členů týmu nadvakrát v červnu a listopadu

Služby (cca 146 tis.)

Náklady na služby byly čerpány na potřebu servisního sekvenování molekulárně genetických markerů, včetně diagnostikovaných patogenů, které nelze provádět vlastními prostředky. Významná část služeb se týkala také nákladů na provoz telemetrických zařízení. Další část byla použita na poplatky spojené s korekturami rukopisů a publikační náklady ve vědeckých časopisech a menší část také na vyšetření vzorků v SVU Jihlava. Prostředky také posloužily k pokrytí nutných oprav a servisu laboratorních přístrojů a zařízení a zaplacení kurzu práce s laboratorními zvířaty.

Cestovné (cca 53 tis.)

Cestovné bylo čerpáno významně méně, než byl náš původní předpoklad. Do značné míry byla situace způsobena epidemií covid-19 a přechodem na online komunikaci. Čerpané cestovné sloužilo k potřebám během instalací a údržbou telemetrických zařízení a k odběru terénních vzorků.

Další provozní náklady (cca 928 tis.)

Široké spektrum použitých laboratorních metod a metod terénního výzkumu se odrazilo jak množství spotřebního materiálu, tak speciální laboratorní chemie. Šlo zejména o izolační kity na izolaci nukleových kyselin, chemikálie na PCR (voda, etanol, mastermixy, qPCR Probe Mastermix, primery), destičky s fóliemi, materiál na elektroforézu (agaróza, špičky na vyřezávání z gelu, hmotnostní standardy, barviva), přečišťování produktů a fluorescenčně značené primery. Práce s mikrosatelity vyžaduje chemii na fragmentační analýzu (kapilárová array, formamid, velikostní standard, separační polymer aj.). Vše bylo provázeno spotřebou laboratorního plastu, jako jsou špičky, sekvenační destičky, stripy, mikro zkumavky, skladovací boxy, a také ochranných pomůcek (rukavice, dezinfekce, papírové utěrky apod). Další oblastí byly náklady na provoz vysílaček. Materiály pro mikroskopické analýzy (imerzní olej, mikroskopická skla, zalévací média a chemie na barvení) a entomologické potřeby. Pro diagnostiku radioizotopů byl nezbytný pravidelný přísun kapalného dusíku. Kancelářské potřeby. Větší potřeba materiálních nákladů byla saturována přebytky z cestovného dle pravidel.

Doplňkové náklady (229 tis.)

Doplňkové náklady, tedy v podstatě plánovaná režie (15%), byly odvedeny univerzitě dle plánu.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě doložte výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

9. Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VETUNI bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu: 6. ledna 2022, Prof. Pavel Široký

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu **odpovědného za čerpání prostředků:** 6. ledna 2022, Prof. Pavel Široký

Přednosta ústavu nebo kliniky, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu nebo klinice, respektive celoškolském pracovišti, které řídí.

Datum, jméno a podpis

přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

6. ledna 2022, Prof. Ivan Literák

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:

Strana 8 (celkem 8)

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VETUNI na rok 2021
(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu: 2021ITA31

2. Název projektu: One Health Concept a choroby domácích a volně žijících zvířat

3. Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: Prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.

Fakulta/celoškolské pracoviště: CEITEC VETUNI

E-mail: literaki@vfu.cz

Telefon: 541 562 630

4. Řešitelský kolektiv:

složení řešitelského týmu: (akademičtí pracovníci a jejich příslušnost k ústavům nebo klinikám fakulty nebo výzkumným skupinám CEITEC, studenti DSP) a forma zapojení každého člena řešitelského týmu

Akademičtí pracovníci

Prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.	CEITEC, úvazek na VFU Brno (AP) 1,0
Doc. RNDr. Monika Dolejská, Ph.D.	CEITEC, úvazek na VFU Brno (AP, VP) 0,65
Mgr. Dana Červinková, Ph.D.	CEITEC, úvazek na VFU Brno (VP), 0,6
Mgr. Iva Kutilová, Ph.D.	CEITEC, úvazek na VFU Brno (VP), 0,75
Prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.,	CEITEC, úvazek na VFU Brno (AP) 1,0
RNDr. Stanislava Králová, Ph.D.	CEITEC, úvazek na VFU Brno (VP) 1,0
Prof. MVDr. Pavel Široký, Ph.D.	CEITEC, úvazek na VFU Brno (AP) 1,0
Prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D., dipl. ECZM	CEITEC, úvazek na VFU Brno (AP) 1,0
Mgr. Miroslava Barančková, Ph.D.	CEITEC, úvazek na VFU Brno (VP) 1,0

Studenti DSP (všichni v prezenční formě studia)

Mgr. Tomáš Nohejl	2. roč. DSP
Mgr. Jana Palkovičová	3. roč. DSP
PharmDr. Petra Šišmová	3. roč. DSP
Mgr. Jana Šišková	1. roč. DSP
MVDr. Nikita Kolidentsev	1. roč. DSP
Mgr. Marek Dostál	2. roč. DSP
Mgr. Šimon Krejčí	1. roč. DSP
MVDr. Aneta Papoušková	3. roč. DSP
MVDr. Věra Nováková	1. roč. DSP
Mgr. Šárka Bednaříková	1. roč. DSP
MVDr. Dagmar Břinek Kolářová	2. roč. DSP

5. V případě společných projektů pro více součástí VETUNI popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu: nejedná se o společný projekt

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VETUNI:

Projekt byl zaměřen na studium aktuálně významných interakcí mezi infekčními patogeny a cílovými makroorganismy, kterými byla volně žijící a domácí zvířata. Řešená témata plně zapadají do koncepce výzkumu na VETUNI.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Cílem projektu bylo charakterizovat *Escherichia coli* s klinicky významnými mechanismy rezistence k antibiotikům v populacích volně žijících migrujících ptáků a v chovech drůbeže, ověřit účinnost směsi střevních anaerobních bakterií a laktobacilů podané perorálně jednodenním kuřatům, izolovat a charakterizovat mikrobiom pstruha duhového, optimalizovat protokol pro zobrazování anatomie klíšťat *Dermacentor reticulatus*, vyhodnotit výskyt *Pseudogymnoascus destructans* v Eurasii a syntetizovat hlavní kapsidový protein VP60 viru hemoragického onemocnění králíků (RHDV).

Popis a metodika řešení projektu (max. 1/2 strany):

1) V rámci projektu bylo vyšetřeno 684 vzorků kloakálních výtěrů dravců z různých evropských lokalit odebraných v letech 2018-2020 a 117 vzorků racků bělohavých z Novomlýnské nádrže z let 2018-2019. Dále byla provedena detailní molekulárně-biologická charakteristika 84 izolátů *E. coli* a *Klebsiella pneumoniae* z drůbežích farem. Telemetricky byly studovány časoprostorové aktivity vyšetřovaných racků bělohavých. Selektivní kultivace pomnožených vzorků kloakálních výtěrů v peptonové vodě byla provedena jejich naočkováním na plotnu MacConkeyho agar (MCA) s přidavkem jednoho z následujících antibiotik: cefotaxim (2 mg/L), ciprofloxacín (0,05 mg/L), kolistin (3,5 mg/L) a meropenem (0,125 mg/L). U vybraných identifikovaných izolátů byla provedena detekce genů pro produkci vybraných skupin beta-laktamáz a plazmidových genů rezistence k fluorochinolonom. Na základě PFGE profilů byly vybrány reprezentativní izoláty pro celogenomové sekvenování. 2) Byly sledovány dvě skupiny kuřat. Pokusné skupině byla podána probiotická směs, následně byla pokusná a kontrolní skupina infikována kmenem *E. coli* O78:H4. Přítomnost *E. coli* O78:H4 byla zjišťována sklíčkovou aglutinací s antisérem O78. Získané bakteriální kultury byly identifikovány. 3) Antagonismus získaných kultur vůči původci cytofagózy lososovitých ryb byl testován metodou kokultur na TYES agaru. 4) Klíšťata *Dermacentor reticulatus* byla krmena v systému *in vitro* bovinní krví obohacenou o zlaté nanočástice o koncentraci 2 mg na 1 ml krve. Vizualizace nanočástic pak byla u klíšťat provedena na systému Bruker micro-CT SkyScan 1276. 5) Infekce *Pseudogymnoascus destructans* byla stanovována různými metodami u netopýřů z Bulharska, Arménie a Ruska. 6) Byly připraveny primery pro amplifikaci genu kódujících sekvencí kapsidového proteinu VP60 virů RHDV1 a RHDV2 a vhodné plazmidy se sekvencemi pro cílové proteiny. Pro produkci rekombinantního proteinu viru RHDV1 byly použity cílové buňky z kmene One Shot™ pLysS Chemically Competent *E. coli* a pro RHDV2 z kmene One Shot™ BL21(DE3)pLysS Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen™). Proteiny byly následně čištěny s použitím FPLC. Finálním krokem bylo otestování sérologické reaktivity obou rekombinantních proteinů.

Dosažené výsledky projektu (max. 1/2 strany):

U volně žijících dravců byla identifikována řada izolátů s rizikovými mechanismy rezistence k lékům poslední volby, tj. karbapenemům a kolistinu. V souboru racků bělohlavých bylo získáno selektivní kultivací na půdě s cefotaximem 73 izolátů *E. coli*. U většiny izolátů byl testováním citlivosti k sadě antibiotik zjištěn multirezistentní profil. Pomocí celogenomového sekvenování byly u selektovaných izolátů identifikovány geny ESBL a AmpC beta-laktamázy, a to *bla*_{TEM-52}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-27}, *bla*_{CTX-M-55} a *bla*_{CMY-2} a geny pro plasmidy determinovanou rezistencí k fluorochinolonům (*qnrS1*, *qnrB19*). Vyšetření a dlouhodobě sledování racci bělohlaví se pohybovali ve střední Evropě s občasnými zálety do jižní Evropy. Selektivní kultivací 66 vzorků kloakálních výtěrů z 12 farem v Paraguayi bylo získáno 62 izolátů *E. coli* a 22 izolátů *K. pneumoniae*. Řada izolátů *E. coli* náležela k významným sekvenčním typům se zoonotickým potenciálem zahrnující ST457 (14 izolátů), ST38 (5), ST10 (2), ST117 (2) a ST93 (4).

V průběhu pokusu s *E. coli* O78:H4 neuhynulo žádné kuře a nebyly zaznamenány příznaky onemocnění. Po prvním a druhém týdnu experimentu byly zjištěny statisticky významné rozdíly v počtech CIP-rezistentních *E. coli* mezi pokusnou a kontrolní skupinou kuřat. U kontrolní skupiny byly počty CIP-rezistentních *E. coli* vyšší o 1 až 2 dekadické logaritmy než u pokusné skupiny ošetřené probiotickou směsí.

Z 15 chovů lososovitých ryb v ČR byly vyšetřeny desítky vzorků a bylo získáno 14 izolátů 12 druhů bakterií s inhibičním efektem na *Flavobacterium psychrophilum*.

Byl vytvořen nový protokol pro vizualizaci trávicího traktu klíšťat *D. reticulatus* s využitím zlatých nanočástic.

Přítomnost plísňe *P. destructans* byla detekována na všech zkoumaných lokalitách a u všech druhů netopýrů, které byly vzorkovány a vyšetřovány kultivačními, molekulárními i histopatologickými metodami. Detekovány byly i kožní léze typické pro syndrom bílého nosu. Nejvyšší prevalence onemocnění byla u netopýrů rodu *Myotis*, u nichž se v závislosti na použité metodě detekce blížila na některých lokalitách hodnotě 100 % (vyšetření PCR).

Byl syntetizován rekombinantní kapsidový protein VP60 pro dva typy viru vyvolávajících hemoragické onemocnění králíků RHDV.

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Projekt přinesl nové informace o šíření bakterií s rezistencí ke kriticky důležitým skupinám antibiotik v populacích volně žijících ptáků a v chovech drůbeže. Vysoká prevalence *E. coli* s produkcí ESBL a AmpC beta-laktamázy u synantropních racků bělohlavých poukázal na významnou kontaminaci životního prostředí bakteriemi s rizikovými mechanismy rezistence. Experimentálně bylo potvrzeno, že probiotika nového typu snižují počty APEC a CIP rezistentních *E. coli* při výkrmu brojlerů. Byly charakterizovány kmeny mikrobiot z prostředí akvakultur potlačující množení původce cytofagózy. Pomocí nové metodiky vizualizace bude možné lépe studovat trávicí trakt klíšťat elektronovou mikroskopií. Byla prokázána vysoká prevalence infekcí *P. destructans* u netopýrů v Bulharsku, Arménii i Rusku. Oba rekombinantní proteiny viru VP60 mají potenciál být použity ve vakcinaci králíků proti RHDV1 a RHDV2.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Výsledky projektu budou využity ke zhodnocení míry kontaminace životního prostředí bakteriemi s rizikovými mechanismy rezistence a významu volně žijících zvířat v jejich dalším šíření a v doporučení použití probiotik v chovech drůbeže. Výsledky budou využity v prevenci cytofagózy lososovitých ryb. Výsledky budou využity v dalším studiu trávicího traktu klíšťat. Infekce *P.*

destructans u netopýrů doprovázené kožními lézemi dokumentované v nových oblastech pomohou získat lepší přehled o celkovém rozšíření významného onemocnění netopýrů. Výsledky mohou být využity při přípravě vakcín proti RHDV králíků.

Výsledky budou využity v přípravě vědeckých publikací a disertačních prací studentů DSP podílejících se na řešení projektu.

Název článku a název vědeckého časopisu s impakt faktorem, v němž byly publikovány nebo se předpokládá publikace dosažených výsledků:

NESPOROVA, K., VALCEK, A., PAPAGIANNITSIS, C., KUTILOVA, I., JAMBOROVA, I., GERZOVA-DAVIDOVA, L., BITAR, I., HRABAK, J., LITERAK, I., DOLEJSKA, M. Multi-drug resistant plasmids with ESBL/AmpC and *mcr-5.1* resistance in Paraguayan poultry farms: the linkage of antibiotic resistance and hatcheries. *Microorganisms*, 2021, vol. 9, article number 866, p. 1-18. Výhradní dedikace **2021ITA31**

CHYTIL, J., KREJČÍ, Š., ROZSYPALOVÁ, L., LITERÁK, I. History, dispersal and habitat selection in Central European Caspian gulls *Larus cachinnans*: a study of birds originating from a single breeding colony.

Biologia (online first) <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00938> Výhradní dedikace **2021ITA31**

(řešitel a spoluřešitelé jsou vyznačeni tučně)

Předpokládané další publikace:

Impact of probiotic anaerobic microbiota on APEC and ESBL/pAmpC colonization of broilers. *Poultry Science*

Natural microbiota from rainbow trout aquacultures and its antagonistic activity against *Flavobacterium psychrophilum*. *Aquaculture*

Micro-CT imaging of painted dog-tick *Dermacentor reticulatus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*

Pseudogymnoascus destructans and white-nose syndrome outside of the American continent. *Journal of Fungi*

Serological reactivity of recombinant vp60 protein of RHDV1 and 2 viruses. *Research in Veterinary Sciences*

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

Dotace byla krácena na cca 45 % původně požadované částky

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	997 136	997 136
Služby	171 220	172 830
Cestovné	58 930	44 252
Další provozní náklady	628 847	641 914
Doplňkové náklady	278 420	278 420
Celkem	2 134 553	2 134 553

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

(komentář k čerpání finančních prostředků na řešení projektu – slovní popis v členění jednotlivých položek nákladů a konkrétní výčet, na co byly prostředky využity, komentář a zdůvodnění případných změn a rozdílů oproti schválenému rozpočtu projektu)

Výše čerpání i struktura nákladů se jen velmi mírně lišila ve vztahu k schváleným parametrům u položek další provozní náklady (zvýšení čerpání o 13 067 Kč), cestovné (snížení čerpání o 14 678 Kč) a služby (zvýšení čerpání o 1610 Kč).

Osobní náklady:

Osobní náklady zahrnovaly odměny řešitelům a stipendia studentů DSP, kteří se podíleli na řešení projektu.

Služby:

Přeprava vzorků z terénu, sekvenování DNA, nákup licence na analýzu sekvenčních dat, oprava patry na úpravu vody a termocykleru, náklady na telemetrické sledování, revize textu publikace v angličtině.

Cestovné:

Odběr vzorků v terénu, ZSC na Ukrajinu.

Další provozní náklady:

Ochranné pomůcky a dezinfekce, antibiotika a substance na testování citlivosti, Petriho misky, plastik a tampóny na kultivaci bakterií, zkumavky pro archivaci bakterií, laboratorní sklo a plasty, chemikálie vč. chemikálií pro molekulárně genetická vyšetření, zlaté nanočástice, soupravy pro izolaci DNA, materiál a reagentie pro PCR, materiál pro biochemické vyšetření vzorků krve, kancelářské potřeby a externí disk na uchování dat.

Doplňkové náklady:

Pokrývaly režijní náklady ve výši 15%.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

(k Závěrečné zprávě doložte výpis z IFIS, podepsaný osobou zodpovědnou za čerpání finančních prostředků)

9. Prohlášení a potvrzení řešitele odpovědného za čerpání prostředků, děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VETUNI bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VETUNI.

Datum, jméno a podpis

7. 1. 2022, Prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.

řešitele projektu:

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VETUNI pro rok 2021 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VETUNI, podle dalších pokynů ITA VETUNI a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

7. 1. 2022, Prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.

člena řešitelského týmu **odpovědného za čerpání prostředků:**

Přednosta ústavu nebo kliniky, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že projekt byl řešen na ústavu nebo klinice, respektive celoškolském pracovišti, které řídí.

Datum, jméno a podpis

7. 1. 2022, Prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.

vedoucího skupiny Infekční choroby a molekulární mikrobiologie

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:

Děkan fakulty, respektive vedoucí celoškolského pracoviště potvrzuje, že fakulta, respektive celoškolské pracoviště provedlo kontrolu řešení projektu a kontrolu čerpání prostředků přidělených na řešení projektu.

Datum, jméno, podpis

7. 1. 2022, Prof. MVDr. Jiří Smola, CSc.

ředitele CEITEC VETUNI:

Razítko